

Determinação do Km e V Max: revisão e uma nova proposta

Determination of Km and Max V: review and a new proposal

A.J.S. Siqueira¹

A.M.P. Azevedo¹

A. Mattos-Dutra¹

C.A. Fin¹

V.R. Lando¹

L.N. Rotta¹

M.R. Wink¹

R.L. Bjerk¹

M.S. Ferracini²

SUMÁRIO

O objetivo do presente trabalho foi o de apresentar uma análise das três equações da reta que permitem a determinação do Km e da Vmax de uma reação enzimática. Os autores sugerem uma nova equação capaz de calcular o Km e a Vmax com maior precisão e assim como Hofstee, Eadie, Scatchard e Wilkinson recomendam o abandono da equação de Lineweaver-Burk.

47

PALAVRAS-CHAVE

Cinética enzimática - Km - Vmax.

¹Departamento de Ciências Fisiológicas – setor de Bioquímica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

²Professora com Licenciatura Plena em Matemática, Colégio Bom Conselho, Porto Alegre, RS.

SUMMARY

The objective of the work was to analyse three different equations used to calculate the Km and Vmax of enzymatic reaction. The authors suggested a new equation that is capable to calculate with more precision both constants and is in agreement with the Hofstee, Eadie, Scatchard and Wilkinson who recommended to abolishment of the Lineweaver-Burk equation.

KEYWORDS

Enzymatic kinetic – Km – Vmax

Introdução

No presente artigo os autores procuraram fazer uma análise das equações utilizadas para determinação do Km e Vmax das reações enzimáticas.

O Km e Vmax são duas constantes de extrema importância no estudo das reações enzimáticas. O Km permite entender a função de enzimas que catalisam uma reação específica, como é o caso das isoenzimas, hexoquinase e glicocquinase. A primeira tem um Km pequeno para a glicose e a segunda, um Km maior para o mesmo substrato, o que explica suas diferentes funções.

Quando uma mesma enzima atua sobre mais de um substrato, esta constante permite identificar o substrato "natural" (principal) que será o de menor Km sendo que este é inversamente relacionado com a afinidade da enzima pelo substrato. Existe uma dependência entre Km e Vmax (NEILANDS; STUMPF; 1955). Na determinação da atividade de uma enzima, a concentração do substrato deve ficar em torno de 10 Km ou, se não for possível, deverá atingir o limite da solubilidade. Nestas condições esta reação aproxima-se de 90% da velocidade máxima (PANASSE, 1974), que está vinculada à atividade molecular.

A noção de enzima iniciou em 1833 com Payen e Persoz, citado por Wallach (1997). O ponto de partida dos estudos sobre cinética enzimática ocorreu em 1902 quando Henri sugeriu a existência da formação de um complexo enzima-substrato. Partindo desta hipótese, Michaelis e Mentem (1913, p. 333) apresentaram um cálculo matemático mais tarde desenvolvido por Briggs e Haldane (1925, p. 38) que resultou na equação: $v = V_{max} \cdot \frac{s}{K_m + s}$

$$K_m + s$$

$$K_m = s \left(\frac{V_{max}}{v} - 1 \right) \text{ onde } v \text{ é a velocidade de reação,}$$

Vmax a velocidade máxima, s a

concentração do substrato e Km quando $v = \frac{V_{max}}{2}$

A partir da igualdade acima foram derivadas três equações lineares capazes de determinar Km e velocidade máxima: equações de Eadie-Hofstee (DIXON; WEEB, 1964), Hanes e Woolf (1932) e Lineweaver-Burk (1934) representadas nas igualdades 1, 2 e 3 abaixo. Foi possível estabelecer uma quarta equação que se mostrou mais precisa e que foi denominada

CMPA (Equação 4).

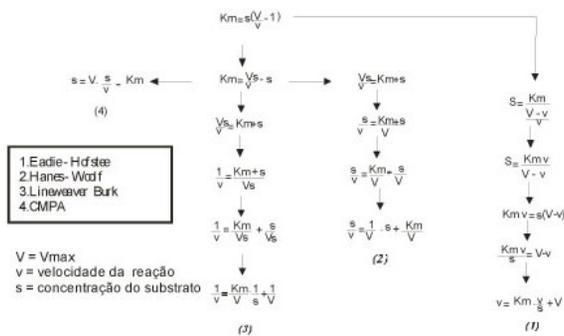


Figura 1 - Equação de Determinação de Km e V max

Material e Métodos

Para realização do presente trabalho foram obtidos os valores de concentração de substrato e das respectivas velocidades com enzimas conhecidas (invertase e adenililtransferase) e de cinco reações hipotéticas. O Km e a Vmax das reações foram calculadas com as quatro reações calculadas. Os resultados obtidos foram comparados e analisados. Os gráficos das reações da invertase foram desenvolvidos com as quatro equações e o da adenililtransferase com as equações Lineweaver-Burk e CMPA.

