



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos  
Departamento de Engenharia de Alimentos

ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS



## Aula 02 – CINÉTICA ENZIMÁTICA

Profa. Marta Mitsui Kushida

2019

**Dica:**

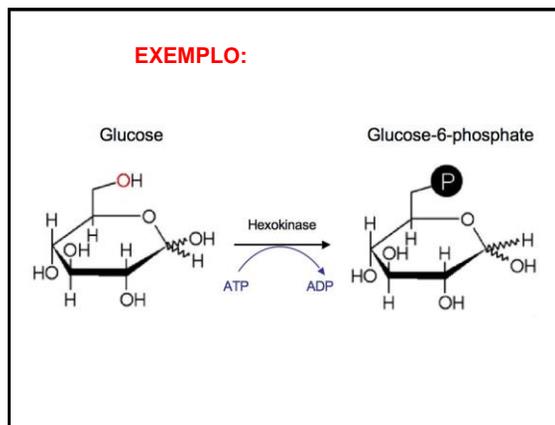
Estude o **capítulo 7** do livro "Biotecnologia Industrial" – volume I das referências!!!!  
e  
**Capítulo 6** do livro de Lehninger também é uma boa dica!

**O que é cinética enzimática?**

- É a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas, e os fatores que influenciam nesta velocidade.

➤ Cinética de uma enzima:

- avalia-se (por unidade de tempo de reação)
  - a quantidade de produto formado
  - ou
  - a quantidade de substrato consumido.



**OBJETIVOS DA CINÉTICA**

**CINÉTICA ENZIMÁTICA**

1. Medir as velocidades das transformações que se processam
2. Estudar a influência das condições de trabalho na velocidade da reação (pH, T, [ ], etc.)
3. Correlacionar as velocidades das transformações com fatores que as afetam
4. Facilitar a otimização do processo considerado
5. Estabelecer critérios para o controle do processo
6. Projetar reatores, com base em critérios racionais

**FATORES QUE INFLUENCIAM A VELOCIDADE DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS**

1. [E]
2. [S]
3. **pH**
4. **Temperatura**
5. Aw
6. Pressão
7. Presença de agentes desnaturantes

Conhecendo-se o comportamento das enzimas frente a estes fatores =  
Controlar ou otimizar um processamento enzimático

## Como medir a velocidade da reação em condições experimentais conhecidas?

Vamos ver no final da aula!



## Estabilidade enzimática x Atividade enzimática

- Atividade enzimática:
  - É dada pela medição da velocidade inicial da reação sob uma faixa de condições determinadas.
- Estabilidade enzimática:
  - Capacidade das enzimas de reter sua atividade catalítica sob diferentes condições de reação ao longo do tempo.

### Exemplo: efeito do pH

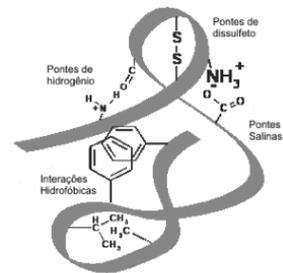
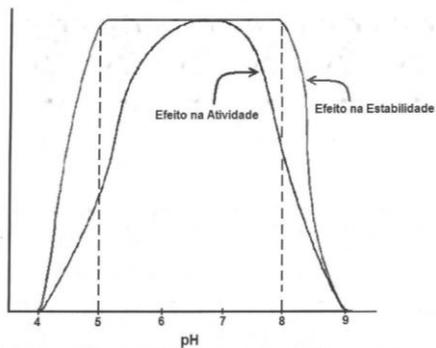
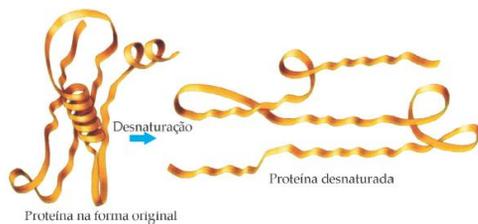
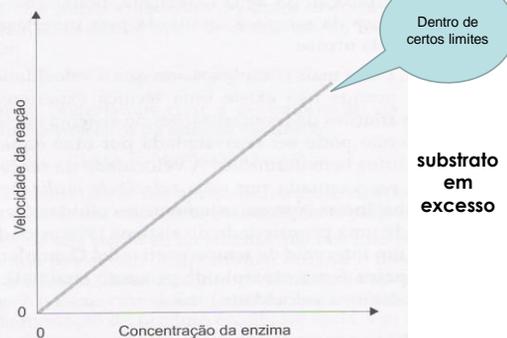


