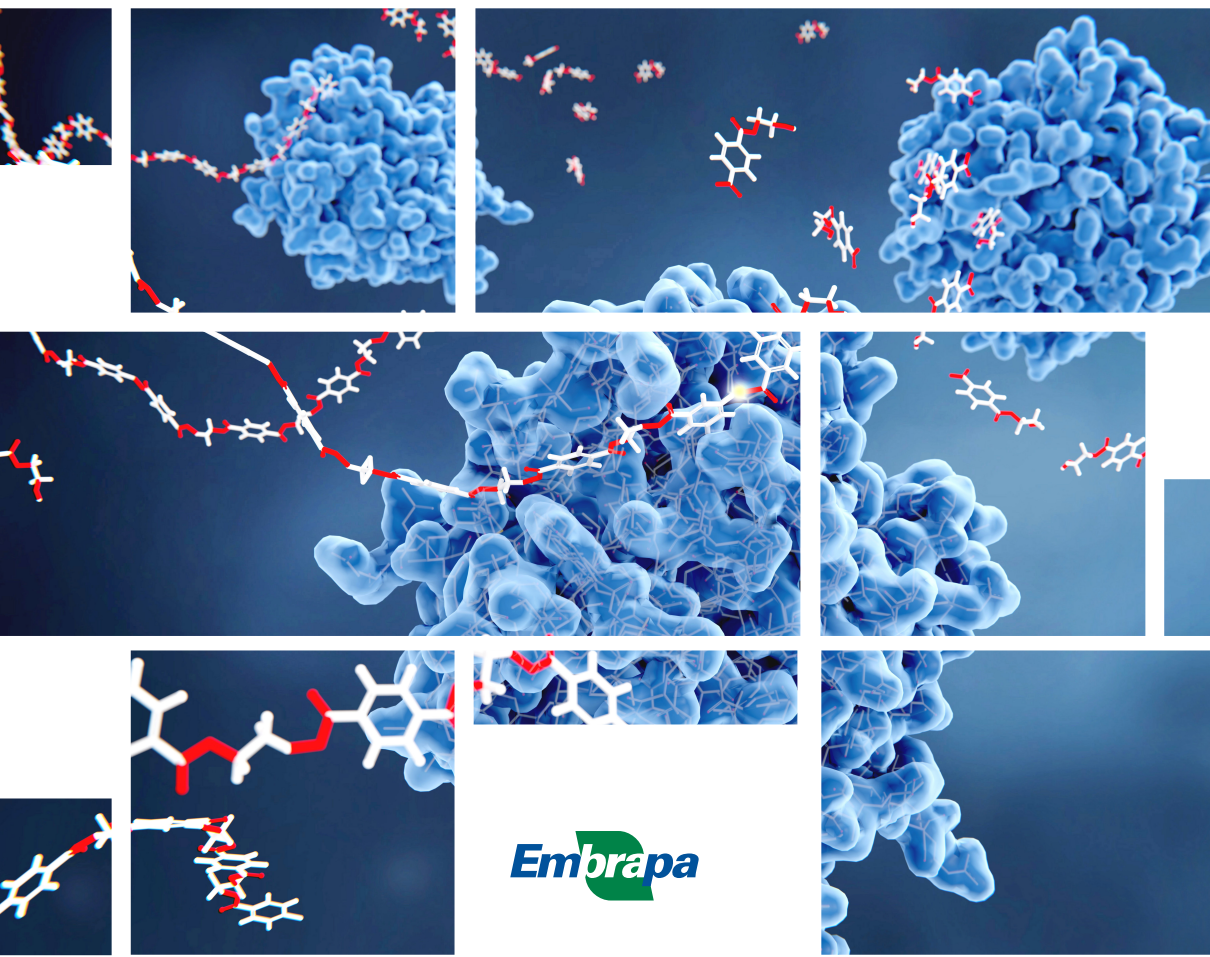


Guia prático para caracterização de enzimas



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroenergia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

DOCUMENTOS 35

Guia prático para caracterização de enzimas

*Thályta Fraga Pacheco
Thais Demarchi Mendes*

***Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2021***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia
Parque Estação Biológica (PqEB), s/nº
Ed. Embrapa Agroenergia
Caixa Postal 40315
CEP 70770-901, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-1581
Fax: +55 (61) 3448-1589
www.embrapa.br/agroenergia
www.embrapa.br/fale-conosco/sac/

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroenergia

Presidente
Patrícia Verardi Abdelnur

Secretária-Executiva
Lorena Costa Garcia Calsing

Membros
Adilson Kenji Kobayashi
André Pereira Leão
Dasciana de Sousa Rodrigues
Emerson Léio Schultz
Felipe Brandão de Paiva Carvalho
Thais Fabiana Chan Salum
Wesley Gabriel de Oliveira Leal

Supervisão editorial e revisão de texto
Luciane Chedid Melo Borges

Normalização bibliográfica
Iara Del Fiaco Rocha

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Maria Goreti Braga dos Santos

Foto da capa
Selvanegra/iStock

1ª edição
Publicação digital (2021)

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa, Secretaria-Geral

Pacheco, Thályta Fraga.

Guia prático para caracterização de enzimas / Thályta Fraga Pacheco, Thais Demarchi Mendes. – Brasília, DF : Embrapa Agroenergia, 2021.

PDF (58 p.). – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177-4439 ; 35)

1. Atividade enzimática. 2. Propriedade físico-química. I. Mendes, Thais Demarchi. II. Embrapa Agroenergia. III. Série.

CDD 572.7

Autores

Thályta Fraga Pacheco

Engenheira química, mestre em Engenharia Química, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

Tháís Demarchi Mendes

Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, Brasília, DF.

Apresentação

A cinética enzimática tem o objetivo de analisar quantitativamente o efeito de fatores que podem influenciar, positiva ou negativamente, a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima. A implementação industrial de um processo enzimático depende do conhecimento das condições de atuação e do efeito das características do meio sobre a enzima, ou seja, requer um estudo da cinética e termodinâmica enzimática.

Neste guia serão abordados os temas mais básicos que integram o estudo da cinética e termodinâmica de reações enzimáticas e, partindo de estudo hipotético, será demonstrado como planejar os experimentos e obter as informações requeridas de forma prática. Estudos mais detalhados dos processos enzimáticos podem ser encontrados nas literaturas recomendadas no fim deste documento.

Alexandre Alonso Alves
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

Sumário

Seção 1: Aspectos teóricos	9
Definição e classificação	9
Cinética das reações enzimáticas	11
Medida de velocidade da reação e atividade enzimática	11
Efeito da concentração de substrato	12
Presença de inibidores	16
Inibição competitiva	16
Inibição não competitiva	19
Inibição pelo substrato	21
Turnover (kcat)	22
Efeito da temperatura	23
Efeito do pH	24
Efeito de íons metálicos	24
Desativação	25
Constante de desativação e tempo de meia vida	25
Energia de ativação	26
Seção 2: Aspectos práticos	27
Estudo de caso: Seleção da enzima β -glicosidase mais apropriada para ser adicionada a coquetel celulolítico	27
Determinação da velocidade da reação catalisada e da atividade enzimática	29

Exemplo 1 (enzima 6)	29
Efeito da concentração de substrato	30
Planejando o experimento	30
Exemplo 2 (enzima 6)	30
Efeito de inibidores	33
Planejando o experimento	33
Exemplo 3 (enzima 4): inibição competitiva	33
Exemplo 4 (enzima 1): inibição não competitiva	37
Exemplo 5 (enzima 3): inibição pelo substrato	40
Efeito da temperatura	41
Planejando o experimento	41
Exemplo 6 (enzima 2)	42
Efeito do pH	45
Planejando o experimento	45
Exemplo 7 (enzima 6)	45
Estabilidade térmica	47
Planejando o experimento	47
Exemplo (enzima 6)	47
Referência	52
Literatura recomendada	52
Apêndice 1 – Regressão não linear	53
Utilizando o Statistica	54
Utilizando a função Solver, do Excel	57

Seção 1: Aspectos teóricos

Definição e classificação

Enzimas são proteínas (ou RNA) que possuem propriedades catalisadoras de reações químicas, as quais, na sua ausência, dificilmente aconteceriam. São categorizadas, de acordo com o tipo de reação catalisada, em seis classes, mostradas na Tabela 1. Cada classe é dividida em subclasses e um código (4 números) é dado a cada enzima, como, por exemplo, o código E.C 3.2.1.21 atribuído à β -glicosidase, no qual o primeiro número indica a classe principal hidrolases, o segundo indica a subclasse glicosilases, o terceiro número indica que a enzima hidrolisa compostos O- ou S-glicosil e o último indica a ação na hidrólise de resíduos terminais de β -D-glicosil não redutores, com liberação de β -D-glicose. Na base de dados BRENDA¹, estão disponíveis a classificação das enzimas, a estrutura, a sequência de peptídeos, o tipo de reação catalisada, os substratos, os produtos, os parâmetros cinéticos, entre outras informações.

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).

Classe	Nome	Reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons híbridos ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos funcionais (grupos aldeído, acila, glicosil, fosfato).
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para moléculas de água). Atuam sobre ligações éster, glicosídicas, peptídicas e C-N.
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula, produzindo formas isoméricas.
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou outros cofatores.

¹ Disponível em: <https://www.brenda-enzymes.org>.

Como pode ser observado na Figura 1, as enzimas atuam diminuindo a energia de ativação necessária para que um substrato seja convertido em produto. Dessa forma, as enzimas aumentam a velocidade das reações químicas, que, na ausência de um catalisador, seriam extremamente lentas.

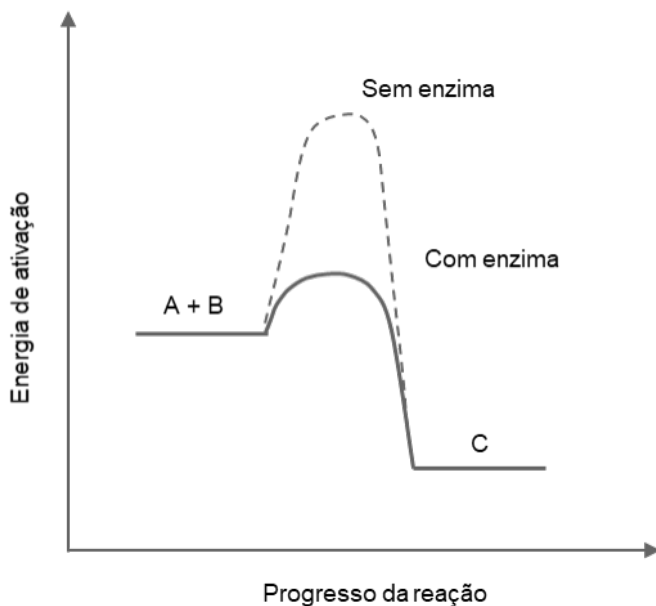


Figura 1. Representação da energia de ativação de reações catalisadas e não catalisadas.

O substrato e a enzima reagem reversivelmente entre si, formando um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato. Esse complexo formado se decompõe formando o produto da reação e a enzima é regenerada. Portanto, a reação catalisada por uma enzima pode ser representada, simplificadamente, como:



Em que E é a enzima, S é o substrato, P é o produto e ES o complexo enzima-substrato; k_1 : constante de velocidade de formação do complexo; k_{-1} : constante de velocidade de dissociação do complexo ES; k_2 : constante de velocidade de decomposição do complexo ES, formando o produto.

Cinética das reações enzimáticas

Medida de velocidade da reação e atividade enzimática

A efetividade de ação de uma enzima é dada pela medida da velocidade da reação que a enzima catalisa, a qual é determinada pela quantidade de produto gerado, ou de substrato consumido, por unidade de tempo, como representado na equação abaixo:

$$v = \frac{dP}{dt} = -\frac{dS}{dt} \quad (1)$$

Para determinação da velocidade da reação catalisada por uma enzima, e calcular a atividade enzimática, a técnica experimental mais usual da cinética enzimática é o método das velocidades iniciais, que assume a cinética de estado estacionário. Dessa forma, a taxa medida de consumo do substrato, ou formação de produto, deve ser constante em toda faixa de tempo do ensaio para se medir a verdadeira taxa inicial. Para isto, é preciso garantir que a formação de produto em função do tempo e a velocidade da reação em função da concentração de enzima sejam lineares. Medidas de velocidade inicial de uma reação enzimática são primordiais para o entendimento do mecanismo de ação da enzima.

Por definição da International Union of Biochemistry (IUPAC), uma unidade de atividade enzimática (1 U) é a quantidade de enzima que catalisa a conversão de um μmol do substrato por minuto, nas condições do ensaio. Então, para se determinar a atividade da enzima, deve-se normalizar a velocidade da reação catalisada (em $\mu\text{mol}/\text{min}$) pela quantidade de enzima utilizada na reação catalítica (por exemplo, mg, mL, mol).

Em resumo, para a determinação da velocidade de reação, alguns requisitos devem ser observados:

- O ensaio deve ser feito com altas concentrações de substrato, para garantir que a velocidade máxima (conceito que será explicado a seguir) esteja sendo avaliada e para impedir que pequenas variações na concentração de substrato afetem a medida da atividade. Na prática, são recomendadas conversões de aproximadamente 5% do substrato durante o tempo de realização do ensaio. Assim, a concentração de substrato permanece em excesso no meio reacional durante todo o tempo de reação.
- A concentração de produto formada, ao término do ensaio, deve ser baixa o suficiente para não ter influência sobre a velocidade.
- As condições de pH e temperatura devem ser favoráveis à reação.
- Os ensaios devem ser reprodutíveis.

