

# A equação de Henri-Michaelis-Menten

Michaelis e Menten (1913) refinam a abordagem de Henri e propõe um modelo muito semelhante:



considerando o primeiro passo suficientemente rápido para ser considerado em equilíbrio:

$$K_S = \frac{[E]_{eq}[A]_{eq}}{[EA]_{eq}}$$

as concentrações de enzima e substrato livre vêm dadas por:

$$[E] = [E]_0 - [EA]$$

$$[A] = [A]_0 - [EA]$$

se tivermos  $[A]_0 \gg [E]_0$  vem  $[A] \approx [A]_0$  e  $[EA]$  pode ser obtido como :

$$[EA] = \frac{[E]_0}{K_S/[A] + 1}$$

# A equação de Henri-Michaelis-Menten

A velocidade de formação do produto depende do segundo passo, que é uma reacção simples de primeira ordem:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_{\text{cat}}[EA] = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0}{K_s/[A] + 1} = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0[A]}{K_s + [A]}$$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}}[E]_0$$

$$K_m = K_s$$

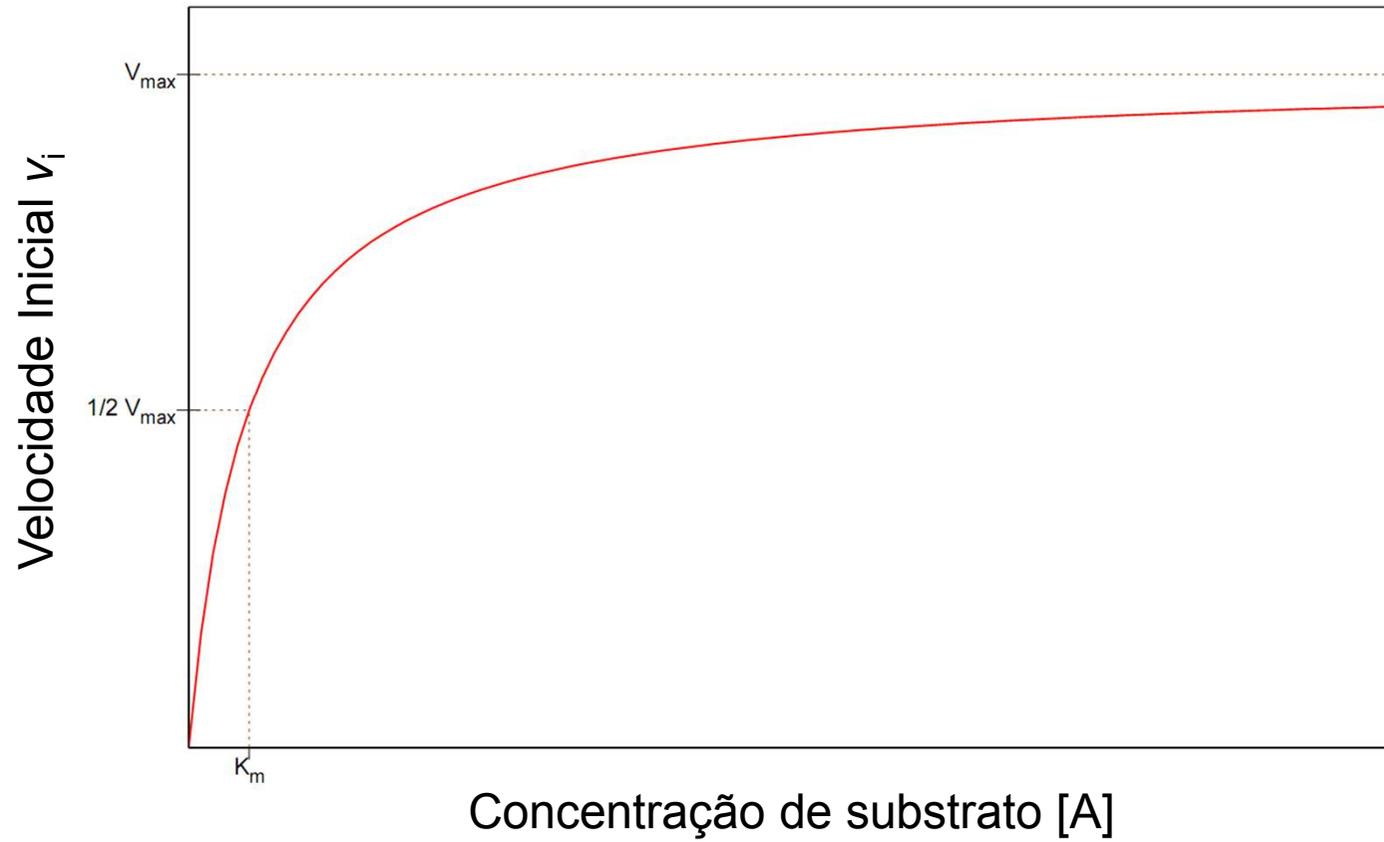
$$v = \frac{V_{\text{max}}[A]}{K_m + [A]}$$

