

DISCUSSÃO DOS MÉTODOS DE LINEARIZAÇÃO DA EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN DA INVERTASE: PROPOSTA DE INTEGRAÇÃO DAS DISCIPLINAS DE BIOQUÍMICA E ESTATÍSTICA

Lauri Alves Junior¹, André Luis Fachini de Souza¹, Vanessa Neves Höpner¹

¹Instituto Federal Catarinense – Araquari. E-mail: laurialves21@gmail.com

ÁREA: (X) Pesquisa; () Extensão

NÍVEL: () Ensino médio; (X) Superior

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo cinético da enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae*. Neste sentido, teve como objetivo a caracterização cinética da enzima em ensaios laboratoriais de estudo da velocidade da reação catalisada enzimaticamente frente a diferentes concentrações de substrato, explorando ferramentas de estatística para análise dos resultados. A partir dos dados experimentais foi obtida a equação de Michaelis-Menten e testados diferentes métodos de linearização (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf e Eadie-Hofstee). Análise de regressão linear e estudo dos resíduos mostrou que o método de Hanes-Woolf melhor se ajustou aos dados da invertase estudada, apresentando K_m de aproximadamente 1,40 mmol e $V_{máx}$ de 129,67 $\mu\text{mol/L/min}$.

Palavras-chave: Invertase, *S. cerevisiae*, cinética, linearização.

INTRODUÇÃO

Em 1.913, Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten propuseram uma teoria para a atividade enzimática, onde $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$. A velocidade de uma reação enzimática pode ser observada pela formação de produto (P), imediatamente após a mistura de enzima (E) e substrato (S). Assim, evita-se a interferência da variação da concentração de substrato [S], considerando-se que sua concentração é muito próxima do valor inicial. Desta forma, determina-se a velocidade inicial (v_0) em que [S] é geralmente muito maior que [E].

O estudo do efeito da variação da [S] na v_0 , quando [E] e tempo de incubação são constantes, fornece um gráfico com perfil de hipérbole retangular. Neste gráfico, a determinação do valor de $V_{máx}$ (velocidade máxima) e K_m ([S] correspondente a metade da $V_{máx}$) tornam-se imprecisos, necessitando-se de ferramentas estatísticas de regressão.

O modelo de regressão $Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_N) + \varepsilon$, onde ε é uma perturbação aleatória na função (erro da aproximação), $X_1, X_2, X_3, \dots, X_N$ o número de variáveis independentes e f a função que identifica (estima) a relação entre as variáveis, prediz o valor que a variável dependente (Y) assumirá para certos valores das variáveis independentes, sendo representada por um modelo linear, polinomial ou uma função não linear.

O objetivo deste trabalho foi determinar um modelo linear que melhor se ajusta aos dados cinéticos da invertase de *S. cerevisiae*, para o cálculo da $V_{máx}$ e K_m da enzima.

MATERIAL E MÉTODOS

Um extrato bruto de enzimas foi preparado a partir de 25 g de leveduras secas *S. cerevisiae* (fermento biológico) suspensas em 125 mL de bicarbonato de sódio 0,15 mol/L e incubados a 37 °C por seis horas. Esta suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 13.000xg e o sobrenadante coletado e armazenado a 5 °C.

Foram preparados sistemas de reação contendo tampão acetato de sódio 0,02 mol/L pH 4,7, sacarose (0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 14,0; 20,0; 30,0; 40,0; 60,0 e 80,0 mol/L) e 200 µL de extrato bruto de enzima (~0,02 mg), em um volume final de reação de 2,5 mL. As reações foram incubadas a 30 °C por 5 minutos, seguido da adição de 1,0 mL de solução de 3,5-dinitrosalicilato (método do DNS) e aquecimento a 100 °C por mais 5 minutos para a determinação da concentração de glicose formada (MALDONADE, CARVALHO e FERREIRA, 2013). Na sequência, foram adicionados 6,5 mL de água a cada reação e analisada em espectrofotômetro a 540 nm. Para a determinação da concentração de glicose formada foi efetuada uma curva padrão de glicose (0,04; 0,08; 0,16; 0,32 e 0,4 mol/L).