A cinética da reação enzimática é afetada por mudanças nas condições da reação, como, por exemplo, concentração de substrato, pH, temperatura, presença de inibidores ou ativadores, entre outras. Esse conteúdo será apresentado nos próximos tópicos.

Efeito da concentração de substrato

O conjunto de dados mais importante e informativo é obtido ao estudar a velocidade da reação em função da concentração de substrato. Para muitas enzimas, a velocidade inicial varia hiperbolicamente com a concentração de substrato, para uma mesma concentração de enzima. O modelo cinético (Equação 2) proposto por Michaelis e Menten (1913) é um dos mais utilizados para descrever esse efeito. Se os ensaios realizados se diferem apenas pela concentração inicial do substrato, a velocidade da reação será função crescente da concentração de substrato até um determinado valor, quando a enzima se torna saturada pelo substrato e a velocidade se mantém aproximadamente constante quando maiores concentrações de substrato estão disponíveis (Figura 2).

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (2)$$

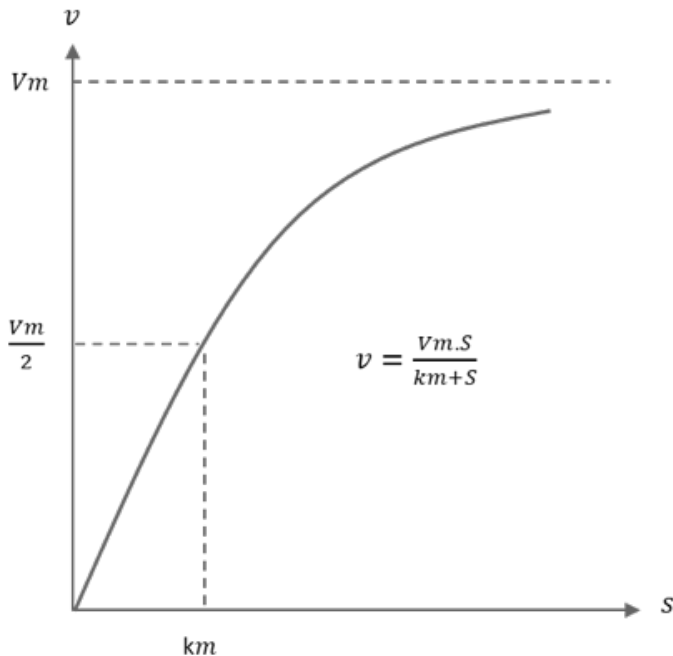


Figura 2. Representação da equação de Michaelis-Menten.

V_m é a máxima velocidade inicial, teoricamente atingida quando a enzima está saturada pela alta concentração de substrato, e representa o valor do eixo y no qual a curva atinge o platô. k_m , denominada constante de Michaelis, é a concentração de substrato na qual é atingida uma velocidade igual à metade da máxima e indica a afinidade (tendência de se ligar) de uma enzima com seu substrato. Quando uma enzima atuar sobre mais de um substrato, k_m permite identificar o substrato pelo qual a enzima tem maior afinidade. Quanto menor for o valor de k_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. Se uma enzima tem um baixo valor de k_m , ela atinge

sua velocidade máxima inicial (V_m) em baixas concentrações de substrato. Para a maioria das enzimas, k_m varia entre 10^{-1} e 10^{-7} M.

Observando o gráfico da Figura 2 e a Equação 2, pode-se perceber que, se a concentração de substrato for muito menor que k_m , ou seja, $k_m + S \approx k_m$, então $v = (V_m/k_m) \cdot S$, e a velocidade de reação se comporta como de primeira ordem em função da concentração de substrato, ou seja, a velocidade é linearmente proporcional ao aumento da concentração de substrato. Mas, se a concentração de substrato for muito maior que k_m , então $k_m + S \approx S$ e $v = V_m$, a velocidade de reação se comporta como de ordem zero, ou seja, a velocidade não é modificada com o aumento da concentração de substrato.

A determinação dos parâmetros k_m e V_m a partir de valores experimentais de velocidade inicial em função de diferentes concentrações de substrato pode ser feita por regressão não linear, ajustando os dados experimentais à equação proposta (Equação 2). Esta opção deve ser preferida, em detrimento às técnicas de linearização, pois evita imprecisões por aproximações. A regressão não linear para determinação dos parâmetros da equação pode ser feita em diversos softwares licenciados, como Statistica, Origin, Excel (utilizando o suplemento Solver) ou em softwares livres, como R, SciLab e DynaFit. O Apêndice 1 apresenta uma descrição, passo a passo, de como estimar parâmetros de uma equação por meio de um ajuste não linear dos dados utilizando o Statistica e o suplemento Solver do Excel.

É também possível aplicar transformações para linearizar a equação de Michaelis-Menten e ajustar os dados experimentais a uma reta. Entre as opções de linearização, Lineweaver-Burk, também conhecida como duplo recíproco, é a mais popular (porém não a mais recomendada), na qual $1/v$ (eixo y) é plotado contra $1/S$ (eixo x). Ajustando-se esses dados a uma reta, $y = a + b \cdot x$, o coeficiente linear obtido seria $1/V_m$ (correspondente ao termo a) e o coeficiente angular, k_m/V_m (correspondente ao termo b) (Figura 3).

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S} \quad (3)$$

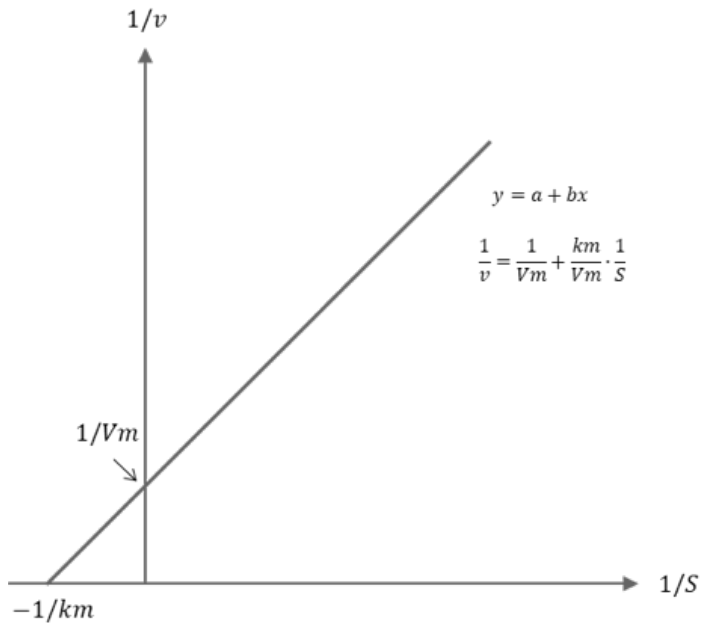


Figura 3. Representação da linearização (Lineweaver-Burk) da equação de Michaelis-Menten.

Apesar de a equação de Lineweaver-Burk ser uma variação da equação de Michaelis-Menten, ela não fornece a mesma precisão no ajuste dos dados experimentais. Isso ocorre porque estão associados erros experimentais às medidas de velocidade. Ao calcular o inverso da velocidade inicial ($1/v$), o método tende a dar ênfase aos menores valores de v , que são os que, em geral, apresentam os maiores erros experimentais, e tende a condensar os pontos de alta concentração em uma pequena região. Além disso, $1/S$ e $1/v$ nunca serão iguais a zero. Devido aos recursos computacionais disponíveis atualmente, a determinação de parâmetros com métodos linearizados tem entrado em desuso. A aplicação desse método de linearização tem se restringido ao entendimento dos mecanismos cinéticos de inibição (mostrados a seguir).

Qualquer que seja o método utilizado, uma boa determinação dos parâmetros cinéticos depende de uma cuidadosa medida dos valores experimentais.

Nota: Apesar da ampla aplicabilidade do modelo de Michaelis-Menten, ele não é capaz de descrever as propriedades cinéticas de todas as enzimas. Enzimas alostéricas, que apresentam múltiplas subunidades e múltiplos sítios ativos, por exemplo, não obedecem à cinética de Michaelis-Menten. Em geral, elas apresentam perfis sigmoidais de velocidade de reação em função da concentração de substrato. Reações que ocorrem na presença de altas concentrações de substrato e produto ou em condições adversas de reação, em geral, utilizam modelos cinéticos mais elaborados, nos quais são inseridos termos de correção ao modelo inicialmente proposto por Michaelis-Menten.

Presença de inibidores

A presença de um inibidor da reação enzimática causa a diminuição da velocidade de reação. Essa inibição pode ser irreversível ou reversível e pode ser causada pelo substrato, produto ou outras substâncias presentes no meio reacional.

Os principais tipos de inibições reversíveis, objeto de estudo deste tópico, são inibição competitiva, inibição não competitiva e inibição pelo substrato.

Inibição competitiva

Um inibidor é competitivo quando compete com o substrato pela ocupação do sítio ativo da enzima. Nesse caso, em geral, o inibidor tem semelhança estrutural com o substrato, mas não é uma regra. A representação gráfica da cinética enzimática na presença de um inibidor competitivo está apresentada na Figura 4.

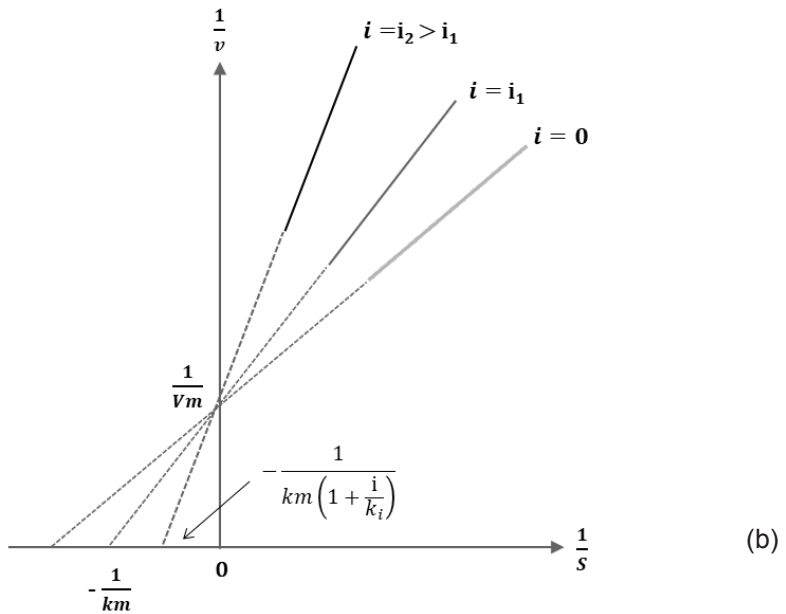
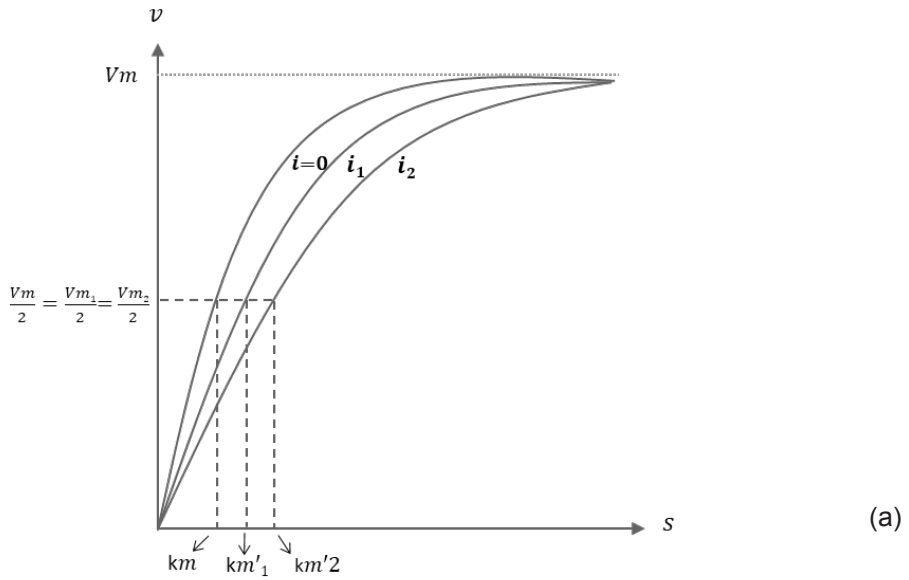


Figura 4. Representação da equação de Michaelis-Menten (A) e da linearização de Lineweaver-Burk (B) para o caso de inibição competitiva. $i=0$: ausência de inibidor; i_1 e i_2 : concentrações do inibidor ($i_2 > i_1$)

Considerando-se a presença de um inibidor competindo com o substrato pela enzima, a velocidade de reação (v_i) pode ser dada por:

$$v_i = \frac{V_m \cdot S}{S + k_m \cdot \left(1 + \frac{i}{k_i}\right)} = \frac{V_m \cdot S}{S + k_m'} \quad (4)$$

Na qual i corresponde à molaridade inicial do inibidor, k_i à constante de inibição ou constante de dissociação do inibidor e k_m' ou k_m aparente da reação na presença do inibidor.

$$k_m' = k_m \left(1 + \frac{i}{k_i}\right) = k_m + \frac{k_m}{k_i} \cdot i \quad (5)$$

k_m' pode ser definido como:

Pela característica das equações 4 e 5, pode-se observar que k_m aparente (k_m') será sempre maior que k_m (sem presença de inibidor) e que, quanto menor o valor de k_i , maior será o valor da razão i/k_i , que torna maior o valor de k_m' e maior o efeito do inibidor sobre a velocidade de reação. k_i nesse caso pode ser interpretado como a concentração do inibidor que dobra o valor de k_m .