Equação de  
Henri-Michaelis-Menten

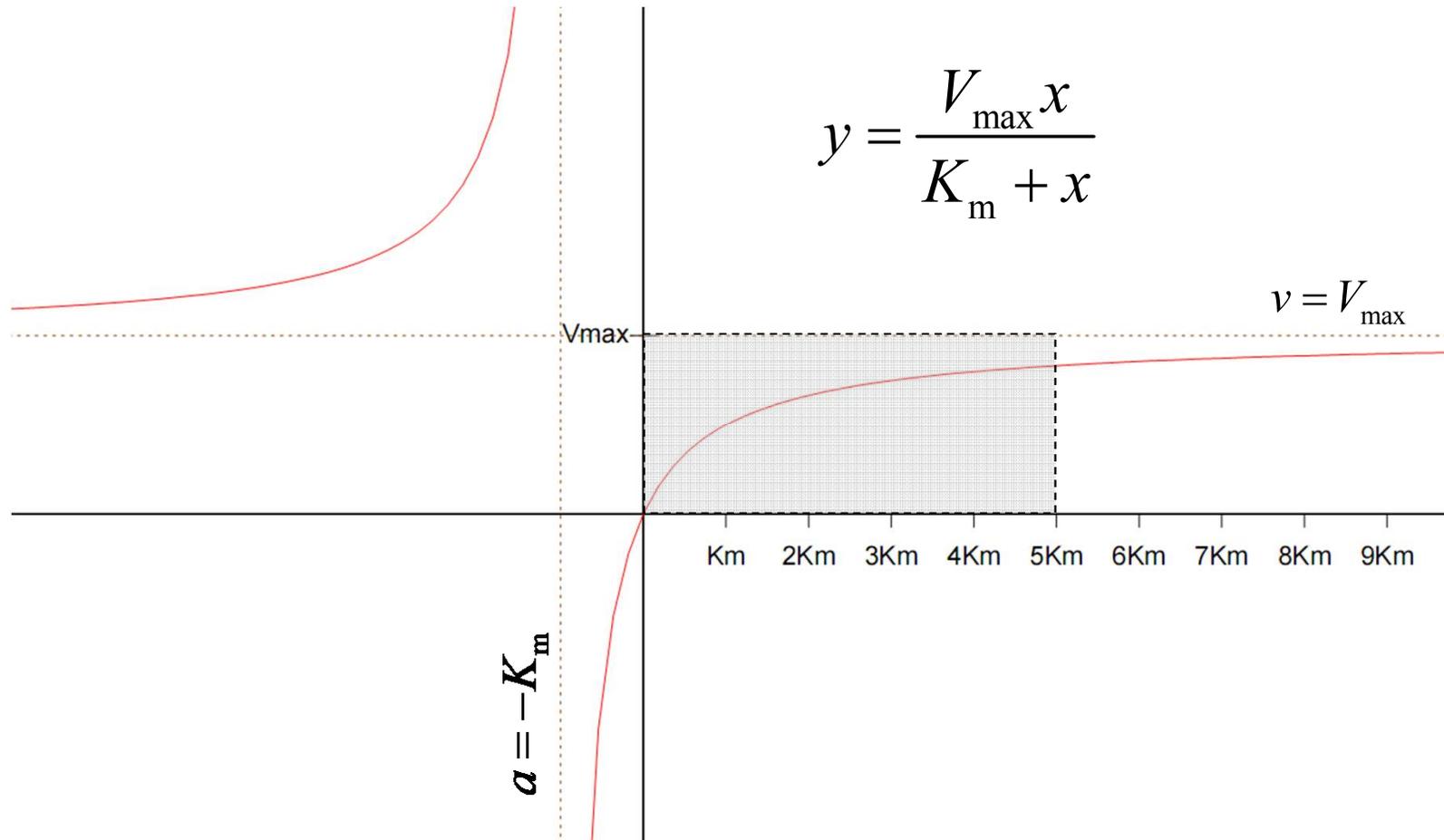
$V_{\text{max}}$  → velocidade máxima

$K_m$  → cte. de Michaelis

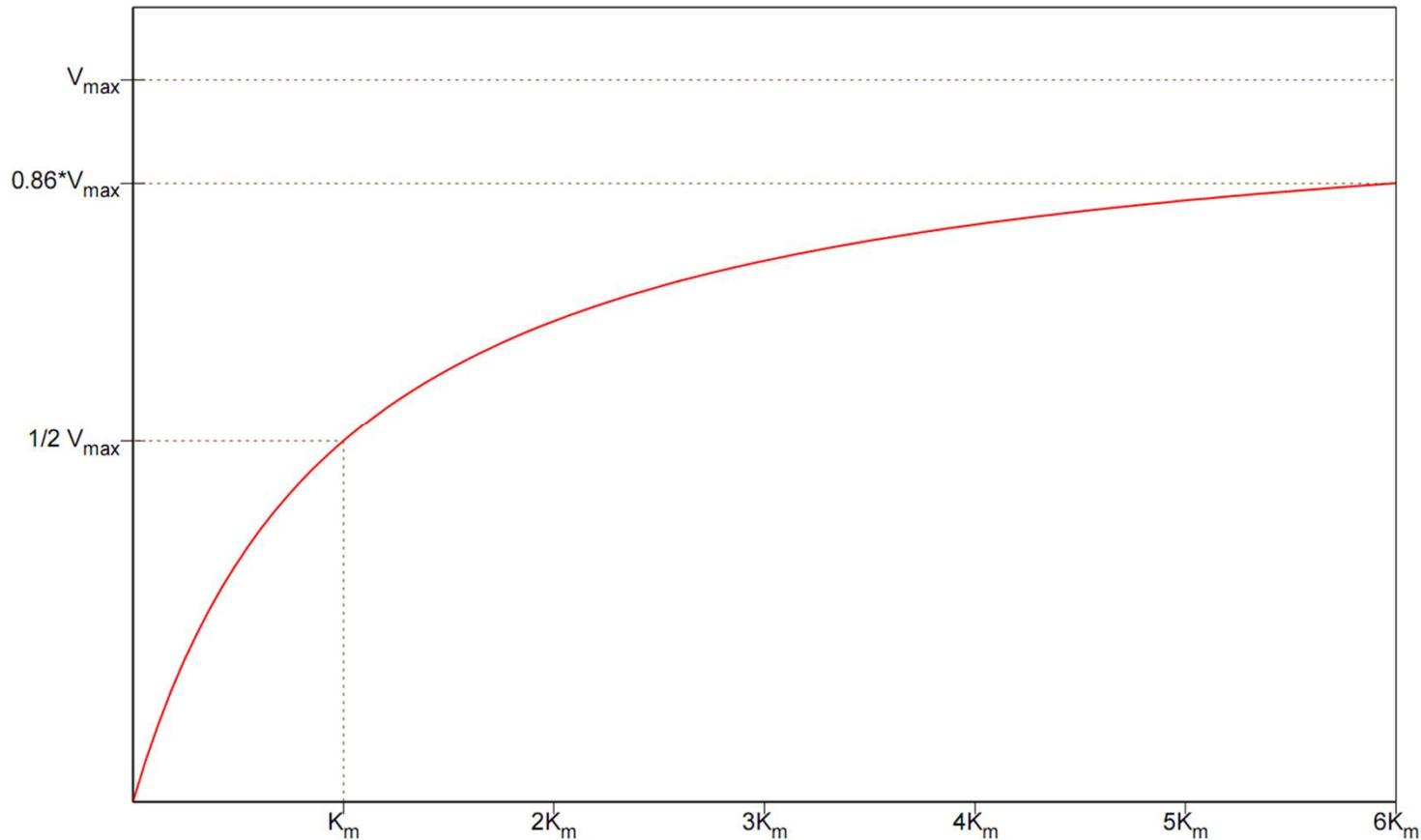
# A curva de Henri-Michaelis-Menten



# A curva de Henri-Michaelis-Menten



## Dificuldade na estimativa dos parâmetros $K_m$ e $V_{max}$



A estimativa dos parâmetros  $K_m$  e  $V_{max}$  *directamente* a partir da curva de Michaelis-Menten é muito imprecisa porque para concentrações “normais” de substrato a curva encontra-se ainda longe da assíntota!