Figura 6. Mecanismos de estabilização da estrutura da proteína

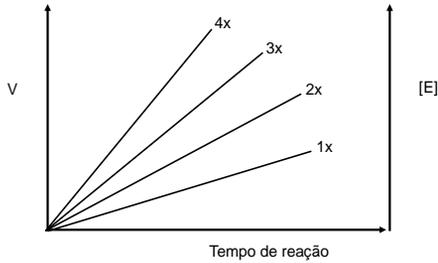
(Gomes et al, 2007)



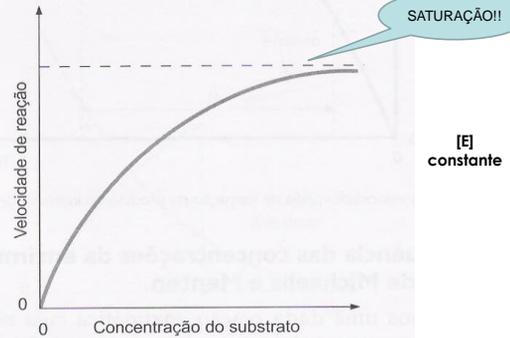
## 1) INFLUÊNCIA DA [E]



**SUBSTRATO TRANSFORMADO PARA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ENZIMA**

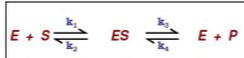
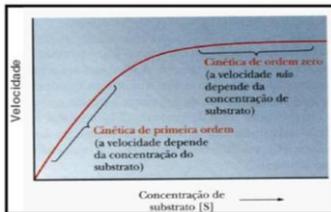


**2) INFLUÊNCIA DA [S]**

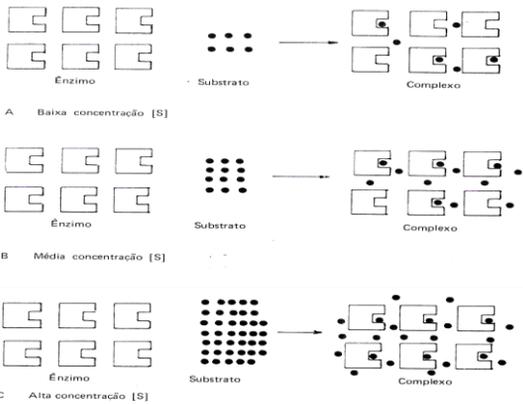
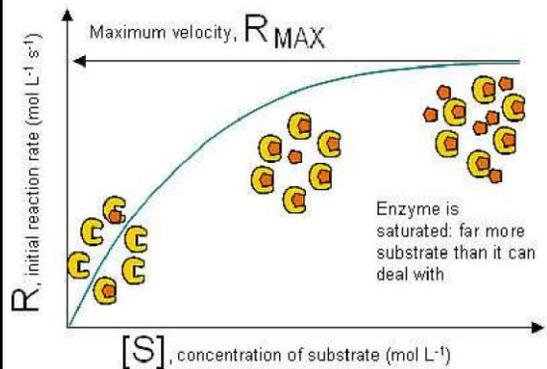


**Formação do complexo Enzima-Substrato – ES**

Limita a V em alta [S] devido à saturação dos sítios ativos da E



Evidência: Velocidade máxima (Vmax) → Saturação  
Vmax não é observada numa reação química



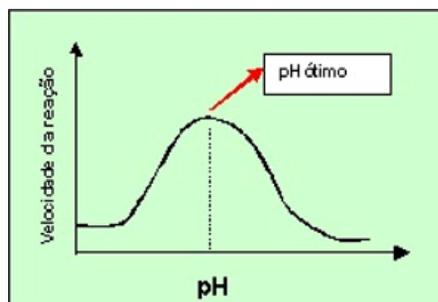
**3) Efeito do pH:**

- Mudanças no pH afetam a atividade enzimática
  - ionização reversível dos resíduos de aminoácidos das enzimas ou do substrato.
- O valor de pH mais favorável (máxima atividade):
  - pH ótimo.

