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

ZEA – 0561 – BIOQUÍMICA DE ALIMENTOS

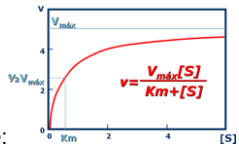
Como medir a velocidade da reação em condições experimentais conhecidas?

Profa. Marta Mitsui Kushida

2019

Efeito da concentração do substrato na cinética enzimática

- Parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas e os fatores que a influenciam.



- É estudada avaliando-se:
  - a **quantidade de produto formado** ou
  - a **quantidade de substrato consumido** por unidade de tempo de reação.

Cinética

- Tomando o exemplo simples da conversão irreversível de uma substância A em B (A → B), a velocidade da reação (V), será:

$$V = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad V = \frac{-d[A]}{dt}$$

V = moles por litro por minuto (mol/L.min)

[B] e [A] = concentrações molares de B e de A.

Atividade enzimática

- As medidas de concentração de soluções, expressas em unidades de massa por unidades de volume, de uso corrente na Química, **não têm aplicação para soluções enzimáticas**, já que para estas o que importa não é a massa, mas a **atividade**.
- Assim, a dosagem de enzimas é sempre feita pela medida de sua atividade, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa.

Atividade enzimática

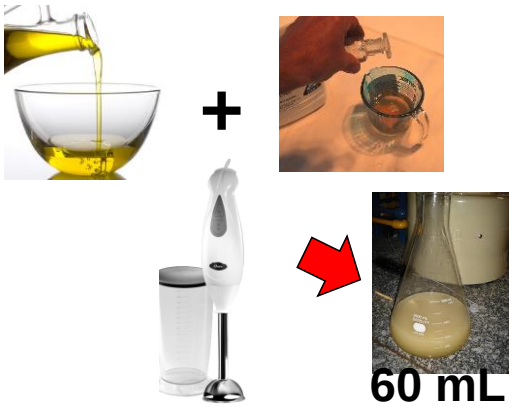
- A atividade enzimática é medida e expressa em Unidades Internacionais.
- Uma Unidade Internacional (UI) é a quantidade de enzima capaz de formar 1µmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura, etc.), especificadas para cada caso.

Procedimento experimental

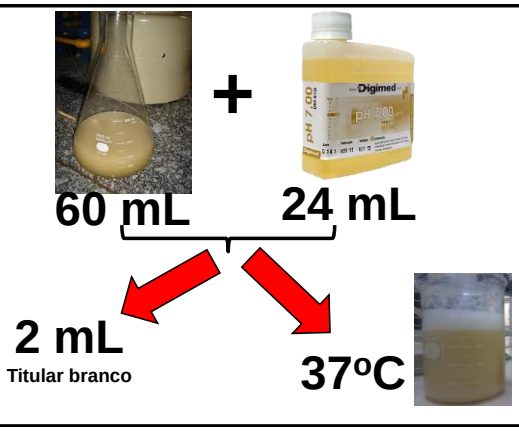
- Adicionar os seguintes volumes de azeite de oliva e solução de goma arábica 7% em um béquer de 500mL:

	Azeite (mL)	Solução de goma arábica (mL)	(v/v) de substrato
A	5,0	95	**(5%)**
B	7,5	92,5	**(7,5%)**
C	10,0	90,0	**(10%)**
D	12,5	87,5	**(12,5%)**
E	15,0	85,0	**(15%)**

- Homogeneizar a mistura durante 15 segundos utilizando um mixer;
- Transferir 60mL da mistura para um Erlenmeyer.



- Adicionar 24mL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) aos 60mL da mistura homogeneizada no item anterior;
- Titular o "**Branco**" antes da adição da enzima lipase, conforme procedimento descrito em "titulação do branco".
- Manter a mistura homogeneizada (meio reacional) em banho Maria a 37ºC durante a execução de todo o experimento.
- Deixar o meio reacional em banho Maria durante 5 minutos antes da adição da lipase.

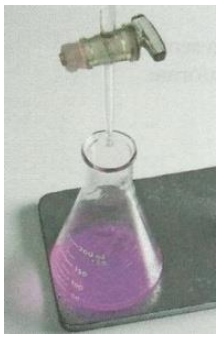


Titulação do "branco" (antes da adição da lipase).

- 1. Retirar 2mL da mistura de azeite, goma arábica e tampão.
- 2. Adicionar a alíquota em um Erlenmeyer contendo 10mL de solução álcool etílico:acetona (1:1) e 4 gotas de fenolftaleína (1%).
- 3. Titular com solução de NaOH 0,02M e anotar o volume gasto (tempo 0);

- Adicionar a 16 mL de solução de lipase ao meio reacional (contendo azeite + goma arábica + tampão preparada anteriormente).
- Iniciar imediatamente a cronometragem (Não interrompê-la até o término do experimento).
- Retirar alíquotas de 2mL do meio reacional de acordo com os tempos indicados no Quadro 1.
- Adicionar a alíquota em um Erlenmeyer contendo 10mL de solução álcool etílico:acetona (1:1), (para paralisar a reação enzimática) e 4 gotas de fenolftaleína (1%).