## O modelo de Van Slyke & Cullen

Em 1914 Van Slyke e Cullen chegaram a resultados semelhantes aos de Michaelis e Menten para o caso da urease, mas assumiram a irreversibilidade do primeiro passo:



Neste caso não há equilíbrio e a concentração de EA é dada por

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1[E][A] - k_2[EA] = k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_2[EA]$$

V.S. e C. assumiram que a concentração do complexo central se mantém aproximadamente constante:

$$\frac{d[EA]}{dt} \approx 0$$

conduzindo a:

$$k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_2[EA] = 0$$

# O modelo de Van Slyke & Cullen

(cont.) daqui pode tirar-se uma expressão para EA:

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A]}{k_2 + k_1[A]}$$

Substituindo a expressão da velocidade de reacção,

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[EA]$$

vem

$$v = \frac{k_2[E]_0[A]}{\frac{k_2}{k_1} + [A]}$$

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} \quad V_{\max} = k_2[E]_0$$

A equação obtida é experimentalmente indistinguível da equação de Henri-Michaelis-Menten!

## O modelo de *steady-state* de Briggs & Haldane

Em 1925 Briggs & Haldane propõe um mecanismo um pouco mais geral que, que acaba por abarcar as situações descritas pelos modelos anteriores.



Neste caso não são assumidas condições de equilíbrio, pelo que a concentração de EA segue a equação:

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_2[EA]$$

Briggs & Haldane argumentaram que, para muitos enzimas, se pode assumir que o complexo EA se encontram em estado estacionário:

$$\frac{d[EA]}{dt} \approx 0$$

(cont.)

## O modelo de *steady-state* de Briggs & Haldane

(cont.) Nestas condições a concentração de EA pode ser obtida a partir da seguinte equação:

$$k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_2[EA] = 0$$

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A]}{k_{-1} + k_2 + k_1[A]}$$

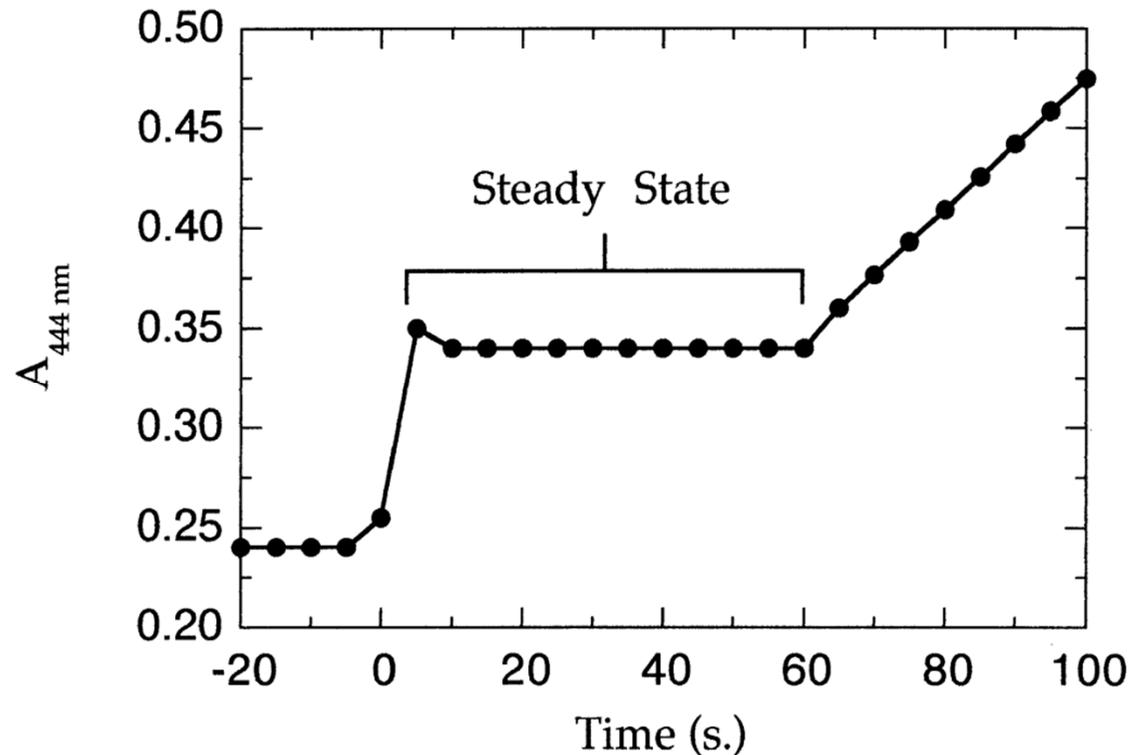
$$v = k_2[EA] = \frac{k_2 k_1 [E]_0 [A]}{k_{-1} + k_2 + k_1 [A]}$$