### 3) Efeito do pH:

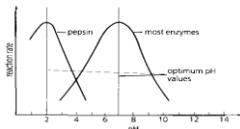
- Desnaturação ácida: (pH↓)
  - Desaparecimento das cargas negativas
- Desnaturação alcalina (pH↑)
  - Desaparecimento das cargas positivas

### Efeito do pH sobre a velocidade da reação.



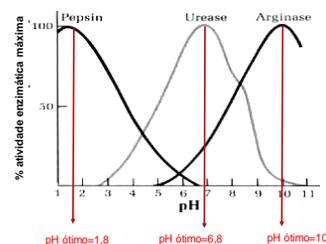
### pH

- Maioria das enzimas  
faixa ótima: 4,5 – 8,0



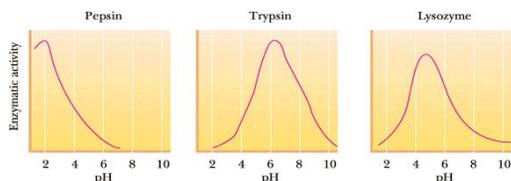
Enzima	pH ótimo
amilase	4,8
invertase	5,0
pectina metil-esterase	6,5 – 8,0
pepsina	1,8
arginase	10,0

### Efeito do pH sobre a velocidade da reação.



1. O pH ótimo = variações no estado de ionização de resíduos de aminoácidos do sítio ativo.
2. Enzima está pelo menos parcialmente desnaturada em pHs afastados do pH ótimo.
3. Quando o substrato é uma molécula ionizável, o pH ótimo da enzima também reflete o seu estado de ionização .

### Atividade das enzimas é sensível ao pH



Enzima digestiva.  
Hidrólise das proteínas em peptídeos mais simples!

Secretada pelo pâncreas.  
São endopeptidases.

Hidrólise de carboidratos de alta massa molecular.  
Ação antimicrobiana.

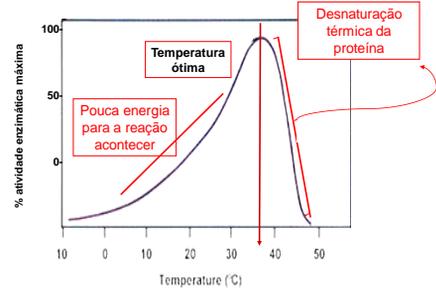
### FATORES QUE AFETAM O pH ÓTIMO DA ENZIMA

- [S]
- Tipo e [sais presentes]
- Estabilidade de diferentes cofatores
- Presença de inibidores ou ativadores
- Temperatura

## pH – observações:

- Se uma enzima atua em mais de um substrato os valores de pH ótimo variam
- Valores extremos de pH desnaturam as enzimas, inativando-as

## 4) EFEITO DA TEMPERATURA



T°ideal → máxima velocidade / mínimo de desnaturação



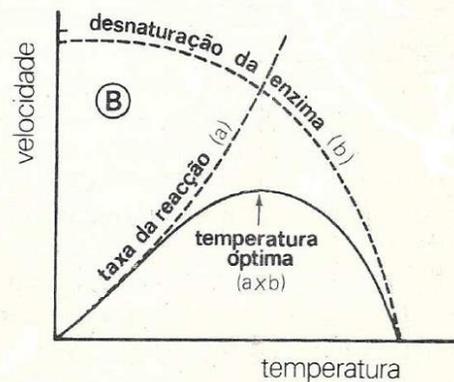
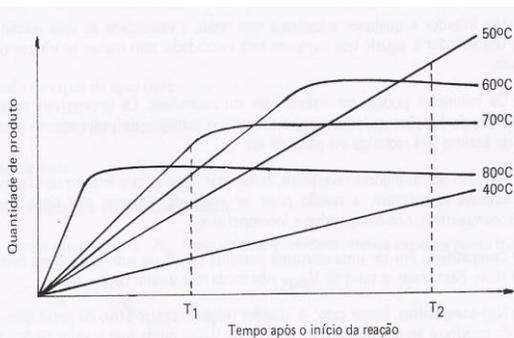
- Dissociação de subunidades
- Proteólise
- Perda de cofator essencial
- Agregação e precipitação
- Redobramento incorreto
- Reações de desaminação
- Rompimento de pontes de dissulfeto
- Oxidação de cisteína