Resultados

Os resultados encontram-se nas tabelas 1, 2, e 3.

Tabela 1 – Concentração do Substrato e velocidade de Diferentes Reações Enzimáticas

Invertase da Levedura(12)		Enzima A		Enzima B		Enzima C		Enzima D		Enzima E	
[S]	v	[S]	v	[S]	v	[S]	v	[S]	v	[S]	v
0,0187	0,13	0,5	3,2	0,64	0,40	0,25	23,9	1	0,11	1	0,112
0,0375	0,18	1	5,26	2,45	0,98	0,5	28,6	4	0,29	2	0,188
0,0750	0,23	2,5	8,39	3,20	1,15	1,00	37,7	5	0,32	5	0,314
0,150	0,29	3,5	9,49	5,10	1,30	1,50	41,00	10	0,40	-----	-----

Tabela 2 – Km e Vmax das Reações

		IL	DM	A	DM	B	DM	C	DM	D	DM	E	DM	MD
Eadie Hofstee	Km	0,038	(+) 2,7	1,7	(+) 0,17	2,58	(-) 0,76	0,27	(+) 3,8	4,19	(+) 5,0	4,1	(+) 3,5	2,85
	Vmax	0,375	(+) 1,6	14,01	(-) 0,3	2	(+) 1,0	4,9	(+) 2,0	0,58	(+) 1,7	0,58	(+) 3,5	1,8
Hanes Woolf	Km	0,0395	(+) 6,7	1,7	(+) 0,17	2,7	(+) 3,8	0,28	(+) 7,8	3,8	(-) 5,0	3,97	(+) 0,24	3,8
	Vmax	0,375	(+) 1,6	14,02	(-) 0,87	2,03	(+) 2,5	49,2	(+) 2,5	0,58	(+) 1,7	0,58	0	1,5
Lineweaver Burk	Km	0,034	(-) 8,1	1,7	(+) 0,17	2,45	(-) 5,8	0,25	(-) 3,85	4,2	(+) 5,0	3,8	(-) 4,05	4,5
	Vmax	0,357	(-) 3,2	14,2	(+) 0,25	1,9	(-) 4,05	47,4	(-) 1,4	0,58	(+) 3,5	0,55	(-) 1,78	1,9
CMPA	Km	0,0367	(-) 0,8	1,89	(-) 0,4	2,7	(+) 3,8	0,25	(-) 3,85	3,8	(-) 5,0	4,1	(+) 3,5	2,83
	Vmax	0,372	(+) 0,8	14,09	(+) 0,25	2,02	(+) 2,0	46,45	3,38	0,56	(-) 1,75	0,56	0	1,35
Média do Km		0,037		1,897		2,6		0,26		3,99		3,98		
Média da Vmax		0,369		14,14		1,98		48		0,57		0,56		

IL: Invertase da Levedura
 A, B, C, D e E: Diferentes enzimas hipotéticas
 DM: Desvio das médias %
 MD: Média dos desvios %

Tabela 3 – Dados de Wilkinson para determinação do Km e Vmax da adenililtransferase

s	0,138	0,220	0,560	0,766	0,146
v	0,148	0,171	0,324	0,390	0,493

Discussão

A equação de Lineweaver-Burk, a mais recomendada pelos diversos autores, apresenta dois erros matemáticos.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V}$$

Para determinar o Km considera $\frac{1}{s}$ igual a zero.

Então

$$0 = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} + \frac{1}{V} \text{ ou } \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{s} = -\frac{1}{V} \text{ ou, ainda } \frac{1}{s} = \frac{-V}{K_m}$$

$$\frac{1}{s} = -\frac{1}{V} \cdot \frac{V}{K_m} = -\frac{1}{K_m} \quad (I)$$

Considera, também, $\frac{1}{s}$ igual a zero para a determinação da Vmax

$$\frac{1}{v} = -\frac{K_m}{V} \cdot 0 + \frac{1}{V} \text{ ou } \frac{1}{v} = \frac{1}{V} \quad (II)$$

As igualdades (I) e (II) foram obtidas considerando os valores de $1/v$ e $1/s$ igual a zero.