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]}$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad V_{\max} = k_2 [E]_0$$

$$\left\{ \begin{array}{l} k_{-1} \gg k_2 \Rightarrow K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} \\ \text{(Henri-Michaelis-Menten)} \\ k_{-1} = 0 \Rightarrow K_m = \frac{k_2}{k_1} \\ \text{(van Slyke \& Cullen)} \end{array} \right.$$

## Exemplo de observação experimental de estado estacionário



Estabelecimento do estado estacionário na reacção da citocromo *c* oxidase com os seus substratos, citocromo *c* e oxigénio molecular. A evolução da reacção é seguida pela variação de absorvência do grupo hémico a 444 nm

## Relação entre H-M-M e B-H



Henri-Michaelis-Menten:

$$v = \frac{k_2[E]_0[A]}{K_s + [A]}$$

Briggs-Haldane:

$$v = \frac{k_2[E]_0[A]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [A]}$$

sendo

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

O modelo B-H torna-se numericamente igual a H-M-M quando  $k_2 \ll k_{-1}$

$$k_2 \ll k_{-1} \Rightarrow \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (\text{condição para equilíbrio rápido})$$

## Validade da aproximação do estado estacionário



A validade da aproximação de estado estacionário pode ser testada comparando a solução aproximada ( $d[EA]/dt=0$ ) com a solução exacta da equação diferencial que descreve a concentração de EA

$$\frac{d[EA]}{dt} = k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_2[EA]$$

$$\int \frac{d[EA]}{k_1([E]_0 - [EA])[A] - k_{-1}[EA] - k_2[EA]} = \int dt$$

$$\frac{\ln \{k_1[E]_0[A] - (k_1[A] + k_1 + k_2)[EA]\}}{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)} = t + \alpha$$

(cont.)

## Validade da aproximação do estado estacionário

(cont.)  $\alpha$  é determinado assumindo que  $[EA]=0$  quando  $t=0$ :

$$\alpha = \frac{\ln \{k_1[E]_0[A]\}}{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)}$$

substituindo  $\alpha$  e exponenciando,

$$[EA] = \frac{k_1[E]_0[A](1 - e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t})}{k_1[A] + k_{-1} + k_2}$$

Sendo a velocidade dada por  $v = k_2[EA]$  e pondo  $V_{\max} = k_2[E]_0$

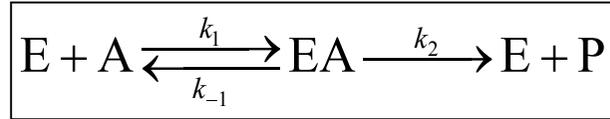
$$v = \frac{V_{\max} (1 - e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t}) [A]}{K_m + [A]}$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} \left\{ \frac{V_{\max} (1 - e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t}) [A]}{K_m + [A]} \right\} = \frac{V_{\max} [A]}{K_m + [A]}$$

Equação de Michaelis-Menten

O tempo para atingir o estado estacionário depende velocidade com que decai a exponencial  $e^{-(k_1[A] + k_{-1} + k_2)t}$ . Para valores típicos de  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  este tempo é da ordem dos *milisegundos*