- Titular utilizando uma solução de NaOH 0,02M até a primeira mudança de cor persistente (anotar o volume gasto).
- Prosseguir com a titulação, para cada tempo de reação, até não haver mais variação no volume de NaOH consumido em quatro titulações consecutivas.

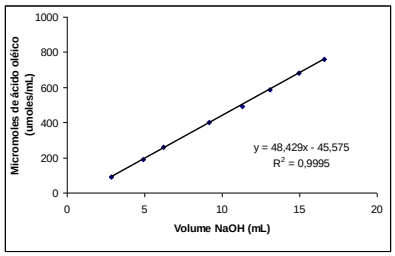


Volume de NaOH 0,02M gasto na titulação em função do tempo.

Tempo (min)	V_{NaOH} (mL)	$V_{NaOH} - V_{NaOH(branco)}$ (mL)
0 ("branco")		
2		
4		
6		
8		
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		
50		
60		

- V_{NaOH} = Volume de NaOH gasto na titulação;
- $V_{NaOH(branco)}$ = volume de NaOH gasto na titulação do branco

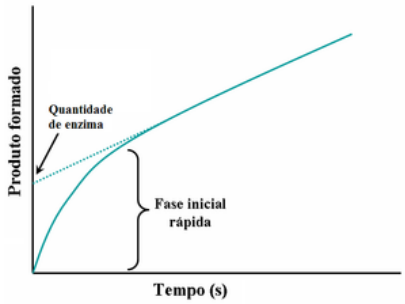
curva padrão do ácido oleico



- y = micromoles de ácido oleico formado
- x = volume de NaOH 0,02M gasto na titulação (mL)

Construir as curvas de Produto x Tempo

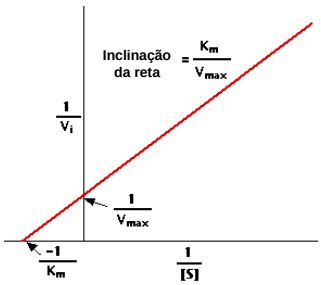
Tempo (min)	[ac. oleico] µmoles/mL				
	5%	7,5%	10%	12,5%	15%
2					
4					
6					
8					
10					
15					
20					
25					
30					
35					
40					
45					
50					
60					



Construir a curva de Velocidade inicial de reação (V0) x [S], onde a velocidade é a taxa de variação de formação do produto.

- Esta curva será obtida a partir dos dados das curvas anteriores.
- Verificar se os resultados experimentais podem ser ajustados ao modelo de Michaelis-Mentem.
- Calcular a constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade inicial máxima (V_{max}) da reação utilizando as correlações de **Hanes, Lineweaver-Burk e Hofst**ee, apresentando as respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2).

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



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

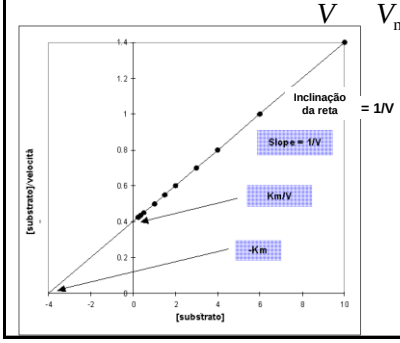
y = ax + b

Coeficiente angular : $\frac{K_m}{V_{max}}$

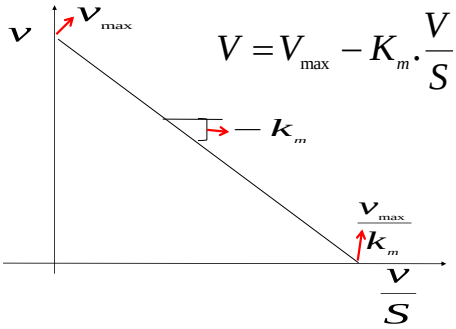
Coeficiente linear : $\frac{1}{V_{max}}$

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

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



DETERMINAÇÃO DE K_m E V_{max} PELO MÉTODO DE HOFSTEE



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

- Explique a função de cada um dos reagentes utilizados no experimento e procedimentos:
  - azeite de oliva,
  - goma arábica,
  - tampão fosfato,
  - “branco”,
  - Banho Maria a 37ºC,
  - Álcool etílico:acetona (1:1),
  - NaOH 0,02 M.