A partir dos dados experimentais foi construído o gráfico de Michaelis-Menten e testados os métodos de linearização de Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf e Lineweaver-Burk (LINEWEAVER-BURK, 1934; DOWD e RIGGS, 1965) para a determinação de $V_{máx}$ e K_m . Também foram realizados estudos de resíduos para confirmar o melhor modelo de linearização.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A enzima invertase catalisa a hidrólise da sacarose, originando α -D-glicose e β -D-frutose. A formação de produto [P] e, conseqüentemente, a taxa de reação ($d[P]/dt$) foi determinada pelo método de DNS (MALDONADE, CARVALHO e FERREIRA, 2013).

O efeito da variação da concentração de substrato na velocidade inicial (v_0) das reações catalisadas pela invertase foi estudado experimentalmente (Figura 1A). A v_0 (taxa de reação) foi determinada após cinco minutos de reação. Nestas condições, assume-se que o complexo ES está formado e que a [S] permanece praticamente inalterada, sendo chamada de cinética de estado estacionário. Em baixa concentração de sacarose, tem-se quase toda a enzima na forma livre e a velocidade será proporcional à [S], pois o equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$ será deslocado para ES à medida que a [S] aumenta. Finalmente é alcançado um ponto acima do qual ocorrem apenas aumentos insignificantes em v_0 mesmo com aumentos substanciais de [S], sendo este ponto chamado de velocidade máxima ($V_{máx.}$).

A partir do tratamento matemático da reação $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E + P$ surgiu a equação de Michaelis-Menten: $v_0 = \frac{V_{máx.}[S]}{K_m + [S]}$, onde K_m = constante de Michaelis-Menten. A $V_{máx}$ é atingida quando predomina a forma ES e a concentração de enzima livre é insignificante.

Antes dos métodos computadorizados de regressão não linear, vários métodos gráficos de linearização da equação de Michelis-Menten foram propostos para determinar K_m e $V_{máx.}$, como os métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee e Hanes-Woolf (Tabela 1; Figura 1B, C e D). Entretanto, todos estes métodos apresentam distorções e são inferiores à regressão não linear (GRECO e AKALA, 1979).

Tabela 1: Componentes gráficos das linearizações da equação de Michelis-Menten e parâmetros cinéticos determinados experimentalmente a partir da invertase de *S. cerevisiae*.

Método	Eixo x	Eixo y	Intercessão eixo y	Intercessão eixo x	Tangente	Equação de linearização	K_m (mmol)	$V_{máx.}$ (μ mol/L/min.)	R^2
Lineweaver-Burk	$1/v_0$	$1/[S]$	$1/V_{máx}$	$1/v_0$	$K_m/V_{máx}$	$1/v_0 = 0,0218.(1/[S]) + 0,0061$	3,574	163,934	0,989
Eadie-Hofstee	$[S]/v_0$	[S]	$K_m/V_{máx}$	$1/v_0$	$1/V_{máx}$	$v_0 = -2,3518.(v_0/[S]) + 0,1399$	2,352	139,9	0,872
Hanes-Woolf	v_0	$v_0/[S]$	$V_{máx}$	$V_{máx}/K_m$	$-1/K_m$	$[S]/v_0 = 7,7118.[S] + 10,778$	1,408	129,671	0,998