# Análise dinâmica do mecanismo mono-substrato irreversível

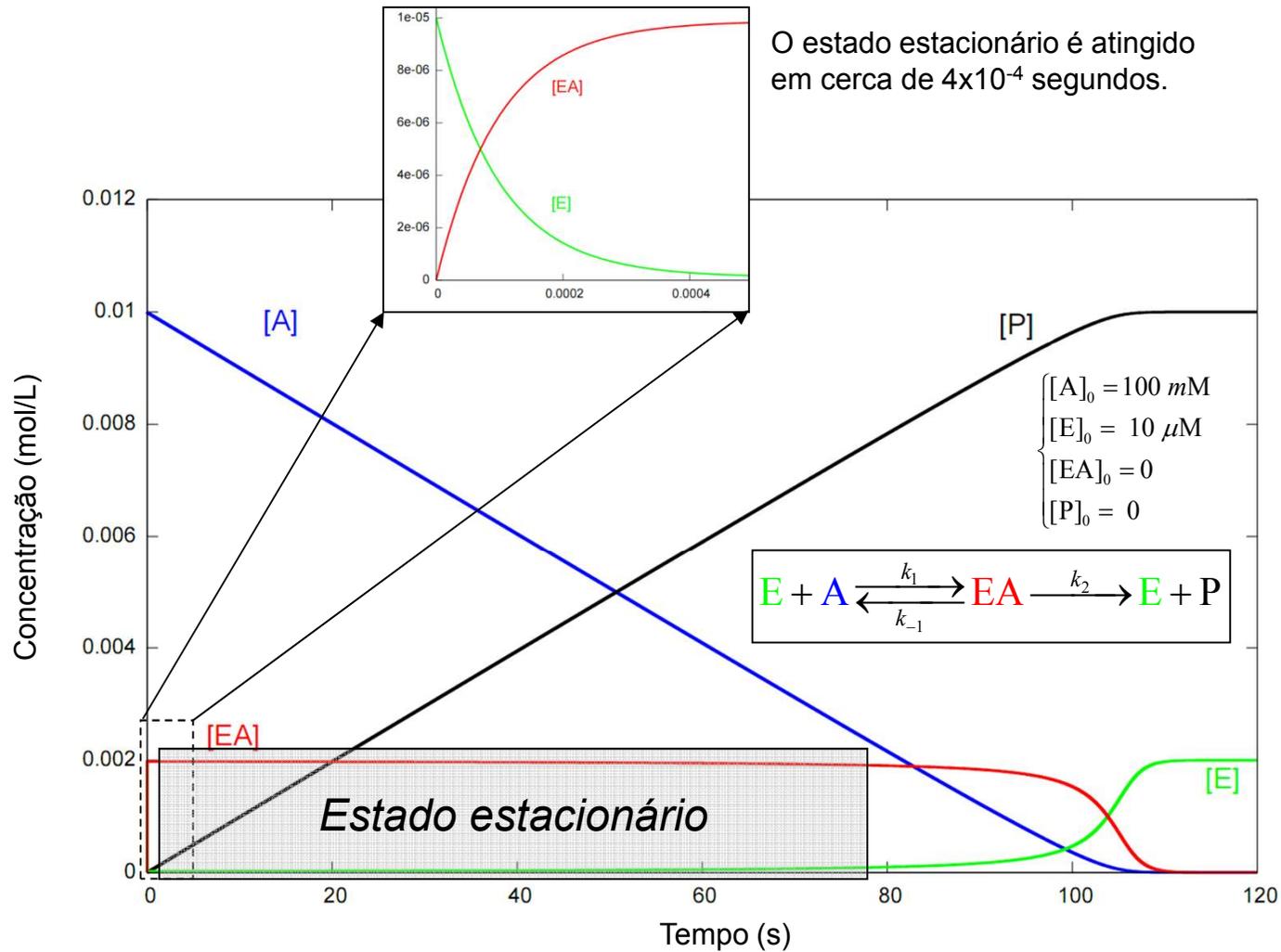


$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[\text{A}]}{dt} = -k_1[\text{E}][\text{A}] + k_{-1}[\text{EA}] \\ \frac{d[\text{E}]}{dt} = -k_1[\text{E}][\text{A}] + k_{-1}[\text{EA}] + k_2[\text{EA}] \\ \frac{d[\text{EA}]}{dt} = +k_1[\text{E}][\text{A}] - k_{-1}[\text{EA}] - k_2[\text{EA}] \\ \frac{d[\text{P}]}{dt} = +k_2[\text{EA}] \end{array} \right. \quad \left\{ \begin{array}{l} k_1 = 1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \\ k_{-1} = 100 \text{ s}^{-1} \\ k_2 = 10 \text{ s}^{-1} \end{array} \right.$$