Figura 5. Efeitos da alta temperatura sobre a estrutura da proteína  
(Gomes et al, 2007)

## EFEITO DA TEMPERATURA

- O aumento contínuo da temperatura resulta na inativação enzimática  
 $T > 45^{\circ}\text{C}$
- A baixas temperaturas as enzimas reagem lentamente

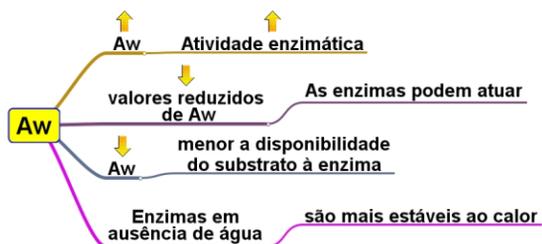
## VARIAÇÃO COM TEMPO E TEMPERATURA



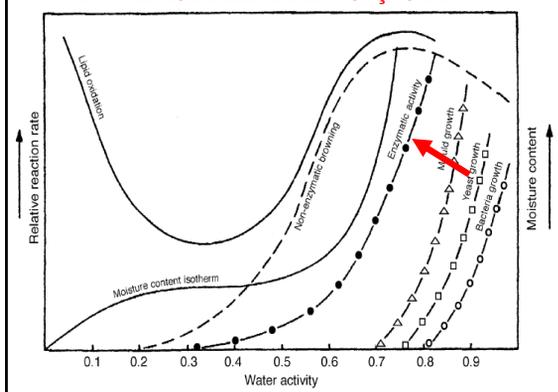


A atividade máxima de uma enzima ocorre um pouco antes da sua temperatura de inativação

## 5) ATIVIDADE DE ÁGUA ( $A_w$ )



## MAPA DE ESTABILIDADE EM FUNÇÃO DE $A_w$

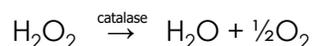
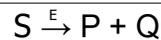


## 6) PRESSÃO

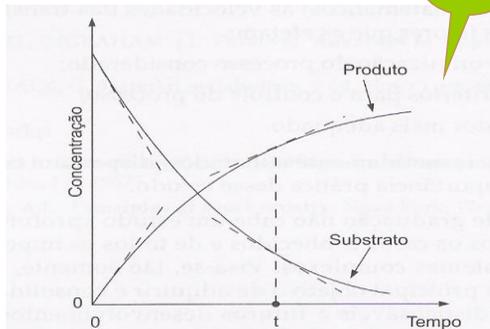
- $\uparrow P$ :
  - O equilíbrio se desloca em favor do lado da reação com menor volume.
  - Rompimento de interações iônicas.
  - Deformação da proteína pela entrada de água dentro da molécula.
  - Promove ligações de H.
  - Pode romper o par iônico entre enzima e substrato.

# PARÂMETROS CINÉTICOS

## MEDIDA DA VELOCIDADE: EXEMPLO DE REAÇÃO ENZIMÁTICA



### VARIAÇÃO NA [S] e [P] medida da velocidade em $t=0$ e $t$



### CONSIDERAÇÕES ACERCA DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

- Decréscimo de [S]
- Possibilidade de redução de [E] em virtude de sua instabilidade
- Os produtos formados podem atuar como inibidores da ação catalítica

### Portanto...

- O único instante em que as condições experimentais são bem conhecidas é o **instante inicial!**
- A velocidade da reação enzimática deve ser calculada no início, sempre que possível

### REAÇÕES QUE PODEM TER SUA VELOCIDADE INICIAL MEDIDA

- Decomposição da água oxigenada catalase
- Hidrólise da sacarose invertase
- Hidrólise da uréia urease

### Por que a velocidade inicial não pode ser medida em alguns casos?

- Não existe uma técnica experimental que permita acompanhar as variações das concentrações no sistema em estudo.
- A transformação não pode ser representada por uma equação química com reagentes e produtos bem definidos

### O que fazer quando a velocidade inicial não pode ser medida?

- Representa-la por meio de de uma **velocidade média** de **consumo** ou de **produção** de substâncias convenientemente escolhidas em um intervalo de tempo pré-fixado.
- Representa-la por meio de uma **velocidade média** da variação de uma **propriedade** do sistema
  - viscosidade, **textura**, absorbância, etc.

## MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN

Explica a influência das concentrações iniciais de enzima e de substrato na velocidade inicial da reação enzimática



Maud Menten

Leonor Michaelis

1913 = Michaelis e Mentem  
Apresentam cálculo matemático

1925 = Briggs e Haldane  
Desenvolvem este cálculo:  
Consideram – estado estacionário

## TEORIA DE MICHAELIS-MENTEN

- O substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si formando um composto intermediário denominado complexo *enzima-substrato*.



- No início da reação o complexo formado é proporcional à concentração da enzima.



- O complexo formado se decompõe ou reage com outra substância regenerando a enzima e formando os produtos da reação



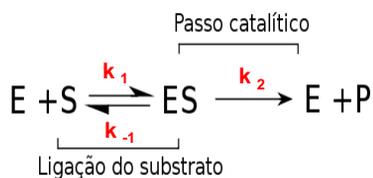
## Reação enzimática no estágio inicial

Enzima [E] + substrato [S]  $\rightleftharpoons$  complexo enzima-substrato [ES]

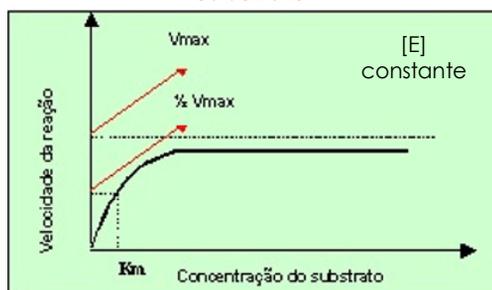


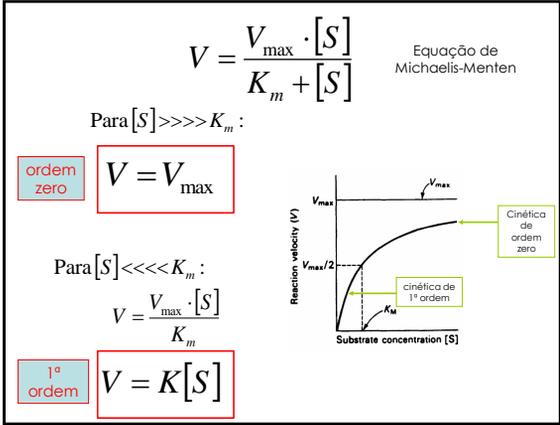
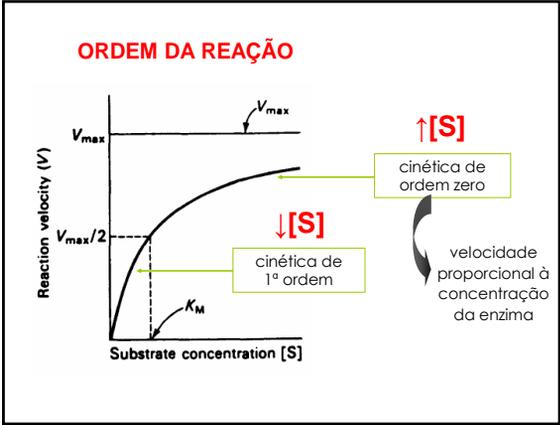
Determinante da velocidade da reação