Portanto, da relação entre as velocidades na ausência e presença de inibidor (equações 2 e 4, respectivamente), tem-se:

$$\frac{v}{v_i} = 1 + \frac{K_m}{K_i \cdot (K_m + S)} \cdot i \quad (6)$$

Ou seja, para altas concentrações de substrato ($S \rightarrow \infty$), $v/v_i \rightarrow 1$ e a influência do inibidor pode se tornar desprezível.

O percentual de inibição dependerá das concentrações relativas de substrato e inibidor competitivo e da afinidade diferencial da enzima pelo substrato e pelo inibidor.

Utilizando-se modelo linearizado (Figura 4b) para facilitar o entendimento, pode-se observar que modelos sem inibição e com inibição competitiva variam em seu valor de k_m e apresentam a mesma velocidade máxima de reação (V_m). A presença do inibidor altera a afinidade da enzima pelo substrato, mas não altera a velocidade máxima. A inclinação da reta será maior quanto maior for o efeito do inibidor.

Inibição não competitiva

Na inibição não competitiva, os inibidores têm mecanismos de ação diversos, não apresentam semelhança estrutural com o substrato e não competem pelo sítio ativo. Os inibidores se ligam às enzimas e estas se tornam inativas enquanto permanecerem ligadas ao inibidor. A representação gráfica da cinética enzimática na presença de um inibidor não competitivo está apresentada na Figura 5. A velocidade de reação, em função da concentração de substrato e de inibidor é dada por:

Na qual i corresponde à molaridade inicial do inibidor e k_i à constante de inibição ou constante de dissociação do inibidor.

$$v_i = \frac{V_m \cdot S}{\left(1 + \frac{i}{k_i}\right) \cdot k_m + S} = \frac{V_m' \cdot S}{k_m + S} \quad (7)$$

V_m' , denominada V_m aparente, pode ser definida como:

$$V_m' = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{i}{k_i}\right)} \quad (8)$$

k_i , nesse caso, determina a concentração de inibidor necessária para reduzir a velocidade de reação à metade da velocidade máxima (em baixa concentração de substrato).

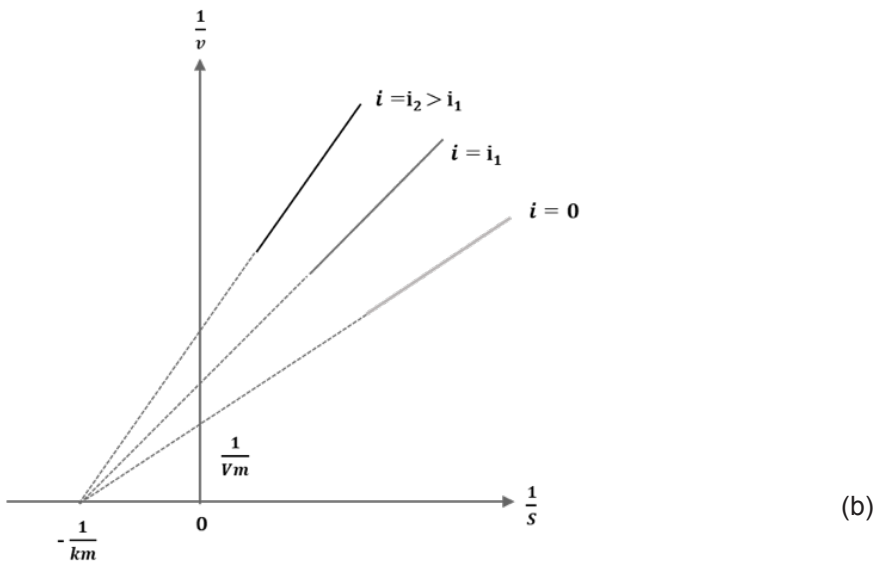
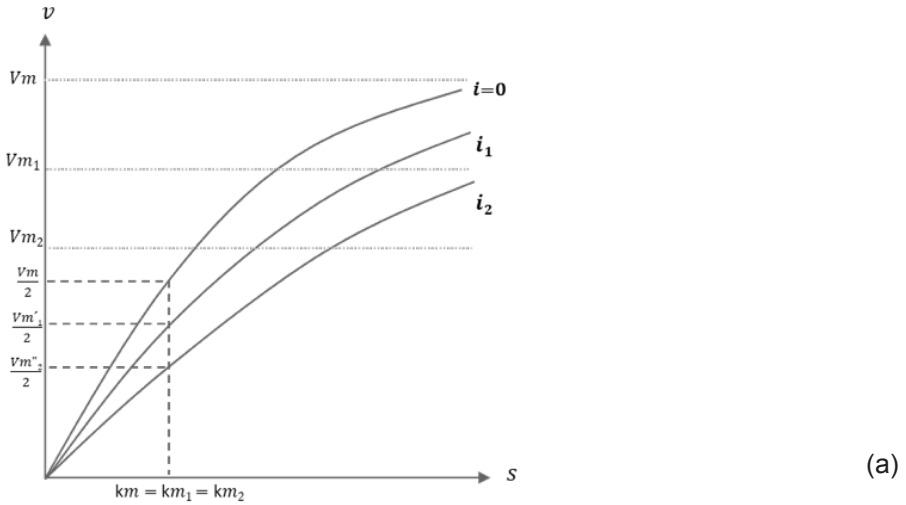


Figura 5. Representação da equação de Michalis-Menten (a) e da linearização de Lineweaver-Burk (b) para o caso de inibição não competitiva. $i=0$: ausência de inibidor; i_1 e i_2 : concentrações do inibidor ($i_2 > i_1$)

Com base nas equações 7 e 8 e na Figura 5, é possível observar que a inibição não competitiva diminui o valor da velocidade máxima aparente, devido à diminuição da concentração de enzimas ativas, mas o valor de k_m é mantido constante. A inclinação da reta será maior quanto mais pronunciado for o efeito do inibidor. Nesse caso, ao contrário da inibição competitiva, um aumento da concentração de substrato não reverte a inibição.

Inibição pelo substrato

Um excesso de substrato no meio reacional pode manter a velocidade de reação constante, como descreve o modelo de Michaelis-Menten (linha pontilhada da Figura 6), mas pode também, em alguns casos, provocar inibição de sua própria catálise e resultar numa diminuição da velocidade da reação em função do aumento da concentração de substrato (linha contínua da Figura 6).

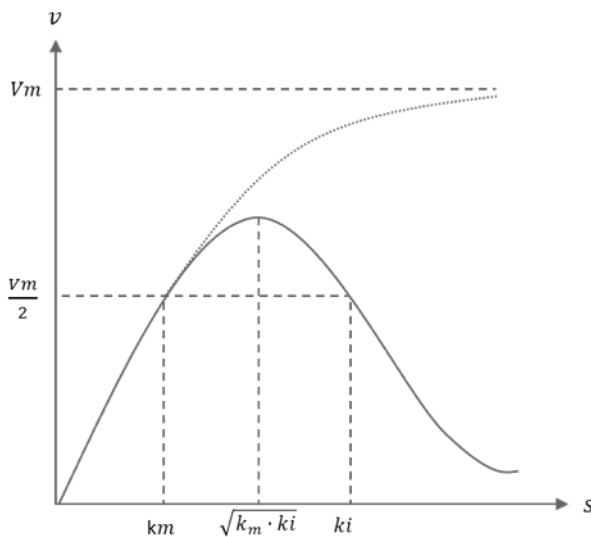


Figura 6. Representação da inibição da enzima pelo substrato.

Nesse caso, a velocidade como função da concentração de substrato é dada por:

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (9)$$

No ponto de máximo da função, em que $dv/dS=0$, pode-se calcular a máxima concentração de substrato que não causa um efeito inibitório da reação, dada por:

$$S_{max} = \sqrt{k_m \cdot k_i} \quad (10)$$

Turnover (kcat)

O turnover, também conhecido como número de renovação, mede o número de moléculas de substrato convertidas em produto por uma molécula de enzima por unidade de tempo, considerando que a enzima está totalmente saturada com substrato. É calculado pela relação entre a velocidade máxima de reação e a quantidade total de sítios catalíticos de enzima do ensaio (E_t), em mols. Se a enzima tem múltiplas subunidades, E_t pode ser maior que a concentração de enzima, caso não tenha, E_t corresponderá à concentração da enzima. Quanto maior o valor de k_{cat} , mais rapidamente o complexo enzima-substrato avança para a formação de produto, com conseqüente disponibilização do sítio ativo para nova reação. Seu valor para a maioria das enzimas varia entre 1 e 10^7 s^{-1} e é definido como:

$$k_{cat} = \frac{V_m}{E_t} \quad (11)$$

Como essa constante é válida para concentrações saturantes de substrato, nem sempre representa a melhor forma de comparação de eficiência catalítica.

Uma constante alternativa, conhecida como constante de especificidade, é dada pela relação k_{cat}/k_m . Esta é uma importante medida da eficiência catalítica da enzima e representa a taxa da reação em concentrações desprezíveis de substrato. Os valores de k_{cat}/k_m determinados para diferentes substratos e uma mesma enzima, ou para duas enzimas e um mesmo substrato, permite a comparação da efetividade de enzimas em diferentes condições operacionais. O limite superior dessa relação é de aproximadamente $10^8 - 10^9/(s.M)$, determinado pelo encontro controlado por difusão de uma enzima e seu substrato. Enzimas que apresentam a relação k_{cat}/k_m próxima desse limite superior atingiram a “perfeição catalítica”, ou seja, sua velocidade catalítica é restringida apenas pela taxa de encontro da enzima e seu substrato na solução.

Entretanto, utilizar a relação k_{cat}/k_m como medida de desempenho ou critério de seleção de uma enzima, sem considerar outros fatores, pode levar a uma seleção errônea do biocatalisador, principalmente porque essa relação negligencia a contribuição de importantes fatores, como concentração de substrato e possíveis inibições.

Efeito da temperatura

A atividade catalítica das enzimas é fortemente influenciada pela temperatura. A influência da temperatura na constante de velocidade da reação, k , obedece à lei de Arrhenius:

$$k = k_0 \cdot e^{-E_a/RT} \quad (12)$$

Na qual E_a é a energia de ativação (kJ/mol), R a constante dos gases ideais (8,314 J/mol.K) e T é a temperatura absoluta (K). A energia de ativação é a energia mínima necessária que os reagentes devem possuir para que a reação ocorra.

Nas reações catalisadas por enzimas, o aumento da temperatura, até certo limite, leva ao aumento da velocidade de reação. Entretanto, a elevação da temperatura também aumenta a possibilidade de desativação térmica ou desnaturação da enzima. A temperatura exerce, então, dois efeitos antagônicos sobre a atividade enzimática. Por um lado, aumenta a velocidade catalítica, por outro, após certa temperatura, a velocidade da reação começa a decair, devido à inativação das moléculas e consequente diminuição da concentração de enzimas ativas no meio reacional. Exemplos de representações gráficas do efeito da temperatura sobre a velocidade das reações catalisadas por enzimas podem ser observados nas Figuras 11 e 12.

Efeito do pH

Em geral, as enzimas apresentam máxima atividade em um valor de pH específico, ocorrendo uma diminuição da velocidade de reação com o distanciamento desse valor ótimo. Essa influência é exercida sobre os grupos dissociáveis de vários aminoácidos que, em diferentes valores de pH, podem se apresentar protonados ou desprotonados. Existe um pH específico que favorece o arranjo dos grupos protonados e desprotonados e altera a conformação da enzima de forma a favorecer seu desempenho catalítico. Um exemplo de representação gráfica do efeito do pH sobre a velocidade das reações catalisadas por enzimas pode ser observado na Figura 13.

Efeito de íons metálicos

Muitas enzimas, para desempenharem sua função catalítica, necessitam da associação com íons metálicos que, nesse caso, são denominados cofatores. Íons metálicos podem se ligar covalentemente aos aminoácidos da cadeia proteica e participarem efetivamente da reação catalítica ou, em outros casos, se juntam à enzima no momento da catálise, sem que seja estabelecida uma ligação covalente. Algumas enzimas reconhecem diferentes íons bivalentes como ativadores, enquanto outras demandam um íon específico.

Alguns íons, porém, podem se ligar à enzima, alterando sua estrutura e inibindo sua funcionalidade. De forma geral, esses íons atuam como

inibidores não competitivos. O efeito dos diferentes íons metálicos sobre as enzimas é bastante variável e vai depender de seu tipo, origem, mecanismo de atuação, entre outros fatores.

Desativação

A estabilidade é um dos principais fatores a ser considerado na seleção de uma enzima para aplicação em processo industrial. Diversos fatores, como temperatura, pH ou tempo de armazenamento, podem fazer com que a enzima perca sua atividade. Essa desativação ocorre pelo efeito de mudanças conformacionais, na estrutura secundária e terciária, sem que haja quebra das ligações covalentes. Uma enzima pode se desativar reversível ou irreversivelmente.

Constante de desativação e tempo de meia vida

O modelo mais simples que descreve o processo de desativação é o modelo de primeira ordem em que a taxa de desativação (dA/dt , na qual A representa atividade da enzima ativa) é diretamente proporcional à concentração da enzima ativa, ou seja, $dA/dt = -k.A$, ou, de forma integrada:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-kd.t} \quad (13) \quad \text{ou} \quad \ln A(t) = \ln A_0 - kd.t \quad (14)$$

ou ainda $\ln \left(\frac{A(t)}{A_0} \right) = -kd.t \quad (15)$

Na qual kd é chamada constante de desativação ou desnaturação e A/A_0 é considerada a atividade relativa, relação entre o valor da atividade no tempo t e o valor inicial da atividade.