## Condições iniciais

$$\left\{ \begin{array}{l} [\text{A}]_0 = 100 \text{ mM} \\ [\text{E}]_0 = 10 \text{ } \mu\text{M} \\ [\text{EA}]_0 = 0 \\ [\text{P}]_0 = 0 \end{array} \right.$$

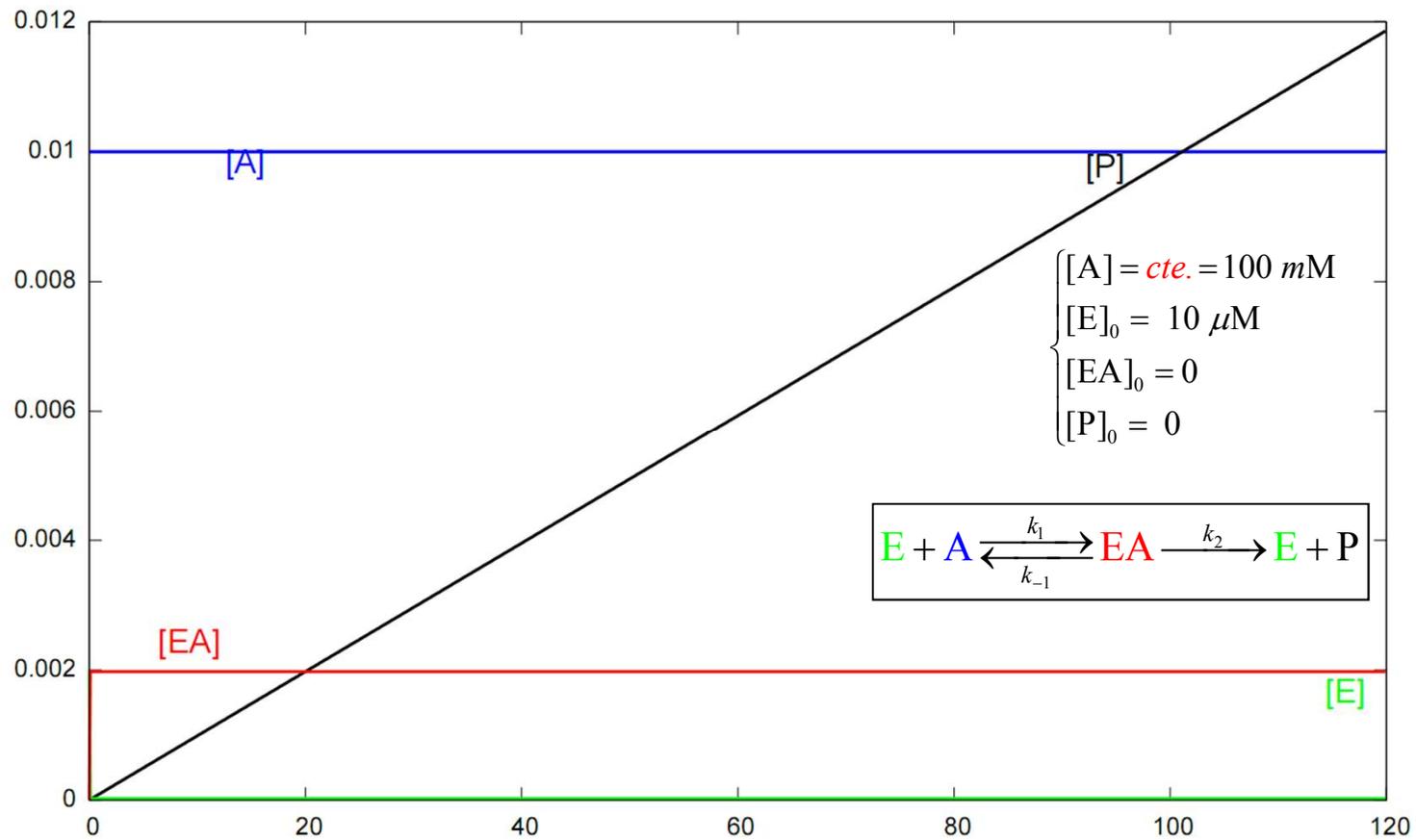
O sistema de equações diferenciais que descreve o mecanismo simples mono-substrato pode ser resolvido por um método numérico aproximado, não sendo necessária qualquer aproximação. Neste exemplo o consumo de substrato não é desprezável.



