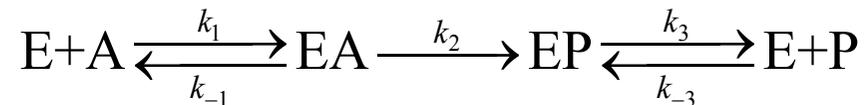


Inibição pelo produto

A acumulação do produto numa reacção enzimática pode inibir a reacção pelo simples efeito da reacção inversa (marcha para o equilíbrio). No entanto, algumas reacção *praticamente irreversíveis* exibem inibição pelo produto quando catalisadas enzimaticamente! Num mecanismo do tipo Henri-Michaelis-Menten teríamos que ter



o que parece muito pouco realista (porquê?). Muito mais plausível será o mecanismo de 3 passos, com o segund passo irreversível:



sendo k_{-2} , *tem-se*:

$$K_{mP} = \frac{k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_3 + k_2k_3}{k_{-3}(k_{-1} + k_{-2} + k_2)} = \frac{k_3}{k_{-3}} = K_{sP} \quad , \quad k_{-0} = 0 \quad , \quad k_p = \frac{k_{-0}}{K_{mP}} = 0$$

Inibição pelo produto

e assim a equação reversível de Michaelis-Menten

$$v = \frac{k_A [E]_0 [A] - k_P [E]_0 [P]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{mP}}}$$

reduz-se a

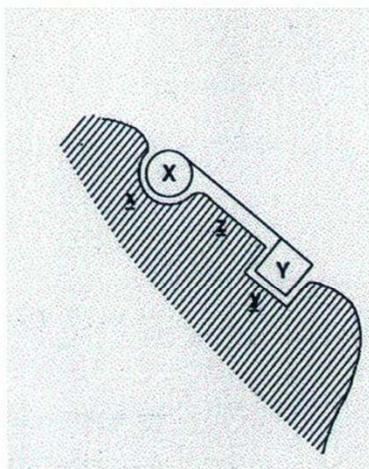
$$v = \frac{k_A [E]_0 [A]}{1 + \frac{[A]}{K_{mA}} + \frac{[P]}{K_{sP}}} = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_{mA} + [A] + K_{mA} \frac{[P]}{K_{sP}}} = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_{mA} \left(1 + \frac{[P]}{K_{sP}} \right) + [A]}$$

$$v = \frac{k_0 [E]_0 [A]}{K_{mA} \left(1 + \frac{[P]}{K_{sP}} \right) + [A]}$$

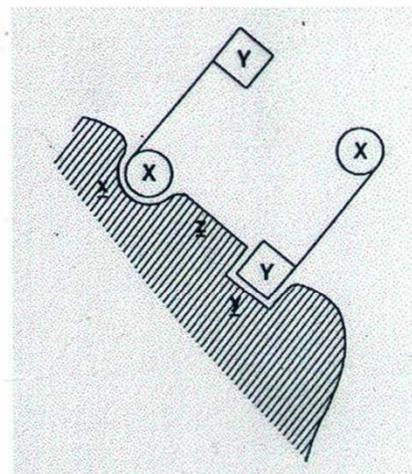
a expressão final de v é formalmente idêntica a uma equação de inibição competitiva, com inibidor P e constante de inibição K_{sP}

Inibição pelo substrato

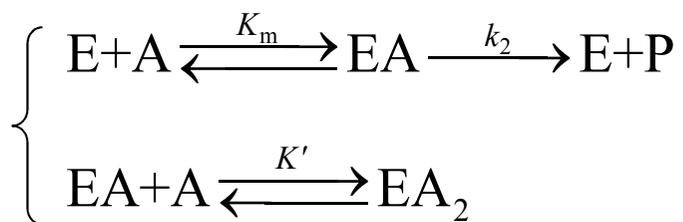
O substrato pode provocar inibição da sua própria catálise por via de um modo de ligação *não-produtivo* ao centro activo do enzima. Um dos casos mais simples ocorre com substratos que são ligandos bi-dentados:



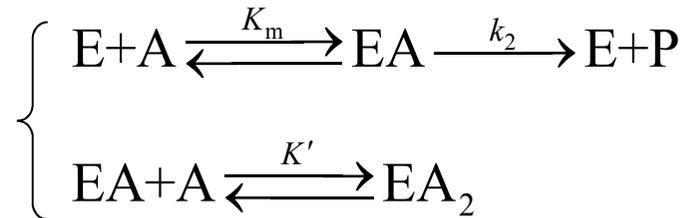
**Ligação produtiva
do substrato**



**Ligação não-produtiva
do substrato**



Inibição pelo substrato



$$[E]_0 = [E] + [EA] + [EA_2] \quad K_m = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K' = \frac{[EA][A]}{[EA_2]}$$

$$[A]_0 \gg [E]_0$$

$$v_0 = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A] + \frac{[A]^2}{K'}}$$

Note-se que esta expressão não é uma forma Michaeliana, pois tem um termo em $[A]^2$. A velocidade não tende para V_{\max} quando $v \rightarrow$ infinito, mas atinge um valor máximo e depois decresce para zero.