O tempo de meia vida, $t_{1/2}$, é definido como o tempo em que a atividade da enzima se reduz à metade. Então, aplicando o conceito de meia vida à Equação 15, temos que:

$$\ln \left(\frac{1}{2} \cdot \frac{A_0}{A_0} \right) = -kd.t_{\frac{1}{2}} \quad (16)$$

Isolando $t_{1/2}$:

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{-\ln(0,5)}{kd} = \frac{0,69}{kd} \quad (17)$$

Observando a Equação 17, podemos perceber que quanto menor o valor de kd , maior o tempo de meia vida da enzima, e maior sua estabilidade.

Existem modelos de desativação mais complexos que o modelo mais usual, de primeira ordem, apresentado. Nem sempre os dados experimentais de atividade terão decaimento exponencial como descreve esse modelo.

Energia de ativação

De posse dos valores das constantes de desativação (kd) obtidos em diferentes temperaturas, a energia de ativação do processo de desativação térmica (Ed) pode então ser facilmente calculada, utilizando novamente a equação de Arrhenius, anteriormente mencionada e agora apresentada na forma linearizada:

$$\ln(kd) = \ln kd^* - \frac{Ed}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (18)$$

Na qual R : constante dos gases ideais (8,314 J/mol.K), kd^* : fator de frequência para a reação, T : temperatura absoluta, em Kelvin, dada por $T(K) = T(^{\circ}C) + 273,15$.

Comparando Ed para duas enzimas, o maior valor de energia de ativação da inativação térmica se traduz em uma enzima menos sensível à temperatura, ou seja, mais estável a elevadas temperaturas.

Seção 2: Aspectos práticos

Nesta seção, iremos aplicar a teoria da seção anterior a um estudo de caso (hipotético) em que é necessário conhecer as características de um conjunto de enzimas para selecionar a mais apropriada para ser aplicada a um processo industrial.

Estudo de caso: Seleção da enzima β -glicosidase mais apropriada para ser adicionada a coquetel celulolítico

Para a conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, são necessárias duas etapas: pré-tratamento (processo químico e/ou físico) e posterior processo enzimático para despolimerização da celulose em glicose. Essa reação é catalisada, principalmente, pela ação sinérgica de três tipos de enzimas: endo- β -1,4-glicanase (E.C. 3.1.24), exoglicanase (E.C. 3.2.1.91) e β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) (Margeot et al., 2009).

A maioria dos coquetéis comerciais tem como base o conjunto de enzimas produzido por linhagens selvagens ou geneticamente modificadas da espécie *Trichoderma reesei*. Apesar de apresentarem a vantagem da capacidade de produção de um complexo de enzimas robusto para o ambiente industrial, esse conjunto é pobre em β -glicosidases, sendo necessária sua complementação com enzimas obtidas de outras fontes. Embora já estejam disponíveis no mercado eficientes coquetéis enzimáticos, o aperfeiçoamento desse conjunto catalisador ainda é alvo de programas de pesquisa de empresas e instituições.

Vamos supor, então, que estamos desenvolvendo um projeto que tem como objetivo selecionar β -glicosidase para complementar coquetel celulolítico produzido por *T. reesei*. As candidatas são seis diferentes enzimas, todas β -glicosidases, de origem fúngica, obtidas por expressão heteróloga. As enzimas, quando padronizadas por mg de proteína, apresentam valores de atividade enzimática semelhantes. Por apresentarem velocidades de formação de produto parecidas, podemos afirmar que todas têm o mesmo potencial para serem escolhidas como a proteína a ser adicionada ao

coquetel base? Não! É necessário que a enzima também tenha propriedades compatíveis com a condição de aplicação pretendida: hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

Esse processo apresenta as seguintes condições: pH próximo de 5 (tampão citrato de sódio/ácido cítrico), 50 °C, 48 horas de duração, ambiente com alta concentração de glicose. Então, além de conhecermos os valores de atividade, para selecionar qual a enzima mais apropriada para a aplicação que buscamos, é essencial termos conhecimento de suas características e seu desempenho nas condições de processo mencionadas. Na Tabela 2 estão apresentados os parâmetros definidos para cada enzima. Já adiantamos que a enzima 6 foi a selecionada pelo seu conjunto de qualidades. Mostraremos, a seguir, como planejar os experimentos e analisar os dados que levaram à escolha dessa candidata.

Tabela 2. Características das enzimas β -glicosidases disponíveis para compor o coquetel enzimático.

	Enzima 1	Enzima 2	Enzima 3	Enzima 4	Enzima 5	Enzima 6
V _m (mmol/min)	0,00108	0,00097	0,00110	0,00088	0,00086	0,00115
k _m (mM)	4,730	10,253	3,129	3,916	5,155	2,697
Inibição k _i (mM)	CuSO ₄ k _i =2,106	Não detectado*	Celobiose k _i =8,236	Furfural k _i =13,689	Não detectado*	Não detectado*
pH ótimo	5	5	5	5	7	5
Temperatura ótima (°C)	60	50	50	50	50	50
k _d a 50 °C (h ⁻¹)	0,028	0,074	0,073	0,031	0,238	0,016
Meia vida a 50 °C (h)	25,3	9,3	9,5	22,4	2,9	43,3

*: efeito de inibição não detectado na presença de celobiose, sulfato de cobre (CuSO₄) ou furfural, nas condições operacionais avaliadas.

Como explicado no item “Medida de velocidade da reação e atividade enzimática”, antes de iniciar qualquer estudo de cinética enzimática, é necessário ter um método robusto que garanta a medida de velocidade

inicial das enzimas. Para a obtenção dos dados, todos os ensaios devem ser realizados em triplicata, pelo menos. Para facilitar a compreensão, apresentaremos os valores médios, sem seus respectivos desvios.

Determinação da velocidade da reação catalisada e da atividade enzimática

Exemplo 1 (enzima 6)

A enzima β -glicosidase atua como catalisadora, entre outras reações, da reação de hidrólise da celobiose, gerando glicose como produto. Para determinar a velocidade da reação catalisada pela enzima, precisamos expor a enzima ao substrato (celobiose, 0,1 mmol total, volume final 5 mL) e determinar a quantidade total de produto (glicose) gerado. Ao final de uma reação de 10 minutos, observamos a produção de 0,01 mmol de glicose (que equivale a 0,005 mmol de celobiose convertido, ou seja, uma conversão total de 5%, que é um valor recomendado para manter as condições de velocidade inicial durante todo o intervalo da reação). Métodos que permitem o monitoramento de formação do produto, ou consumo de substrato, ao longo do tempo de reação são mais recomendados que os métodos que só permitem a determinação pontual desses valores, por exemplo, da concentração inicial e final do produto ou substrato. Quando somente medidas pontuais são possíveis, é recomendado calcular a conversão total ao final do ensaio, garantindo assim que a concentração do substrato tenha se mantido em excesso ao longo da reação. É também recomendado se certificar de que a velocidade foi constante durante toda a faixa de tempo em que a reação foi avaliada. Isso pode ser feito pela medição da velocidade em reações com diferentes tempos, mantidos constantes todos os demais parâmetros.

É importante ficar atento às limitações dos métodos de medida que serão utilizados (limite de detecção, limite de quantificação, linearidade da curva de calibração, efeito do pH e temperatura sobre os reagentes, presença de interferentes na quantificação), pois medições erradas levarão à determinação de propriedades enzimáticas erradas. O uso de enzimas e

analitos de referência, quando possível, é fortemente recomendado para verificar a adequação do método de análise.

Considerando que todas as exigências para a determinação de velocidades iniciais foram atendidas, a Equação 1 foi usada para calcular a velocidade da reação catalisada, que, para a enzima 6, foi de 0,0010 mmol de glicose/min ($v = 0,010 \text{ mmol}/10 \text{ min} = 0,0010 \text{ mmol}/\text{min}$).

Confirmando que temos um método apropriado, podemos avaliar quantitativamente o efeito de diversos fatores sobre a velocidade da reação catalisada pela enzima. Para conhecermos esses efeitos, em geral, os experimentos consistem em variar um fator de cada vez, mantendo todos os outros constantes, e medir a velocidade da reação como resposta.

Efeito da concentração de substrato

Planejando o experimento

Para avaliar o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação, pode-se começar por um experimento piloto, coletando os dados em uma ampla faixa de concentração de substrato. Para escolher essa faixa, é recomendável, se possível, tomar como base as informações disponíveis na literatura. A partir desses dados preliminares, obtém-se uma estimativa de V_m e k_m , bem como um direcionamento para escolher a faixa de concentração de substrato que irá avaliar. Sugere-se obter dados de velocidade de reação em, pelo menos, 8 a 10 diferentes concentrações de substrato distribuídas antes e após o valor de k_m .

Exemplo 2 (enzima 6)

No experimento piloto, medimos a velocidade da reação em ensaios contendo de 1 mM a 50 mM de celobiose e encontramos um k_m aproximado de 3 mM.

Então, coletamos os dados de velocidade de reação em 15 concentrações de substrato, que variaram de 0,1 mM a 22 mM, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Velocidade de reação catalisada pela β -glicosidase 6 em função da concentração de substrato.

Ensaio	Celobiose (mM)	Glicose* (mmol)	v (mmol glicose/min)
1	0,1	0,00041	0,00004
2	0,5	0,00180	0,00018
3	1	0,00311	0,00031
4	1,5	0,00419	0,00042
5	2	0,00490	0,00049
6	4	0,00674	0,00067
7	6	0,00794	0,00079
8	8	0,00851	0,00085
9	10	0,00909	0,00091
10	12	0,00917	0,00092
11	14	0,00963	0,00096
12	16	0,00984	0,00098
13	18	0,00993	0,00099
14	20	0,01013	0,00101
15	22	0,01031	0,00103

*O volume total da reação foi de 5 mL; a partir desse volume e da concentração de produto medida ao final da reação, foi possível calcular a quantidade total de produto gerada no ensaio, por exemplo (5 mL*0,002 mmol/mL=0,01 mmol). A quantidade total de produto (mmol) dividida pelo tempo de reação (10 minutos) foi usado para calcular a velocidade da reação catalisada pela enzima (0,0010 mmol glicose/min).

Vale ressaltar que, nesse experimento, somente a concentração do substrato variou entre os ensaios. A quantidade da enzima, temperatura, pH, agitação, volume e tempo de reação foram mantidos constantes.

Ao plotar os dados obtidos, e apresentados na Tabela 3, podemos observar o perfil da velocidade de reação em função de diferentes concentrações de substrato (Figura 7).

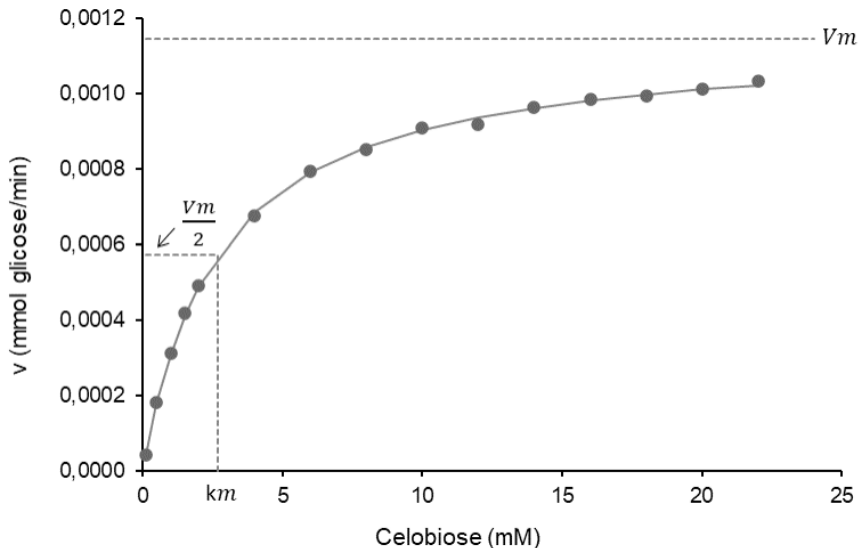


Figura 7. Velocidade de reação catalisada pela β -glicosidase 6 em função da concentração de substrato.

Ajustando os dados experimentais (Tabela 3) à equação proposta por Michaelis-Menten (Equação 2) – o passo a passo para o ajuste está apresentado no apêndice 1 –, foi determinado que V_m corresponde a 0,00115 mmol/min e K_m a 2,697 mM.

Como mostrado na Tabela 2, entre as enzimas avaliadas, a enzima 6 é uma das que apresentam maior afinidade ($\downarrow K_m$) pelo substrato celobiose. A enzima 2, apesar de apresentar V_m (0,00097 mmol/min) semelhante às outras enzimas, apresenta K_m de 10,253 mM, indicando baixa afinidade pelo

substrato. Para esse parâmetro, a enzima 2 é a menos adequada para a aplicação no processo de hidrólise enzimática de biomassa.

Efeito de inibidores

Para a aplicação de β -glicosidases no processo de hidrólise enzimática de biomassa, precisamos avaliar o comportamento dessas enzimas na presença dos compostos que estão presentes no ambiente reacional, como, por exemplo, alta concentração de substrato, presença de compostos fenólicos e furânicos, íons, entre outros. Para exemplificar o efeito de inibidores, avaliamos o efeito da presença de furfural e do íon cobre (Cu^{2+} , vindo de CuSO_4) sobre a atividade das enzimas.