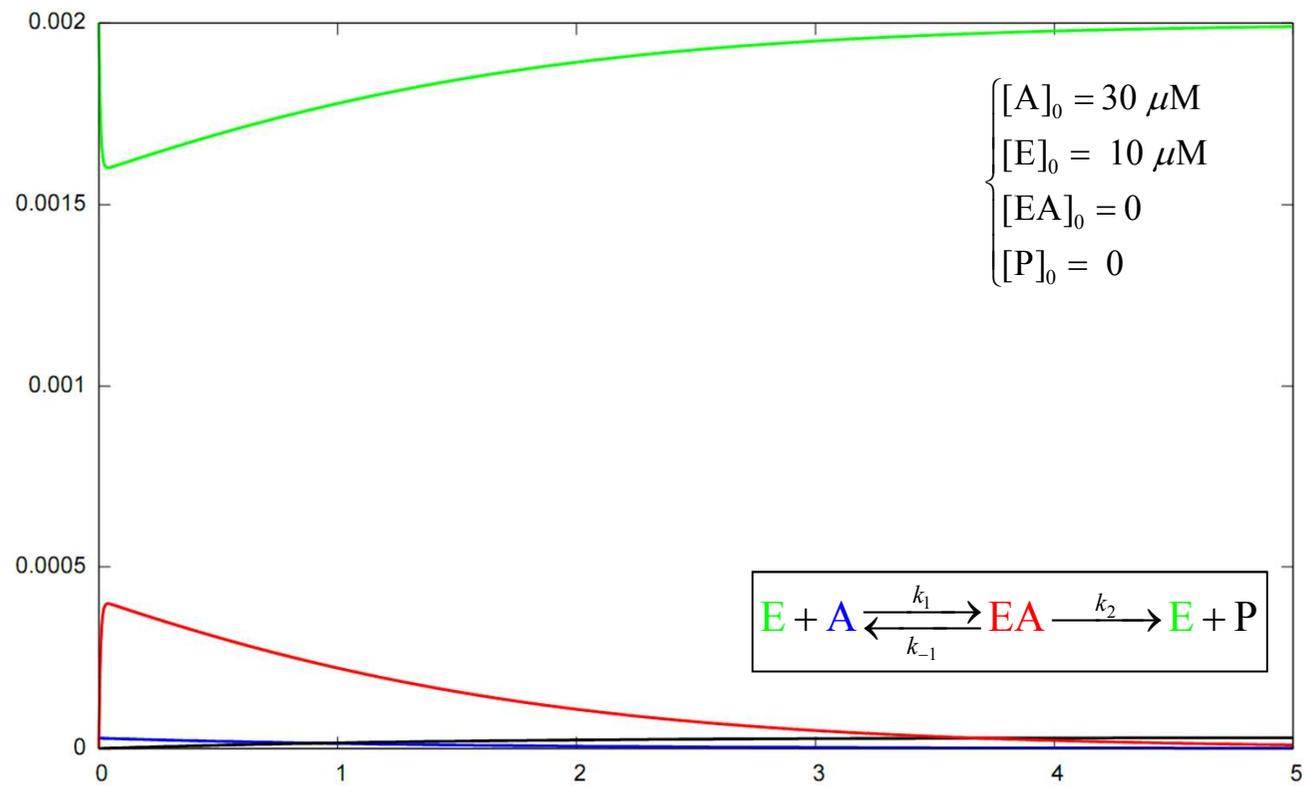
O estado estacionário perdura durante cerca de 80 segundos neste exemplo, até ao consumo completo do substrato.

Como se pode ver, não é necessário assumir  $[A]=\text{cte.}$  para observar estado estacionário!

**N.B.:** Os valores de  $[E]$  e  $[EA]$  foram multiplicados por 200 para ficarem visíveis no gráfico.



Se a concentração de substrato estiver em excesso de forma a que a sua variação seja insignificante, o estado estacionário é mantido indefinidamente.



Se a concentração de inicial de substrato for próxima da concentração de enzima, não chega a haver manutenção de um estado estacionário.