Inibição pelo substrato

$$v_0 = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A] + \frac{[A]^2}{K'}}$$

O máximo valor de v_0 obtem-se para

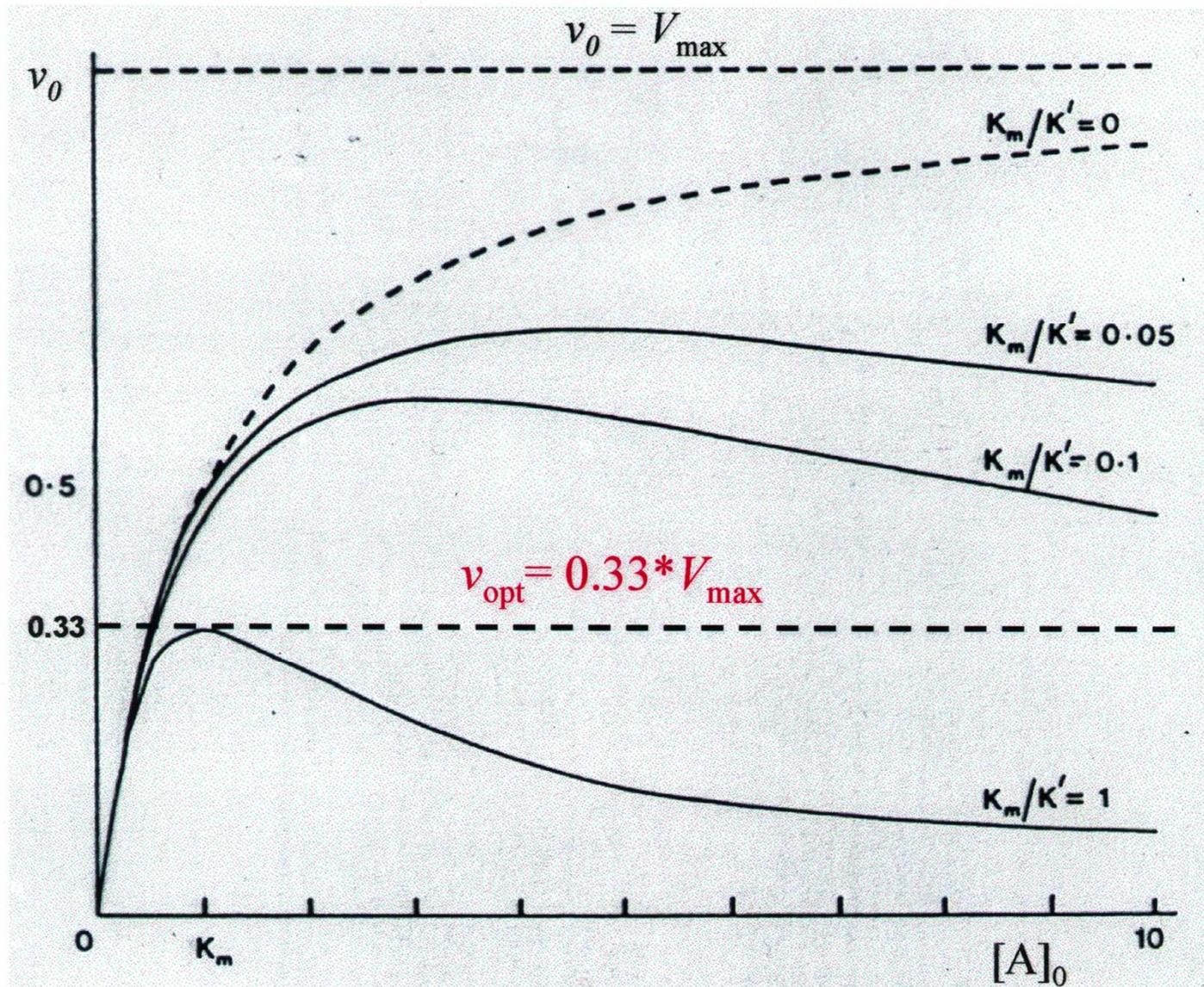
$$v_0 = \sqrt{K_m K'}$$

Designando este valor de velocidade por v_{OPT} , temos

$$\frac{K_m}{K'} = 1 \quad \Rightarrow \quad v_{\text{OPT}} = 33\% \text{ de } V_{\max}$$