Planejando o experimento

Uma das formas de avaliar o efeito de um composto sobre a atividade de uma enzima consiste em obter um conjunto de dados que compare o efeito da concentração de substrato sobre a velocidade da enzima (como no exemplo 2) na ausência e na presença de uma concentração fixa do potencial composto inibidor. Ao comparar os valores de V_m e k_m nas duas condições, será possível determinar se o composto adicionado exerce inibição competitiva ($V_m' = V_m$; $k_m' > k_m$) ou não competitiva ($V_m' < V_m$; $k_m' = k_m$). Vale lembrar que esses são os tipos mais comuns de inibição, mas o comportamento do sistema inibido também pode não seguir esses padrões.

Exemplo 3 (enzima 4): inibição competitiva

Para exemplificar este caso, utilizamos a enzima 4. Os dados de velocidade da reação foram coletados na ausência e na presença de furfural (7,5 mM e 15,0 mM) e estão apresentados na Tabela 4. Furfural é gerado durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica e, dependendo do processo aplicado, altas concentrações podem ser carregadas para a etapa de hidrólise enzimática.

Tabela 4. Velocidade de reação catalisada pela enzima β -glicosidase 4 em função da concentração de substrato, na ausência e na presença de furfural.

Ensaio	Celobiose (mM)	Furfural		
		i=0 mM	i=7,5 mM	i=15 mM
		v (mmol/min)	v (mmol/min)	v (mmol/min)
1	0,1	0,00002	0,00001	0,00001
2	0,5	0,00010	0,00007	0,00005
3	1	0,00018	0,00012	0,00010
4	1,5	0,00024	0,00017	0,00014
5	2	0,00030	0,00022	0,00017
6	4	0,00045	0,00035	0,00029
7	6	0,00053	0,00044	0,00037
8	8	0,00059	0,00050	0,00044
9	10	0,00063	0,00055	0,00049
10	12	0,00067	0,00059	0,00052
11	14	0,00069	0,00061	0,00056
12	16	0,00071	0,00064	0,00058
13	18	0,00072	0,00065	0,00061
14	20	0,00074	0,00068	0,00063
15	22	0,00075	0,00069	0,00064

Ao plotar os dados, de forma não linearizada (Figura 8a) e linearizada segundo a Equação 3 (Figura 8b), podemos observar que a presença de furfural alterou o comportamento da enzima e que esse comportamento foi coincidente com o perfil apresentado na Figura 4. Portanto, temos claramente um caso de inibição competitiva. Para melhor visualização, os pontos de menor concentração de substrato foram removidos do gráfico linearizado, mas, ao observar a Figura 8b, pode-se perceber todos os problemas decorrentes da linearização relatados anteriormente.

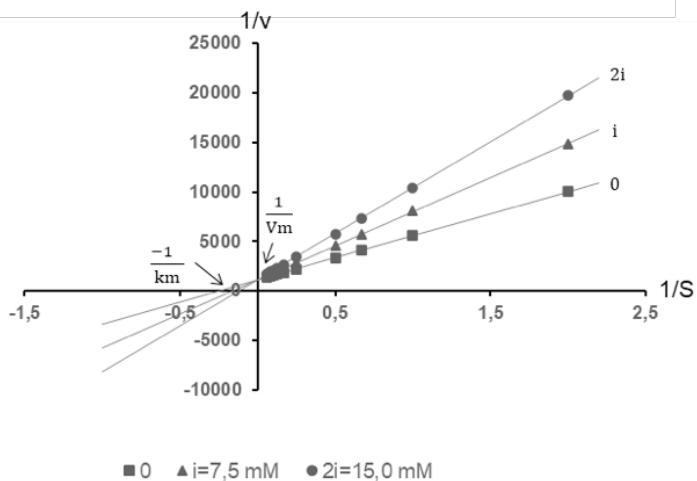
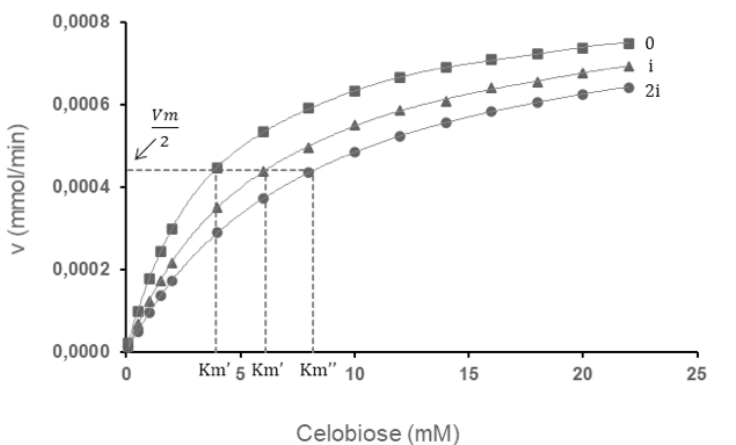


Figura 8. Efeito da presença de furfural sobre a velocidade de reação catalisada pela enzima 4. Representação de Michaelis-Menten (a) e da linearização de Lineweaver-Burk (b). $V_m=V_m'=V_m''= 0,00088$ mmol/min. $k_m=3,916$ mM; $k_m'(i=7,5$ mM) $=6,102$ mM; $k_m''(i=15$ mM) $=8,200$ mM; $k_i=13,689$ mM.

Com o ajuste dos dados experimentais (Tabela 4) à equação proposta por Michaelis-Menten (Equação 2) (o passo a passo para o ajuste está apresentado no apêndice 1), podemos determinar V_m e k_m na ausência do inibidor ($V_m = 0,00088$ mmol/min; $k_m = 3,916$ mM). Ao ajustar os dados de velocidade na presença de 7,5 mM e 15,0 mM de furfural à equação de Michaelis-Menten, podemos determinar uma máxima velocidade V_m de 0,00088 mmol/min, a mesma obtida para o ensaio na ausência do inibidor, e k_m' (aparente) de 6,102 mM e 8,200 mM, respectivamente, para a presença de 7,5 mM e 15,0 mM de furfural. Com esses dados, podemos afirmar que furfural atua como inibidor competitivo da enzima β -glucosidase 4 e que, quanto maior a concentração do inibidor, maior o valor de k_m' obtido.

A precisão na determinação dos parâmetros k_m , k_i e V_m será mais efetiva quanto mais concentrações do inibidor forem estudadas. Dispondo dos valores de k_m' para cada concentração de inibidor, o valor de k_i (13,689 mM) pode ser obtido de acordo com a Equação 5 ($k_m' = k_m + (k_m/k_i) \cdot i$) ajustada aos dados experimentais, numa equação de reta $y = a + b \cdot x$, na qual os dados de k_m' são utilizados como y e a concentração de inibidor (i) como x . O coeficiente angular corresponderá a k_m/k_i e o linear a k_m . Como os dados desse exemplo apresentam pouco desvio experimental, ao aplicarmos os dados de qualquer uma das concentrações de inibidor à Equação 5, obteremos também os mesmos valores de k_i e k_m .

Uma alternativa mais prática, uma vez que já conhecemos a característica da inibição, é determinar os parâmetros da cinética na presença de furfural ajustando todo o conjunto de dados (v função de S e i) ao modelo de inibição competitiva (Equação 4). Independentemente da escolha do método para ajuste dos dados experimentais, os valores dos parâmetros obtidos serão os mesmos, ou terão pequenas diferenças em função da qualidade dos ajustes. Portanto, ajustando todo o conjunto de dados de uma só vez, os parâmetros obtidos foram: $V_m = 0,00088$ mmol/min; $k_m = 8,200$ mM e $k_i = 13,689$ mM. O valor de k_i obtido, de 13,689 mM, pode ser interpretado como a concentração de inibidor que dobra o valor de k_m' .

Como mostrado na Tabela 2, entre as enzimas avaliadas, a enzima 4 é a única inibida na presença de furfural, componente presente nas condições de aplicação. Então, segundo esse critério, a enzima 4 é a menos adequada para aplicação no processo de hidrólise enzimática de biomassa.

Exemplo 4 (enzima 1): inibição não competitiva

Para exemplificar este caso, usamos a enzima 1. Os dados de velocidade da reação em função da concentração de substrato foram coletados na ausência e na presença de 0,5 mM e 1,0 mM de CuSO_4 e estão apresentados na Tabela 5. CuSO_4 deve estar presente no meio reacional da hidrólise enzimática de biomassa para manter a atividade de enzimas cobre-dependentes, como as mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), por exemplo.

Tabela 5. Velocidade de reação catalisada pela enzima β -glicosidase 1 em função da concentração de substrato, na ausência e na presença de CuSO_4 .

Ensaio	Celobiose (mM)	CuSO_4		
		i=0 mM	i=0,5 mM	i=1,0 mM
		v (mmol/min)	v (mmol/min)	v (mmol/min)
1	0,1	0,00002	0,00002	0,00002
2	0,5	0,00010	0,00008	0,00007
3	1	0,00018	0,00015	0,00013
4	1,5	0,00027	0,00021	0,00018
5	2	0,00032	0,00026	0,00022
6	4	0,00047	0,00040	0,00033
7	6	0,00060	0,00049	0,00040
8	8	0,00067	0,00055	0,00045
9	10	0,00075	0,00059	0,00050
10	12	0,00079	0,00062	0,00052
11	14	0,00083	0,00065	0,00054
12	16	0,00084	0,00067	0,00057
13	18	0,00084	0,00069	0,00059
14	20	0,00085	0,00070	0,00059
15	22	0,00086	0,00071	0,00061

Plotando os dados, de forma não linearizada (Figura 9a) e linearizada (9b), podemos observar que a enzima 1 perdeu eficiência na presença de CuSO_4 . Observando o efeito da presença do inibidor, coincidente com o padrão apresentado na Figura 5, podemos perceber claramente que o sulfato de cobre exerce inibição não competitiva sobre a enzima 1. No gráfico linearizado, todas as retas interceptam o eixo x num único ponto, $-1/k_m$ (com pequenas diferenças em função de erros experimentais), independentemente da presença e da concentração do inibidor. Pelo método gráfico, podemos determinar um valor de k_m variando de 4,718 mM a 4,859 mM entre as curvas.

Ao linearizar a equação de Michaelis-Menten para o caso de inibição não competitiva, tem-se a seguinte equação:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_m} \cdot \left(1 + \frac{i}{k_i}\right) + \frac{K_m}{v_m} \cdot \frac{1}{S} \quad (19)$$

Sendo $(1/v_m) \cdot (1+i/k_i)$ o coeficiente linear, ou seja, o ponto em que as retas tocam o eixo y quando $x=0$, e considerando a curva da Figura 9b sem inibição, $i=0$, podemos determinar graficamente o valor de v_m . Logo, se a reta obtida para a reação sem inibidor cruza o eixo y em 919,7, o valor de v_m será 0,00109 mmol/min.

Da mesma forma, para as curvas com inibição, conhecido o valor de v_m , determinamos o valor de k_i , nesse caso, 2,044 mM e 2,016 mM, respectivamente, para $i=0.5$ e 1 mM. Essa diferença se deve a desvios dos dados experimentais e a aproximações da linearização. O mais recomendado, caso tenhamos conhecimento do efeito de mais de duas concentrações de inibidor sobre a velocidade de reação, para evitar imprecisões na determinação de k_i , é que façamos um segundo ajuste dos dados de v_m' à Equação 8. Conhecidos cada um dos valores de v_m' (obtidos dos ajustes dos dados experimentais ao modelo de Michaelis-Menten) e o valor de v_m , para a curva na ausência de inibidor, k_i pode ser facilmente determinado.

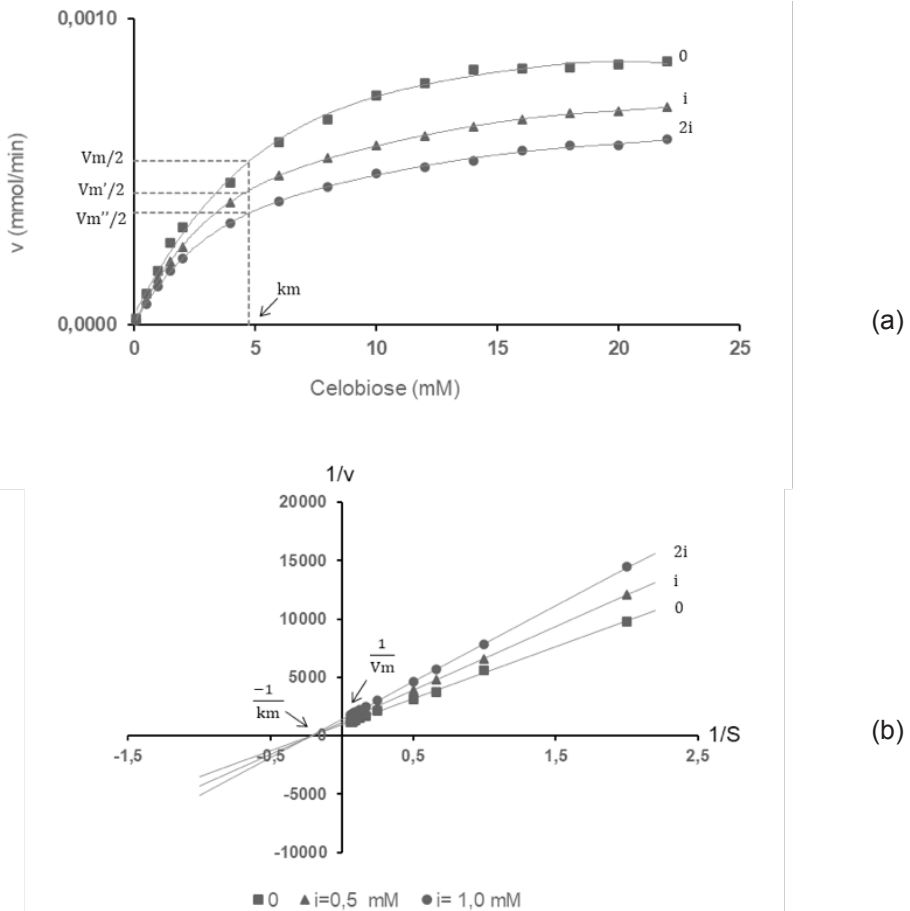


Figura 9. Efeito da presença de CuSO_4 sobre velocidade de reação catalisada pela enzima 1. Representação de Michaelis-Menten (a) e linearização de Lineweaver-Burk (b). $V_m=0,00108$ mmol/min; $V_m'(i=0,5 \text{ mM})=0,00087$; $V_m''(i=1 \text{ mM})=0,00074$; $k_m=4,730$ mM; $k_i=2,106$ mM.