## Resumindo...



## Relação entre a velocidade da reação enzimática e a concentração do substrato.

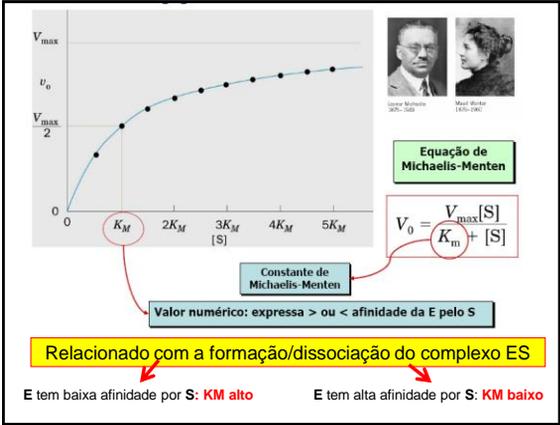
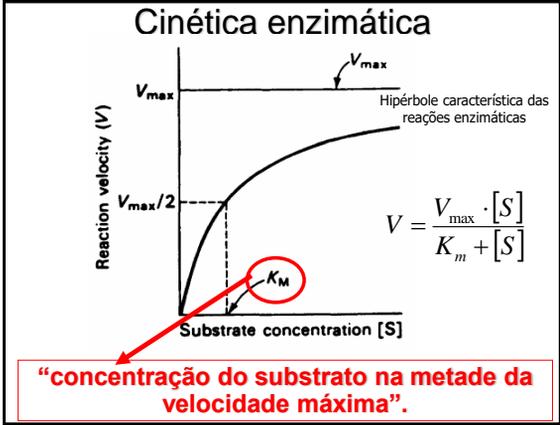




### Equação de Michaelis-Menten.

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Onde:  
 Vo = velocidade inicial da reação.  
 Vmax = velocidade máxima da reação.  
 [S] = concentração do substrato.  
 Km = constante de Michaelis-Menten.



### EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

Se  $K_m = [S]$  (mol/L)

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{2 \cdot [S]}$$

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$
(mol/L.min)



**Como foi deduzida a equação de Michaelis e Menten?**

Estude as páginas 202 a 204 do capítulo 6 do Lehninger!

## Atenção!

- As constantes  $K_m$  e  $V_{max}$  são características de uma determinada enzima e mudam com o pH e a temperatura

## IMPORTÂNCIA DE $K_m$ E $V_{max}$

Para a ciência e tecnologia de alimentos:

úteis para determinar a preparação de uma certa enzima a ser utilizada

## IMPORTÂNCIA DE $K_m$ E $V_{max}$

O slide seguinte é muito importante!

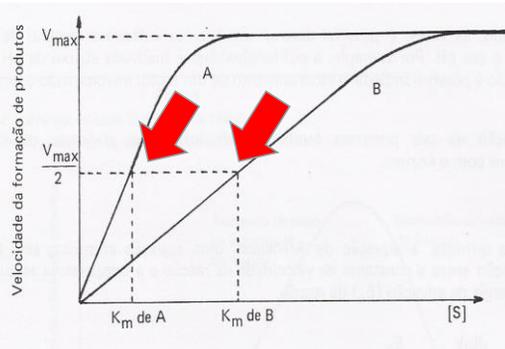
Podem cair na prova...  
(PS. É o de menos... O mais importante é fazê-lo conhecer a sua enzima!!!!!!)

## IMPORTÂNCIA DE $K_m$ e $V_{max}$

O tamanho de  $K_m$  pode nos dizer muito sobre uma determinada enzima, como:

- Um valor pequeno de  $K_m$  indica que a enzima necessita uma pequena quantidade de substrato para tornar-se saturada e assim a velocidade máxima é obtida com baixas concentrações de substrato  
(quanto  $< K_m = >$  afinidade da enzima pelo substrato)
- Um valor grande de  $K_m$  indica a necessidade de altas concentrações de substrato para atingir a velocidade máxima.
- Uma enzima que catalisa uma reação com dois ou mais substratos, pode ter um  $K_m$  diferente para cada um dos substratos.
- Quando uma enzima age em substratos diferentes, porém com característica estrutural comum, ela pode ter  $K_m$  diferentes para os substratos.

## ATIVIDADE DE DUAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS



## DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{max}$

- A determinação de  $K_m$  e  $V_{max}$  a partir de valores experimentais de  $[S]$  e  $V$  pode ser efetuada linearizando-se a equação de Michaelis-Menten.

– Hoje já existem recursos (softwares) para cálculos mais precisos...)

## LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

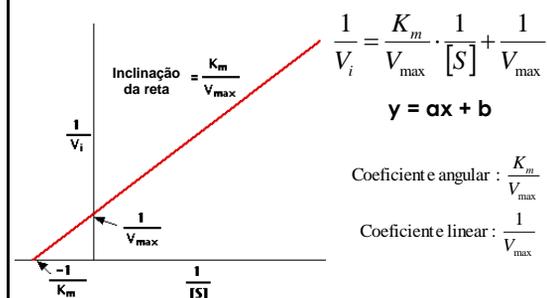
### LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN PELO MÉTODO DE LINEWEAVER-BURK

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

recíproca

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

### DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{max}$ PELA EQUAÇÃO DE LINEWEAVER-BURK



### LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN PELO MÉTODO DE HANES

Equação de Lineweaver-Burk

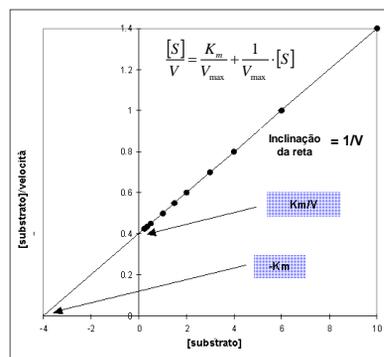
$$(\times[S]) \frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} (\times[S])$$

$$\frac{[S]}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot [S] \quad \text{Equação de Hanes}$$

Coefficient e angular :  $\frac{1}{V_{max}}$

Coefficient e linear :  $\frac{K_m}{V_{max}}$

### DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{max}$ PELO MÉTODO DE HANES



### LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN PELO MÉTODO DE EADIE-HOFSTEE

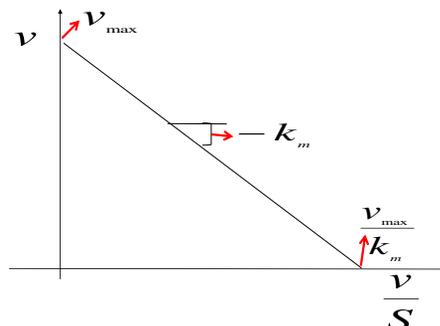
$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Multiplicando ambos os membros da equação de Lineweaver-Burk por  $V \cdot V_{\max}$  e rearranjando a equação, obtém-se a 3ª transformação linear da equação de Michaelis-Menten.

$$V = V_{\max} - K_m \cdot \frac{V}{S}$$

Equação de Eadie-Hofstee

### DETERMINAÇÃO DE $K_m$ E $V_{\max}$ PELO MÉTODO DE HOFSTEE



### LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN POR Representação gráfica linear directa (direct linear plot)

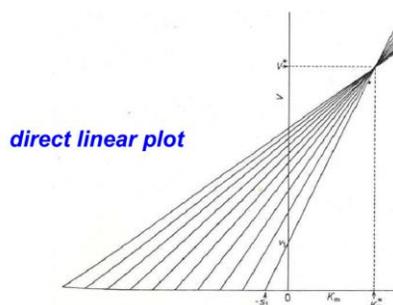
Trata-se de um método estatístico não-paramétrico, gráfico, introduzido por Eisenthal e Cornish-Bowden (1974).

Rearranjando a equação de Michaelis-Menten de modo a obter  $V_{\max}$  em função de  $K_m$ , chega-se à seguinte equação:

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

Então, se tratarmos  $V_{\max}$  e  $K_m$  como sendo variáveis e  $v$  e  $S$  como constantes, esta equação define uma linha reta, com derivada  $v/S$ , ordenada na origem  $v$  e abcissa na origem  $-S$ .

Assim, neste método, cada par de valores experimentais ( $S_i, v_i$ ) origina uma recta num gráfico que representa  $V_{\max}$  em função de  $K_m$ .



direct linear plot

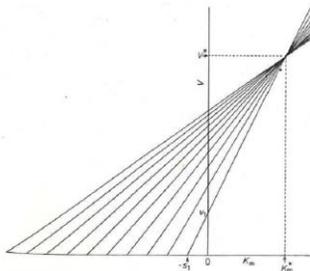
### MODELO TEÓRICO

- Exemplo do método para um primeiro caso de  $n = 2$  observações.
- Uma vez construídos os eixos coordenados ( $V_{\max}$  em função de  $K_m$ ) e obtidas as duas observações experimentais, ficamos com 2 pares de valores ( $S_i, v_i$ ), com  $i = 1, 2$ .
- Para o primeiro par de valores ( $S_1, v_1$ ) marcam-se os pontos  $K_m = -S_1$  no eixo dos  $K_m$  e  $V_{\max} = v_1$  no eixo dos  $V_{\max}$ ; em seguida, traça-se uma reta que passa por estes dois pontos, a qual é prolongada para o 1º quadrante.
- Para o par de valores ( $S_2, v_2$ ) há, portanto, uma infinidade de pares de valores  $V_{\max}$  e  $K_m$  que satisfazem a equação:
  - $V_{\max} = v_2 + v_2 / S_2 \cdot K_m$
- É conveniente notar que esta reta não é um gráfico, no mesmo sentido dos que se obtêm pelo 3 métodos anteriores; no "direct linear plot" cada reta corresponde a um só ponto experimental.