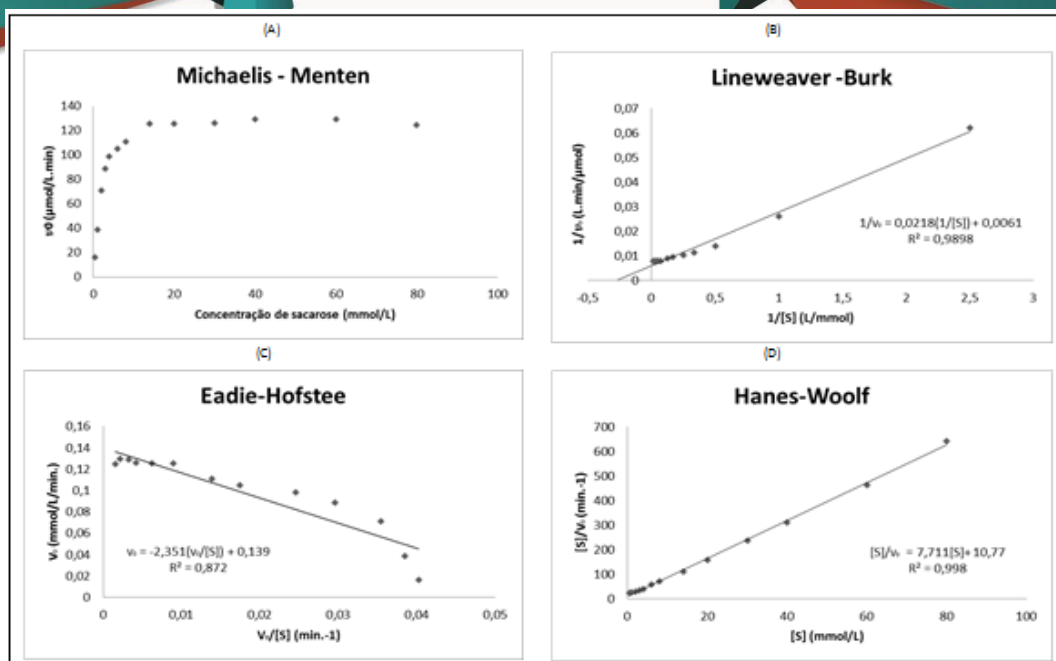


Figura 1: Gráfico de Michaelis-Menten (A) e linearizações da equação de Michaelis-Menten da reação da invertase, Lineweaver-Burk (B), Eadie-Hofstee (C) e Hanes-Woolf (D).

As deduções das equações ($1/v_0=0$) e ($1/[S]=0$) na linearização de Lineweaver-Burk encobrem desvios da reta ideal e forçam uma reta onde deveria ser uma curva (SIQUEIRA et al., 2011). Outro aspecto deste método é a separação das variáveis v_0 e $[S]$ que mesmo com erros experimentais ainda apresentam um bom ajuste dos dados na equação.

Neste gráfico tem-se $V_{m\acute{a}x.}$ de $163,93 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Tabela 1). No gráfico de Michaelis-Menten (Figura 1A), apesar de ter aparentemente entrado em um platô em 14 mmol/L de sacarose, seria necessário um excesso de substrato para ter-se a mesma $V_{m\acute{a}x.}$.

Foi determinado um valor de K_m de $0,28 \text{ mmol/L}$ (Tabela 1), que significa que nesta concentração de sacarose a enzima invertase atinge metade de sua velocidade máxima.

A partir da linearização de Hanes-Woolf, determinou-se K_m de $1,3976 \text{ mmol}$ e $V_{m\acute{a}x.}$ de $129,67 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ e na linearização de Eadie-Hofstee foram determinados K_m de $2,3518 \text{ mmol}$ e $V_{m\acute{a}x.}$ de $139,9 \mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$ (Tabela 1).

O método de linearização de Eadie-Hofstee apresenta o mesmo inconveniente estatístico que o de Lineweaver-Burk, com a complicação adicional de que ambas as variáveis são afetadas pela variabilidade experimental em v_0 . O fato de v_0 estar em ambos os membros da equação provoca certo grau de correlação inevitável entre as variáveis v_0 e $v_0/[S]$ de modo que, mesmo quando $[S]$ e v_0 são duas variáveis aleatórias independentes, acabam ficando relacionadas entre si. Esta correlação, sendo positiva, tende a enfraquecer a correlação observada entre as variáveis no gráfico, já que a relação teórica dada pela equação entre v_0 e $v_0/[S]$ é negativa. Como ambas as variáveis estão sujeitas a erro, o ajustamento pelo método dos mínimos quadrados não é, teoricamente, aplicável.

O método de Hanes-Woolf se mostrou melhor porque os erros em v_0 refletem-se mais homoganeamente em $v_0/[S]$ do que em $1/v_0$. Tomando o inverso de v_0 , dá-se ênfase exagerada aos valores mais baixos de v_0 , sendo estes os valores que têm maior percentagem de erro. A variável independente, $[S]$, aparece em ambos os membros da equação, de tal modo que um gráfico de $[S]/v_0$ em função de $[S]$ apresenta certo grau de correlação inevitável, isto ocorre no sentido em que, mesmo se v_0 e $[S]$ fossem variáveis aleatórias independentes, as variáveis $[S]/v_0$ e $[S]$ estariam correlacionadas entre si. Esta correlação inevitável, sendo positiva, tende a fortalecer a correlação observada entre as duas variáveis porque a relação teórica contida na equação de Hanes-Woolf é

também positiva.