Outra forma mais prática e direta de se determinar os valores dos parâmetros cinéticos para o conjunto de dados apresentados é por meio de um ajuste não linear, da mesma maneira que demonstrado anteriormente. Podemos utilizar todo o conjunto de dados (v função de S e i) em um único ajuste da Equação 7. Seguindo esses passos foram obtidos $0,00108$ mmol/min; $4,747$ mM e $2,106$ mM para os valores de V_m , k_m e k_i , respectivamente.

Exemplo 5 (enzima 3): inibição pelo substrato

Para ilustrar o efeito de inibição pelo substrato, utilizamos o conjunto de dados do efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de reação catalisada pela enzima 3 (Tabela 6).

Tabela 6. Velocidade de reação catalisada pela β -glicosidase 3 em função da concentração de substrato.

Ensaio	Celobiose (mM)	v (mmol glicose/min)
1	0,1	0,00003
2	0,5	0,00015
3	1	0,00026
4	1,5	0,00034
5	2	0,00039
6	4	0,00048
7	6	0,00049
8	8	0,00047
9	10	0,00045
10	12	0,00040
11	14	0,00038
12	16	0,00036
13	18	0,00032
14	20	0,00031
15	22	0,00029

Plotando os dados da Tabela 6, podemos observar (Figura 10) que, após certa concentração, o substrato passa a ter efeito inibitório sobre a velocidade da reação. Ajustando os dados experimentais à equação que descreve a inibição pelo substrato (Equação 9), foi possível determinar que $V_m=0,00110$ mmol/min, $k_m=3,129$ mM e $k_i=8,236$ mM. Podemos calcular também (Equação 10) a máxima concentração de substrato para a qual não é observada inibição pelo substrato celobiose, que é de 5,076 mM ($S_{m\acute{a}x}$).

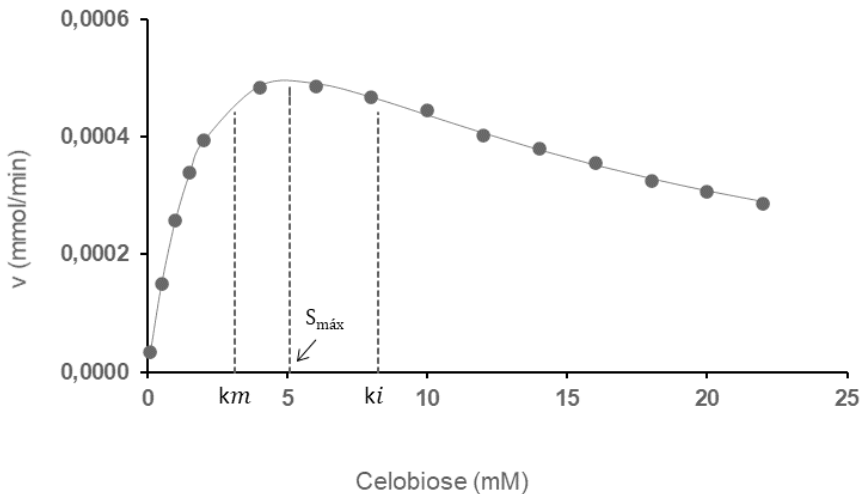


Figura 10. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reação catalisada pela enzima β-glicosidase 3.

Como mostrado na Tabela 2, entre as enzimas avaliadas, a enzima 3 é a única que apresenta inibição pelo substrato (nas concentrações avaliadas), havendo diminuição de sua atividade em concentrações maiores que 5,076 mM de celobiose. Então, segundo esse critério, a enzima 3 é a menos adequada para aplicação no processo de hidrólise enzimática de biomassa.

Efeito da temperatura

Planejando o experimento

Sendo a enzima uma proteína, além do efeito sobre a atividade catalítica, a temperatura também tem efeito sobre a desnaturação do biocatalisador. Então, o efeito da exposição às diferentes temperaturas deve ser medido ao longo do tempo. Mantendo-se constantes as demais condições do ensaio (que garantam a medida de velocidade inicial), deve-se construir curvas de $v \times t$ para diferentes temperaturas (preferencialmente uma faixa ampla, com espaçamento de no máximo 10 °C).

Exemplo 6 (enzima 2)

A temperatura estabelecida para o processo modelo deste estudo de caso é de 50 °C, portanto a β -glicosidase selecionada deve apresentar bom desempenho catalítico e elevada estabilidade operacional nessa condição. Para avaliar o efeito da temperatura sobre o desempenho da β -glicosidase 2, foi estabelecida uma faixa de temperatura que engloba valores abaixo e acima de 50 °C para a realização dos ensaios: 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C. O tempo de incubação da enzima no meio reacional em cada um desses valores de temperatura foi de até 1 hora de reação, com a retirada periódica de alíquotas para determinação da quantidade de glicose formada (Tabela 7).

Tabela 7. Efeito da temperatura sobre a velocidade de reação catalisada pela enzima β -glicosidase 2.

Tempo (min)	Temperatura				
	30 °C	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
Glicose (mmol)					
5	0,0026	0,0041	0,0049	0,0057	0,0057
10	0,0052	0,0081	0,0097	0,0086	0,0060
20	0,0104	0,0163	0,0194	0,0138	0,0090
30	0,0156	0,0244	0,0291	0,0189	0,0108
40	0,0208	0,0325	0,0388	0,0241	0,0119
50	0,0261	0,0407	0,0485	0,0249	0,0120
60	0,0313	0,0488	0,0582	0,0258	0,0121

Ao plotar os dados, temos:

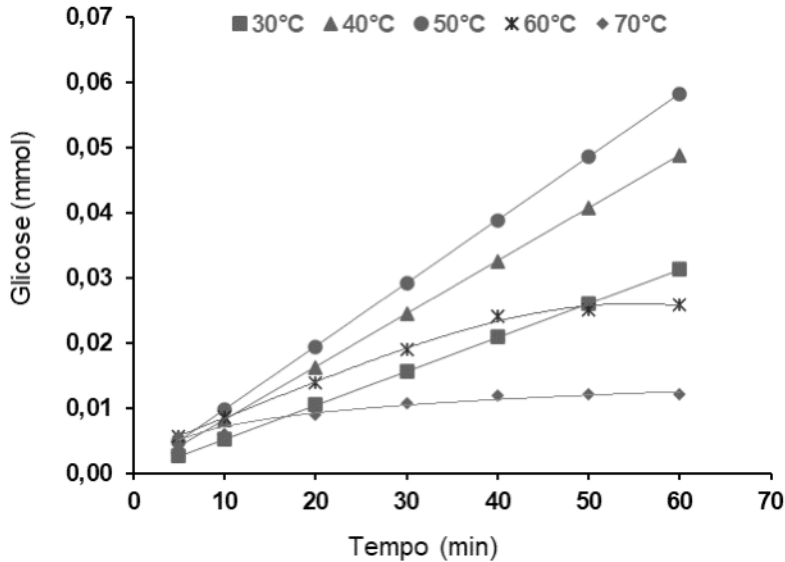


Figura 11. Efeito da temperatura sobre a formação de glicose para a enzima β -glicosidase 2.

Na Figura 11 podemos observar os dois efeitos descritos anteriormente: de 30 °C a 50 °C a curva de progresso é linear, indicando que não há desnaturação da enzima (mesma concentração de enzimas ativas em t_0 e t_f). Nessa faixa, o aumento da temperatura resulta em aumento da velocidade da reação (inclinação da reta). Nas curvas da reação a 60 °C e 70 °C, podemos observar que no tempo de 5 minutos a quantidade de glicose formada é semelhante à obtida no ensaio a 50 °C, porém, no decorrer do tempo, as curvas perdem a linearidade, indicando a desnaturação da enzima (menor concentração de enzimas ativas em t_f que em t_0). Nessa faixa, o aumento da temperatura resulta em diminuição da velocidade da reação ao longo do tempo. Podemos concluir então que, com os dados obtidos, a temperatura ótima para a atividade da enzima β -glicosidase 2 está próxima de 50 °C, último ponto em que o aumento da temperatura resulta em aumento da velocidade de reação.

Na Figura 12, é apresentada a curva de velocidade em função da temperatura, considerando a velocidade média de reação (dP/dt). Pode-se observar a inflexão na temperatura de 50 °C, ilustrando o ponto de temperatura ótima da reação.

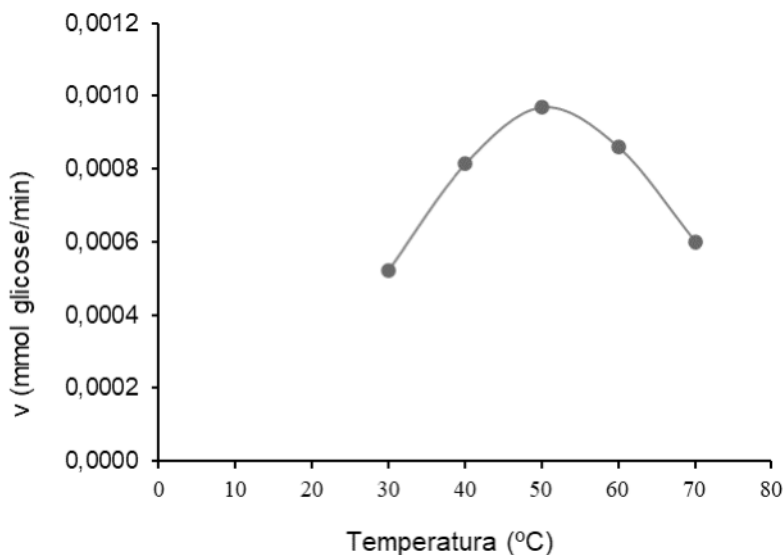


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a velocidade de reação catalisada pela enzima β -glicosidase 2.

Como mostrado na Tabela 2, com exceção da enzima 1, como esperado, as β -glicosidasas apresentam temperatura ótima próxima de 50 °C. A enzima 1 apresenta temperatura ótima de 60 °C, boa característica para processos operados em altas temperaturas. Porém, com base no parâmetro temperatura ótima, a enzima 1 é a menos adequada para aplicação no processo de hidrólise enzimática de biomassa. A enzima 2, usada neste exemplo, apresenta temperatura ótima compatível com a aplicação pretendida, porém, como mostrado anteriormente, é inibida por CuSO_4 .

Efeito do pH

Planejando o experimento

Mantendo-se constantes as demais condições do ensaio (que garantam a medida de velocidade inicial), deve-se avaliar a velocidade da reação em diferentes valores de pH, preferencialmente em uma faixa ampla, com espaçamento de no máximo uma unidade.

A determinação experimental do pH ótimo da enzima deve garantir que a velocidade de reação esteja isenta do efeito do íon adicionado para ajuste do pH. Portanto, é recomendada a utilização de um tampão de ampla faixa para realização dos ensaios ou, caso não seja possível, a determinação da atividade nos valores de pH de interseção dos diferentes tampões deve ser feita em ambos os tampões utilizados e o efeito da mudança de tampão deve ser considerado na determinação do pH ótimo.

Exemplo 7 (enzima 6)

Para a aplicação da enzima ao processo de hidrólise enzimática de biomassa, é ideal que a β -glicosidase tenha pH ótimo em torno de 5. Então, avaliamos a faixa de pH de 3 a 8. Para a faixa 3 a 6, utilizamos o tampão citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM e, para a faixa de 6 a 8, o tampão fosfato de sódio 100 mM. Note que o efeito do pH 6 foi determinado nos dois tampões escolhidos, de forma a considerar o efeito dos diferentes íons. A Tabela 8 apresenta as velocidades de reação em função dos valores de pH selecionados para o ensaio.

Tendo em vista os inúmeros efeitos decorrentes da alteração do pH da reação, podemos considerar que o valor de pH mais adequado para a reação enzimática é aquele no qual, no tempo de ensaio, resulte na máxima formação de produto. Na Figura 13, podemos observar uma inflexão no ponto relativo ao pH 5, então, podemos considerar que esse é o pH ótimo para a hidrólise de celobiose catalisada pela β -glicosidase 6. Foi feito teste estatístico de comparação de médias para os valores de atividade obtidos para o pH 6 nos tampões citrato e fosfato (teste F para comparação de variâncias, seguido

de teste t para comparação de médias). Pôde-se constatar que os valores médios de atividades nos diferentes tampões são estatisticamente iguais e que, portanto, a atuação da enzima não sofre influência de nenhum dos íons utilizados.