### MODELO TEÓRICO (cont.)

- Traçando do mesmo modo a reta que corresponde a uma segunda observação (com diferentes valores de  $S$  e  $v$ , isto é, com  $S_2 \neq S_1$  e  $v_2 \neq v_1$ ), verifica-se igualmente que há uma infinidade de valores de  $V_{\max}$  e  $K_m$  que satisfazem a nova equação:  $V_{\max} = v_2 + v_2 / S_2 \cdot K_m$ .
- Para o caso em que  $S_2 \neq S_1$  e  $v_2 \neq v_1$ , estas duas retas não definem os mesmos pares de valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$ , exceto no ponto de intersecção - este ponto define o único par de valores  $K_m$  e  $V_{\max}$  que satisfaz ambas as observações (excetuam-se os casos em que  $v_1 / S_1 = v_2 / S_2$ , isto é, casos em que as duas retas são paralelas, por não haver ponto de intersecção entre elas).

## MODELO TEÓRICO (cont.)



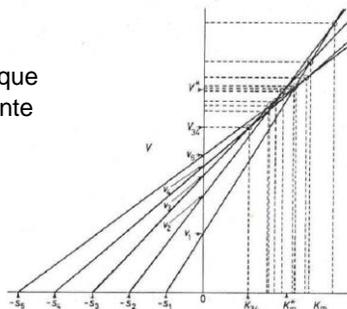
- "Direct linear plot" - Cada linha representa uma observação e é traçada a partir da abscisa na origem,  $K_m = -S_i$  e da ordenada na origem  $V_{m\acute{a}x} = v_i$ . As coordenadas do ponto de intersecção dão os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  que satisfazem às observações.

## MODELO REAL

- Na prática, como as observações estão sujeitas a erro, não há um único ponto, comum à intersecção de todas as retas.
- Neste caso, cada intersecção fornece uma estimativa inicial de  $K_m$  e de  $V_{m\acute{a}x}$ . Estas estimativas são marcadas em ambos os eixos coordenados.
- As melhores estimativas para  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  serão as medianas das respectivas estimativas iniciais.

## MODELO REAL

- O gráfico que normalmente se obtém:



## MODELO REAL

- As melhores estimativas dos parâmetros  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  são dadas por:
  - $K_m^* =$  mediana dos valores de  $K_m$   $i,j$
  - $V_{m\acute{a}x}^* =$  mediana dos valores de  $V_{m\acute{a}x}$   $i,j$
- Este método foi intitulado de "direct linear plot" porque representa cada observação por uma reta e porque fornece diretamente os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ , isto é, a representação gráfica é linear e a sua leitura direta.

**LEMBRANDO!!!**

## Expressão da atividade enzimática

- Unidades internacionais (UI) – *Enzyme Commission*

**Quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu$  mol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, T, [S], etc.), especificadas para cada caso.**

– Atividade da enzima  
**U/mL**

**Importante!**

– Atividade específica  
Número de Unidades de Enzima por mg de proteína presente na preparação da solução enzimática  
**U/mg**

## Referências

- BORZANI, W. Cinética de Reações Enzimáticas. In: WALTER, Borzani et al. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 197-216. (Volume 1).
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Savier, 2006. p. 190-235
- GOMES, E, et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 1, 136-145, 2007.
- CARVALHO et al. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 7, 1607-1611, 2010.
- OLIVEIRA, A. P.; FARIA, R. B. Ordens não inteiras em cinética química. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1412-1415, 2010.
- SIQUEIRA, et al. Determinação do Km e V Max: revisão e uma nova proposta. **Ciência em Movimento**, Ano XIII, Nº 27, 2011.