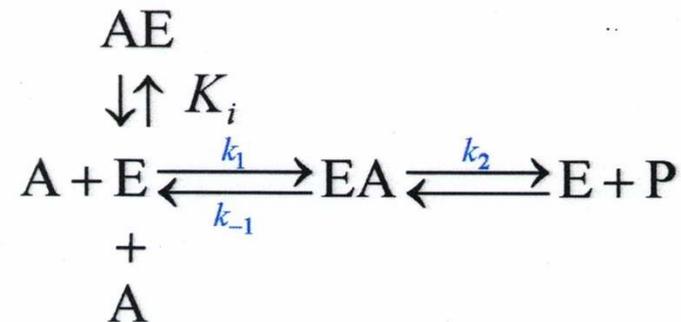
Note-se que a designação de V_{\max} no contexto deste inibição é meramente formal: corresponde à velocidade máxima que seria observada caso *não* ocorresse inibição pelo substrato. Ocorrendo este tipo de inibição, a velocidade atingirá um máximo para um valor de velocidade igual a $\sqrt{K_m K'}$

Inibição pelo substrato



Ligação não-produtiva do substrato

Quando o enzima é pouco específico para o substrato, pode ocorrer formação de um complexo enzima-substrato (AE) para o qual não ocorre catálise (nem formação de produto):



Este esquema cinético é semelhante ao da inibição competitiva, pelo que a velocidade deverá ser dada por:

$$v = \frac{V_{\max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[A]}{K_i} \right) + [A]}$$

Ligação não-produtiva do substrato

$$v = \frac{V_{\max} [A]}{K_m \left(1 + \frac{[A]}{K_i} \right) + [A]}$$

Esta expressão pode ser arranjada numa forma Michaelikana, com

$$v = \frac{V_{\max}^{\text{app}} [A]}{K_m^{\text{app}} + [A]}$$

$$V_{\max}^{\text{app}} = \frac{V_{\max}}{\left(1 + \frac{K_m}{K_i} \right)}$$

$$K_m^{\text{app}} = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{K_m}{K_i} \right)}$$

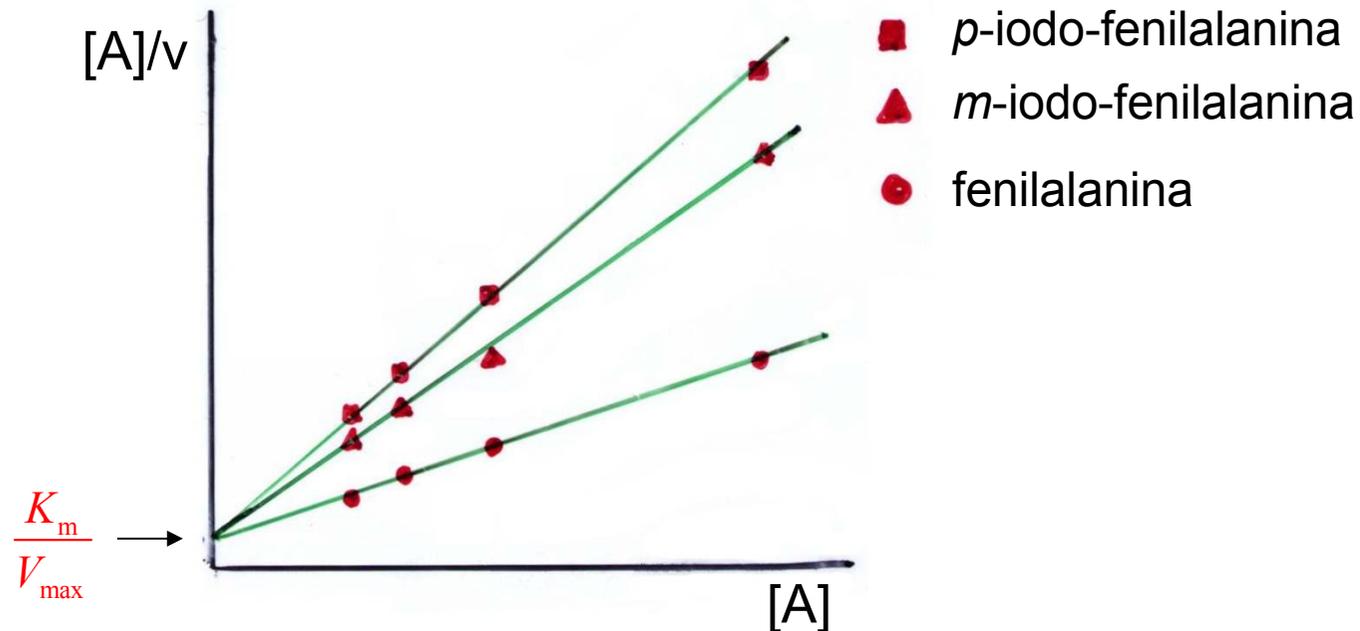
$$\frac{V_{\max}^{\text{app}}}{K_m^{\text{app}}} = \frac{V_{\max}}{K_m}$$

Portanto a cinética observada será Michaeliana, mas as constantes “verdadeiras” do enzima aparecem divididas por uma quantidade desconhecida.