O valor de K_m é particular de cada enzima. Uma variação nesse valor induzida por um ligante é uma maneira de regular a atividade enzimática. Pode-se ajustar as condições para se obter $[S] \gg K_m$ e alcançar-se a $V_{m\acute{a}x}$.

Na regressão linear simples é preciso verificar se as suposições do modelo ajustado são válidas para que os resultados determinados sejam confiáveis. Para isto, utiliza-se o gráfico dos resíduos contra a variável explicativa. Entende-se por resíduo (e) a diferença entre a variável resposta esperada (dados experimentais) e a variável resposta estimada (\hat{y}) (Figura 2).

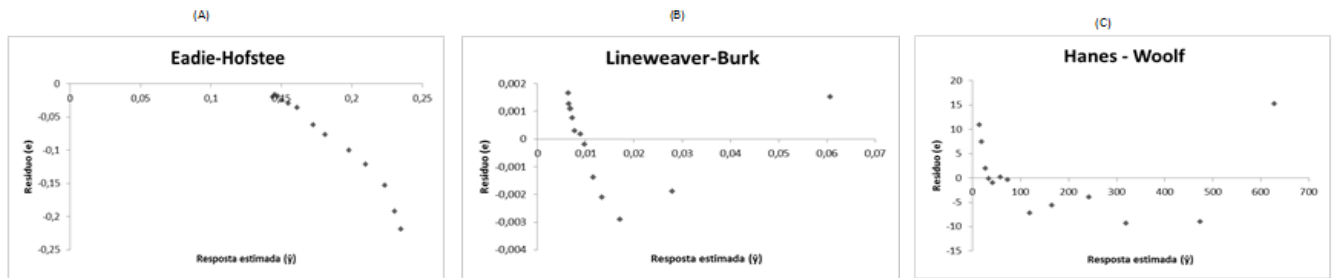


Figura 2: Análise de resíduos dos métodos de linearização da equação de Michaelis-Menten dos dados experimentais, Lineweaver-Burk (A), Eadie-Hofstee (B) e Hanes-Woolf (C).

Para que o modelo de regressão esteja bem ajustado aos dados, a nuvem de pontos (\hat{y} , e) deve se distribuir aleatoriamente e de forma homogênea em torno do eixo horizontal (eixo das abscissas). No gráfico do modelo de linearização de Hanes-Woolf (Figura 2), pode-se verificar que há uma tendência para essa distribuição. Assim, o modelo mais adequado para determinar os valores K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foi o de Hanes-Woolf.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, a função linear de Hanes-Woolf se ajustou melhor aos dados experimentais, com K_m de aproximadamente 1,41 mmol e $V_{m\acute{a}x}$ de 130 $\mu\text{mol/L/min}$.

REFERÊNCIAS

- DOWD, J.E.; RIGGS, D.S. **A Comparison of Estimates of Michaelis–Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations.** *J. Biol. Chem.* 240:863–869, 1965.
- FAZENDA, Ivani C. A. **Interdisciplinaridade: definição, projeto, pesquisa.** In: FAZENDA, Ivani C. A. (org.). *Práticas interdisciplinares na escola.* 10 ed. São Paulo: Cortez, 2005, p.15-18.
- GRECO, W.R.; HAKALA, M.T. Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors, *J. Biol. Chem.*, 254(23): 12104–12109, 1979.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56(3): 658–666, 1934
- MALDONADE, I.R.; CARVALHO, P.G.B.; FERREIRA, N.A. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS.** *Com. Téc. Embrapa*, 85(1), 2013.
- SIQUEIRA, A.J.S.; AZEVEDO, A.M.P.; MATTOS-DUTRA, A.; FIN, C.A.; ROTTA, L.N.; WINK, M.R.; BJERK, R.L.; FERRACINI, M. S. Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$: revisão e uma nova proposta. *Ciência em Movimento*, 2011.