Tabela 8. Efeito do pH inicial sobre a velocidade de reação catalisada pela β -glicosidase 6.

pH do ensaio	v (mmol glicose/min)
3'	0,000035
4'	0,000087
5'	0,000112
6'	0,000091
6''	0,000086
7''	0,000056
8''	0,000021

'Tampão citrato de sódio/ácido cítrico 100 mM

''Tampão fosfato de sódio 100 mM

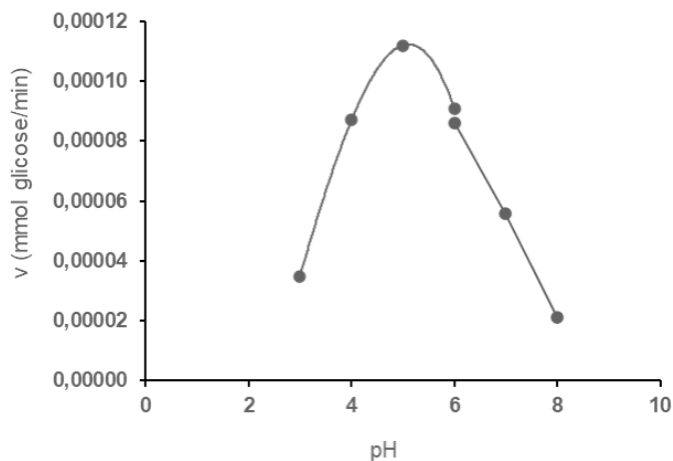


Figura 13. Efeito do pH sobre a velocidade de reação catalisada pela enzima β -glicosidase 6.

Como mostrado na Tabela 2, a maioria das β -glicosidasases apresentam máxima atividade em pH próximo a 5, compatível com a aplicação pretendida, como esperado. A enzima 5 apresenta maior atividade em pH 7. Com base nesse parâmetro, a enzima 5 é a menos adequada para aplicação no processo de hidrólise enzimática de biomassa deste estudo de caso.

Estabilidade térmica

Planejando o experimento

Uma alta estabilidade da enzima na condição de operação do processo é um dos fatores mais importantes na seleção do catalisador. Para avaliar a estabilidade térmica, a enzima deve ser incubada em diferentes temperaturas e, em intervalos periódicos, determinada sua atividade nas condições ótimas de operação.

Exemplo (enzima 6)

Para este estudo de caso, foi avaliada a estabilidade (k_d e $t_{1/2}$) em função das temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C. Os dados coletados são apresentados na Tabela 9, em termos de velocidade de reação (mmol/min) e de velocidade (ou atividade) relativa ($A(t)/A_0$). Nessa tabela, as velocidades de reação foram convertidas para mmol/h para manter a consistência dimensional nos cálculos de k_d e $t_{1/2}$. A Figura 14 mostra a queda da atividade em função do tempo, nas temperaturas avaliadas. Vale ressaltar que a velocidade de reação de cada um dos pontos da curva de inativação deve ser determinada obedecendo as condições de velocidade inicial, para que os valores medidos sejam válidos.

Tabela 9. Velocidade de reação e velocidade (ou atividade) relativa da β -glicosidase 6 em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.

t (h)	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa
0	0,062	1,000	0,062	1,000	0,062	1,000	0,062	1,000	0,062	1,000
0,5	0,060	0,997	0,060	0,995	0,060	0,992	0,060	0,986	0,059	0,980
1	0,062	0,993	0,062	0,990	0,062	0,984	0,061	0,973	0,060	0,961
2	0,064	0,986	0,064	0,981	0,063	0,988	0,061	0,946	0,060	0,923
4	0,059	0,972	0,058	0,962	0,057	0,938	0,054	0,895	0,052	0,852
6	0,059	0,959	0,058	0,944	0,056	0,908	0,052	0,847	0,048	0,786
8	0,060	0,946	0,058	0,926	0,055	0,880	0,050	0,801	0,046	0,725
10	0,057	0,932	0,056	0,908	0,052	0,852	0,047	0,758	0,041	0,670
12	0,059	0,920	0,057	0,890	0,053	0,825	0,046	0,717	0,040	0,618
16	0,056	0,894	0,054	0,857	0,049	0,774	0,040	0,642	0,033	0,526
20	0,053	0,870	0,051	0,824	0,045	0,726	0,035	0,575	0,028	0,448
24	0,052	0,846	0,048	0,793	0,042	0,681	0,031	0,514	0,023	0,382
28	0,050	0,822	0,046	0,763	0,039	0,639	0,028	0,460	0,020	0,325
32	0,050	0,800	0,045	0,734	0,037	0,599	0,026	0,412	0,017	0,277
36	0,048	0,777	0,043	0,706	0,034	0,562	0,023	0,369	0,014	0,236
40	0,046	0,756	0,041	0,679	0,032	0,527	0,020	0,330	0,012	0,201
44	0,046	0,735	0,041	0,653	0,031	0,494	0,019	0,295	0,011	0,171

Continua...

Tabela 9. Continuação.

t (h)	30 °C		40 °C		50 °C		60 °C		70 °C	
	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa	Velocidade (mmol/h)	Velocidade relativa
48	0,045	0,715	0,039	0,628	0,029	0,484	0,017	0,264	0,009	0,146
52	0,043	0,695	0,037	0,605	0,027	0,435	0,015	0,237	0,008	0,124
56	0,042	0,676	0,036	0,582	0,025	0,408	0,013	0,212	0,006	0,106
60	0,040	0,657	0,034	0,560	0,023	0,383	0,012	0,190	0,005	0,090

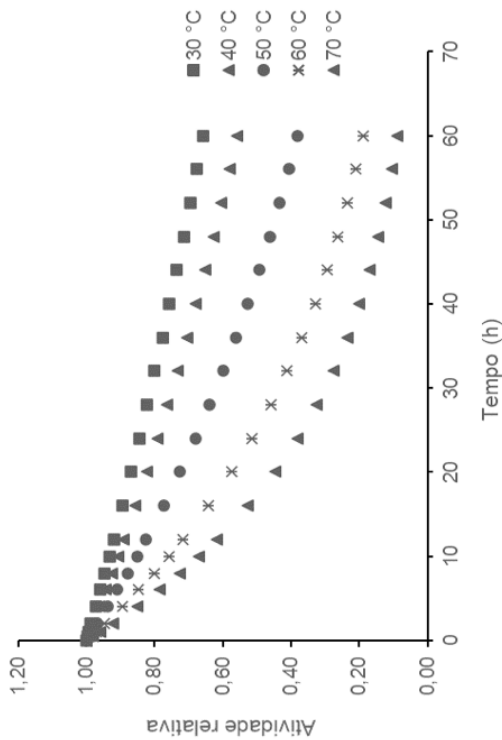


Figura 14. Dados da inativação térmica da β-glicosidase 6.

Ajustando os dados de velocidade da Tabela 9, para cada uma das temperaturas avaliadas, à Equação 13, ou similarmemente os dados de atividade relativa à Equação 15, na forma linear ou não linear (segundo a mesma lógica do ajuste mostrado no Apêndice 1, porém mudando a equação de ajuste), é possível obter o valor das constantes de desativação em função da temperatura (Tabela 10). Como esperado, quanto menor a temperatura, menor foi o valor de k_d obtido, ou seja, maior a estabilidade da enzima.

Os tempos de meia vida, para cada uma das temperaturas avaliadas, foi então facilmente calculado pela Equação 17 e estão apresentados na Tabela 10. A enzima β -glicosidase 6 apresentou tempo de meia vida de 43,3 horas a 50 °C, condição de operação do coquetel ao qual ela será integrada, ou seja, a cada 43,3 horas a atividade dessa enzima se reduz à metade.

Tabela 10. Constante de desativação (k_d) e tempo de meia vida da enzima β -glicosidase 6, para as diferentes temperaturas avaliadas.

Temperatura (°C)	k_d (h^{-1})	Meia vida (h)
30	0,0070	98,75
40	0,0097	71,47
50	0,0160	43,30
60	0,0276	25,07
70	0,0399	17,35

Com os valores de k_d em função da temperatura apresentados na Tabela 10, podemos obter as informações necessárias para a determinação da energia de ativação do processo de desativação térmica (E_d) da enzima 6, que são o valor inverso da temperatura em Kelvin e $\ln(k_d)$, apresentados na Tabela 11.

Com base na equação de Arrhenius na forma linearizada (Equação 18), plotamos os dados de $\ln(k_d)$ em função do inverso da temperatura (K) (Figura 15). Então, o coeficiente angular da regressão dos dados nos dá o valor de $-E_d/R$. Portanto, o valor de E_d pode ser obtido multiplicando o coeficiente angular pelo valor de $-R$ ($-8,314$ J/mol.K). O valor da energia de ativação da desativação térmica obtido foi de 39069,1 J/mol ou, 39,07 kJ/mol, como é mais usualmente encontrado. Comparando E_d para

duas enzimas, o maior valor de energia de ativação da inativação térmica se traduz em uma enzima menos sensível à temperatura, ou seja, mais estável a elevadas temperaturas.

Tabela 11. kd em função da temperatura, 1/T e ln(kd).

Temperatura (°C)	kd (h ⁻¹)	T (K)	1/T	ln(kd)
30	0,0070	303,150	0,00329870	-4,959
40	0,0097	313,150	0,00319336	-4,636
50	0,0160	323,150	0,00309454	-4,135
60	0,0276	333,150	0,00300165	-3,588
70	0,0399	343,150	0,00291418	-3,220

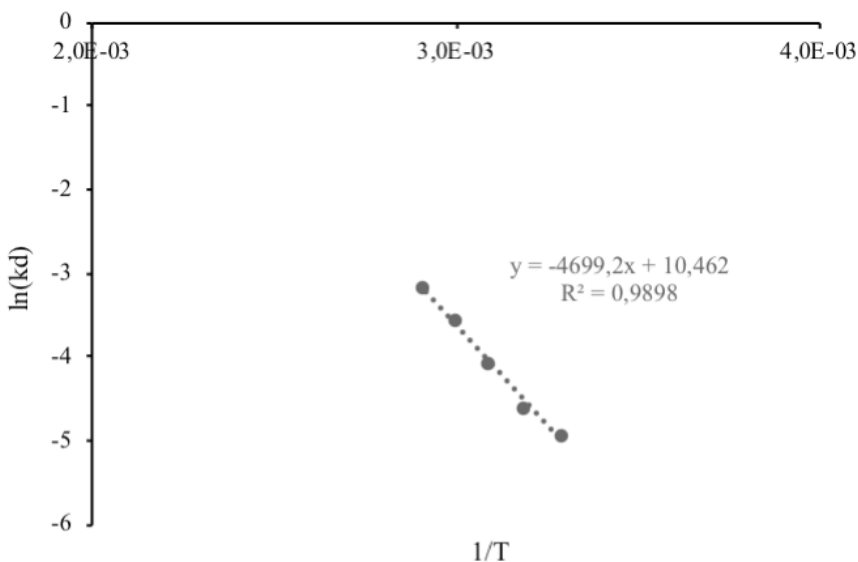


Figura 15. Determinação da energia de ativação do processo de desativação térmica por método gráfico.

Analisando as informações apresentadas na Tabela 2, apesar de as seis enzimas apresentarem valores de velocidades de reação semelhantes e adequados para a aplicação, cinco delas apresentam características incompatíveis com a aplicação pretendida: a enzima 1 é inibida pela presença de CuSO_4 ; a enzima 2 apresenta baixa afinidade pelo substrato e meia vida a 50 °C de apenas 9,3 horas; a enzima 3 é inibida em concentração de substrato acima de 5,08 mM e apresenta meia vida a 50 °C de apenas 9,5 horas; a enzima 4 é inibida pela presença de furfural; e a enzima 5, além de apresentar pH ótimo distante da faixa da aplicação, apresenta meia vida a 50 °C de apenas 2,9 horas. Podemos concluir, então, que a enzima 6 é, entre as opções, a mais apropriada para ser adicionada ao coquetel celulolítico, por apresentar alta velocidade de conversão do substrato (V_m), alta afinidade ao substrato (baixo K_m), alta eficiência mesmo na presença de potenciais inibidores, pH e temperatura ótimos próximos às condições de aplicação, e meia vida de 43,3 horas, compatível com as 48 horas de reação de hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica.

Referência

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.

Literatura recomendada

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2 ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. v. 1, 279 p.

DIXON, M.; WEBB, E. C. **Enzymes**. London: Longman Group Limited, 1979.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Vol 3. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. v. 3, 593 p.

PUNEKAR, N. S. **Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms**. Singapore: Springer, 2018.

SEGEL, I. H. **Biochemical calculations: how to solve mathematical problems in general biochemistry**. 2nd ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 1976. 441 p.

Apêndice 1 – Regressão não linear

Uma equação de regressão linear $y=f(x)$, que convencionalmente utilizamos, tem a forma básica $y=a+b.x$. Usualmente conhecemos os valores que as variáveis x e y (como uma função de x) assumem em diferentes pontos e determinamos quais os valores de a e b que melhor se ajustam ao pares x - y experimentalmente obtidos. Nesse caso, podemos dizer que os valores de y variam linearmente com os valores de x , ou seja, os dados de x e y são ajustáveis a uma reta.

Entretanto, raramente equações que descrevem fenômenos físicos podem ser traduzidas em uma reta. Na grande maioria dos casos em que dispomos de uma equação para descrever o comportamento de um sistema, ela não tem uma característica linear. É o caso, por exemplo, de quando precisamos definir os valores dos parâmetros cinéticos k_m e V_m na equação de Michaelis-Menten (Equação 2). Dispomos das informações de como a velocidade de reação varia em função da concentração de substrato por meio dos pontos experimentais coletados. Como observamos na Figura 2 e Equação 2, a velocidade (y) não aumenta indefinidamente com o aumento da concentração de substrato (x), portanto não seria possível ajustar os dados, com a qualidade requerida, utilizando uma simples equação de reta.