Evidência para a ligação não-produtiva

A presença de ligação não-produtiva pode ser evidenciada pela comparação dos parâmetros cinéticos de um dado enzima relativamente a uma família de substratos.

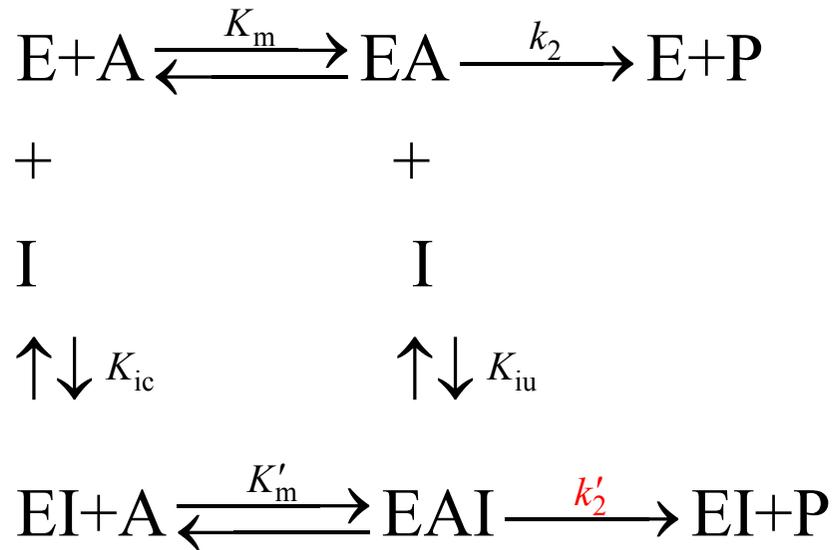
Oxidação da fenilalanina pela L-amino-oxidase



O gráfico de Hanes-Woolf indica um K_m/V_{max} constante para os 3 substratos, o que sugere ligação não produtiva em diferentes graus para os substituintes da fenilalanina

Inibição parcial (hiperbólica)

Actividade catalítica residual mesmo na presença do inibidor I.



$$K_m^{\text{app}} = K_m \frac{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{ic}}\right)}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{iu}}\right)}$$

$$V_{\text{max}}^{\text{app}} = \frac{[\text{E}]_0 [\text{A}] (k_2 + k'_2 [\text{I}] / K_{iu})}{\left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{iu}}\right)}$$

$$v_0 = \frac{[\text{E}]_0 [\text{A}] (k_2 + k'_2 [\text{I}] / K_{iu})}{K_m \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{ic}}\right) + \left(1 + \frac{[\text{I}]}{K_{iu}}\right) [\text{A}]}$$

Inibição parcial (hiperbólica)

$$K_m^{\text{app}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{ic}}} \right) / \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{iu}}} \right) \quad V_{\text{max}}^{\text{app}} = [E]_0 [A] (k_2 + k_2' [I] / K_{\text{iu}}) / \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{iu}}} \right)$$

$$\frac{1}{V_{\text{max}}^{\text{app}}} = \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{iu}}} \right) / [E]_0 [A] (k_2 + k_2' [I] / K_{\text{iu}})$$

$$\frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\text{max}}^{\text{app}}} = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{\text{ic}}} \right) / [E]_0 [A] (k_2 + k_2' [I] / K_{\text{iu}})$$

$\frac{1}{V_{\text{max}}^{\text{app}}}$ e $\frac{K_m^{\text{app}}}{V_{\text{max}}^{\text{app}}}$ são funções **hiperbólicas** da [I]

Inibição parcial (hiperbólica)

$$k_2 = k'_2 \Rightarrow v_0 = \frac{k [E]_0 [A]}{K_m \left(\frac{1 + \frac{[I]}{K_{ic}}}{1 + \frac{[I]}{K_{iu}}} \right) + [A]}$$

$K_{iu} > K_{ic} \Rightarrow K_m^{\text{app}} > K_m$ Inibição competitiva parcial

$K_{iu} < K_{ic} \Rightarrow K_m^{\text{app}} < K_m$ **Activação** competitiva parcial