A equação de Michaelis-Menten pode ser considerada nosso modelo de regressão para os dados nesse caso. Ou seja, dispomos de diversos valores de velocidade (y) em função da concentração de substrato (x) obtidos experimentalmente, e sabemos que essa velocidade (y) varia com a concentração de substrato (x) de acordo com o formato da equação de Michaelis-Menten. Quais seriam os valores de V_m e k_m que melhor se ajustam ao comportamento observado? (Em um raciocínio análogo a determinar os valores de a e b que definem a equação da reta de regressão para o caso linear).

Existem diferentes técnicas que permitem obter a solução para esse problema. O mais simples e utilizado deles é o método numérico dos mínimos quadrados, que consiste em minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado pela função e os dados experimentais $((v_{\text{predita}} - v_{\text{experimental}})^2)$. Portanto, o método minimiza a soma dos quadrados

dos resíduos, em um procedimento iterativo² que, a cada nova iteração, melhora o ajuste do modelo aos dados experimentais. Diversos softwares têm métodos de ajuste implementados que os torna simples como os de uma regressão linear.

Usando os dados do exemplo 2, neste apêndice será demonstrado o procedimento para ajuste de dados a uma função utilizando regressão não linear e os softwares Statistica v. 10 e Excel (suplemento Solver).

Utilizando o Statistica

Em uma nova planilha, insira na primeira coluna os valores de S e na segunda coluna os valores experimentais de v (atente-se para manter a consistência dimensional entre os dados de S e v). Clique duas vezes sobre o rótulo da coluna 1 e em *name* escreva S. Faça o mesmo para a coluna 2, nomeando-a de v.

The screenshot shows a data table with two columns: '1 S' and '2 v'. The data points are as follows:

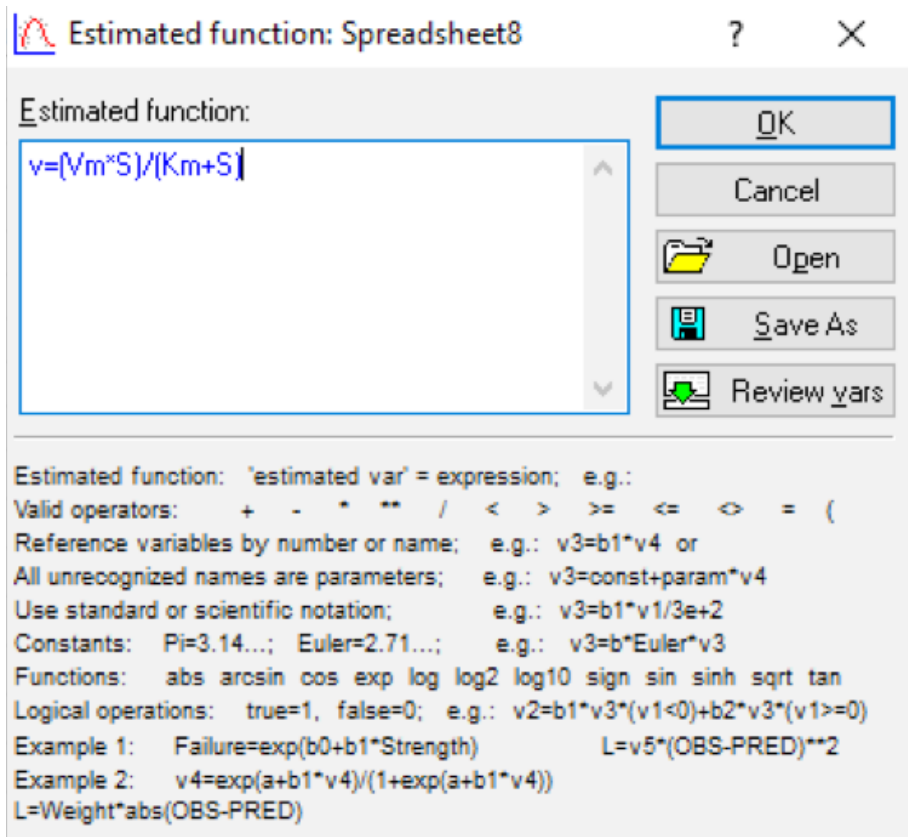
	1 S	2 v
1	0,1	0,00004
2	0,5	0,00018
3	1	0,00031
4	1,5	0,00042
5	2	0,00049
6	4	0,00067
7	6	0,00079
8	8	0,00085
9	10	0,00091
10	12	0,00092
11	14	0,00096
12	16	0,00098
13	18	0,00099
14	20	0,00101
15	22	0,00103

Overlaid on the table is the 'Variable 2' dialog box. The 'Name' field contains 'v', 'Type' is 'Double', and 'Length' is '8'. The 'Display format' section shows 'Number' selected with 'Decimal places' set to '5'. The 'MD code' is '-99999998'. Buttons for 'OK', 'Cancel', and 'All Specs...' are visible.

Na aba *Statistics*, na barra de ferramentas, selecione a opção *Advanced Models* e na sequência *Nonlinear Estimation*. Selecione a primeira opção para uma regressão com função especificada e método dos mínimos

² Procedimento iterativo – está associado ao conceito de iteração (repetição sucessiva de um processo). Consiste em obter uma aproximação inicial y_0 e, a partir dela, a cada sucessiva iteração, obter y_{n+1} a partir de y_n , até que seja satisfeito o critério de convergência ou de paragem do método (por exemplo, soma dos quadrados dos resíduos menor que 10^{-6}).

quadrados para solução (*User-specified regression, least squares*). Clique em *Function to be estimated*. Neste campo vamos inserir o modelo de regressão de Michaelis-Menten (Equação 2), como exemplo abaixo:



Note que, como as colunas foram renomeadas, o modelo pode ser inserido com os próprios nomes das variáveis. Clique em OK para fechar a janela de edição da equação e em OK novamente. Na aba *Advanced*, caso necessário, os critérios de convergência e número de iterações podem ser alterados (funções mais complexas que esta demandam número de iterações muito maior). Caso tenha uma estimativa do valor inicial, este também pode ser alterado nesta aba. Como temos uma função simples e de fácil convergência,

todos os parâmetros podem ser mantidos. Ao clicar em OK, e em seguida em *Summary*, podem-se observar os valores ajustados de km e Vm e a qualidade do ajuste.

	Estimate	Standard error	t-value df = 13	p-value	Lo. Conf Limit	Up. Conf Limit
Vm	0,001146	0,000000	0,00	0,00	0,001146	0,001146
Km	2,696763	0,053212	0,00	0,00	2,581806	2,811720

Model is: $v = (V_m * S) / (K_m + S)$ (Spreadsheet1)
 Dep. Var.: v
 Caution: Degenerate solution, results may not be correct !

Results: Spreadsheet1

Model is: $v = (V_m * S) / (K_m + S)$
 Dependent variable: v
 Loss function: least squares
 Final value: 0
 Proportion of variance accounted for: ,99947556 R = ,99973775

Quick | Advanced | Residuals | Review

Summary: Parameter estimates
 Predicted values, Residuals, etc.
 Iteration history
 Analysis of Variance
 Fitted 2D function & observed vals
 Fitted 3D function & observed vals

Summary
 Cancel
 Options
 By Group

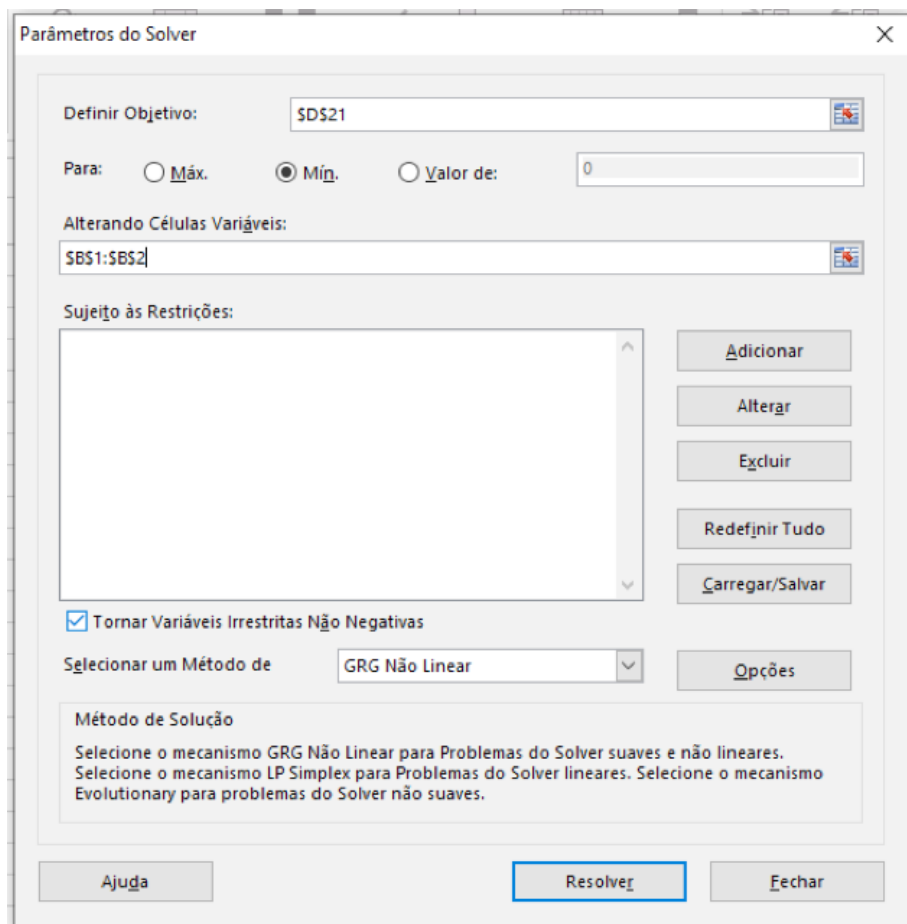
Ao clicar em *Fitted 2D function & observed values*, os pontos experimentais e a função podem ser plotados em um mesmo gráfico. Este gráfico também permite a observação de como a função ajustada se aproxima dos valores experimentais.

Utilizando a função Solver, do Excel

Para utilizarmos a função Solver na solução desse problema, aplicaremos o conceito do método dos mínimos quadrados. Construa uma planilha, como mostra o modelo, com os valores das concentrações de substratos e as respectivas velocidades experimentais de reação. Para a velocidade de reação predita, utilizaremos a própria função de Michaelis-Menten (Equação 2). Com os valores preditos e observados, determinaremos o quadrado do resíduo, que corresponde a $(\text{valor predito} - \text{valor experimental})^2$. E o que desejamos então é minimizar o valor da soma dos quadrados dos resíduos (célula D21).

	A	B	C	D
1	Km (mM)			
2	Vm (mmol/min)			
3				
4	S (mM)	v experimental (mmol/min)	v predito (mmol/min)	Resíduo ²
5	0.1	0.0000414711208016375	=(\$B\$2*\$A5)/(\$B\$1+\$A5)	=(C5-B5)^2
6	0.5	0.000180484241149407	=(\$B\$2*\$A6)/(\$B\$1+\$A6)	=(C6-B6)^2
7	1	0.000310962290605376	=(\$B\$2*\$A7)/(\$B\$1+\$A7)	=(C7-B7)^2
8	1.5	0.000418913757283911	=(\$B\$2*\$A8)/(\$B\$1+\$A8)	=(C8-B8)^2
9	2	0.000489778938221565	=(\$B\$2*\$A9)/(\$B\$1+\$A9)	=(C9-B9)^2
10	4	0.000673885250273224	=(\$B\$2*\$A10)/(\$B\$1+\$A10)	=(C10-B10)^2
11	6	0.000793546656671366	=(\$B\$2*\$A11)/(\$B\$1+\$A11)	=(C11-B11)^2
12	8	0.000851344659401283	=(\$B\$2*\$A12)/(\$B\$1+\$A12)	=(C12-B12)^2
13	10	0.000909448382233932	=(\$B\$2*\$A13)/(\$B\$1+\$A13)	=(C13-B13)^2
14	12	0.000916603095773161	=(\$B\$2*\$A14)/(\$B\$1+\$A14)	=(C14-B14)^2
15	14	0.000963317425914946	=(\$B\$2*\$A15)/(\$B\$1+\$A15)	=(C15-B15)^2
16	16	0.000984414576014219	=(\$B\$2*\$A16)/(\$B\$1+\$A16)	=(C16-B16)^2
17	18	0.000992959479029007	=(\$B\$2*\$A17)/(\$B\$1+\$A17)	=(C17-B17)^2
18	20	0.00101259856783008	=(\$B\$2*\$A18)/(\$B\$1+\$A18)	=(C18-B18)^2
19	22	0.00103134056965227	=(\$B\$2*\$A19)/(\$B\$1+\$A19)	=(C19-B19)^2
20				
21			soma	=SOMA(D5:D19)
22				

Após construir a planilha, na aba Dados, abra o Solver. Defina então o objetivo, que é minimizar D21, alterando as células B1 e B2 (que correspondem aos valores de km e Vm). Não são necessárias restrições, pois o quadrado dos resíduos será sempre positivo.



Clique em *Resolver*. O Solver informa que encontrou a convergência. Clique em OK. Nas células B1 e B2 serão mostrados os valores de km e Vm, respectivamente, que minimizam a soma dos quadrados dos resíduos, ou seja, os melhores valores que podem ser obtidos para o ajuste dos dados à equação proposta. Observe que o valor da soma dos resíduos agora é de 1.10^{-9} , o que indica que há uma boa concordância entre os valores preditos pela equação e os valores experimentais.