As deduções que levam às igualdades I e II estão mal conduzidas, pois $1/s$ e $1/v$ nunca serão iguais a zero. A equação de Lineweaver-Burk leva o estudante a um raciocínio falso, formulado dentro de princípios aparentemente lógicos.

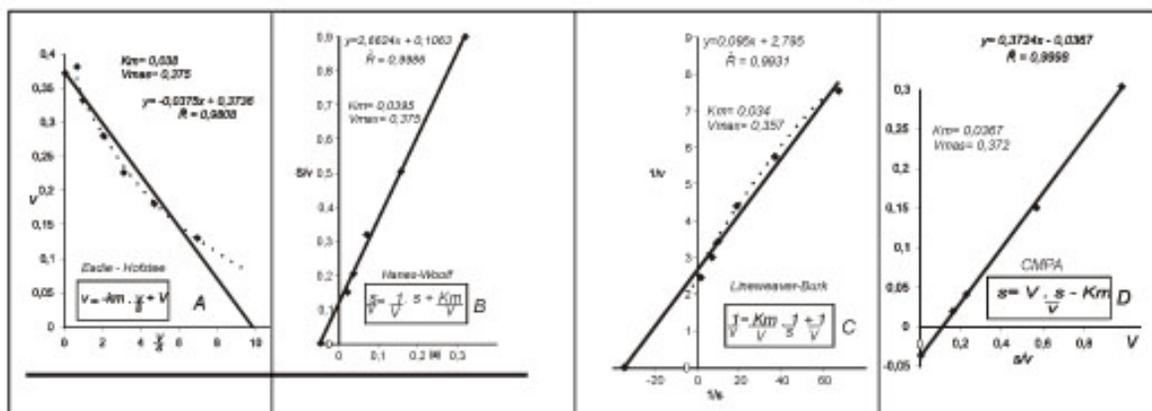
Scatchard, citado por Hofstee (1952) afirma "...o método dos inversos ($1/s \times 1/v$) tem a desvantagem de encobrir desvios da reta ideal e de forçar uma linha reta onde deveria ser

uma curva." Esta afirmação é fácil de verificar em um experimento para determinar o Km e Vmax da invertase (figura 1, C). Nesta figura é possível observar que na equação de Lineweaver-Burk o traçado da reta foi forçado. Na realidade, os pontos indicam uma curva e não uma reta. O gráfico A da figura 2, e o da Eadie-Hofstee (figura 1, A) mostram o mesmo defeito.

De acordo com Hofstee (1952) não há nenhuma razão que justifique o uso da equação de Lineweaver-Burk. Wilkinson (1961, p. 324) afirma que considerações estatísticas recomendam a equação linear $S/v \times S$ no lugar de $1/s \times 1/v$. Com os dados das reações enzimáticas hipotéticas, da invertase (VILLELA; BACILA; TASTALDI, 1973) e da adenilil-transferase (WILKINSON, 1961, p.324), que se encontram nas Tabelas 1, 2 e 3, procuramos comparar os valores encontrados para Km e Vmax, os quais encontram-se na Tabela 2. É possível observar que as quatro equações apresentaram desvios da média menores que 5%, o que é tolerável tanto para Km quanto para Vmax. (HOFSTEE, 1952). No entanto a nova equação mostra a menor média dos desvios para a Vmax, a de Eadie-Hofstee menor para Km; no entanto a equação de Lineweaver-Burk, evidencia a maior média dos desvios tanto para Km quanto para Vmax. Na equação CMPA, como na de Eadie-Hofstee, as duas constantes são obtidas sem cálculos adicionais. Para a equação $1/s \times 1/v$ devem ser calculadas as recíprocas dos dados experimentais e os valores de Km e Vmax, com os inversos dos dados indicados pelo gráfico. Na equação de Hanes a Vmax é calculada pelo inverso da inclinação da reta.

A figura 1, A, B, C, e D, que indicam o experimento com a invertase da levedura, mostra que as melhores distribuições dos pontos foram obtidas com as equações de Hanes-Woolf e CMPA.

Figura 1 – Km e Vmax da invertase determinadas por quatro equações da linha reta



Para Dixon (1964) as três equações de reta para a determinação do Km são válidas, mas dá preferência à equação de Lineweaver-Burk que é, infelizmente pouco confiável, segundo Wallach (1997). Os argumentos do autor para considerar $1/s \times 1/v$ o melhor caminho para determinar as duas constantes, são inconsistentes. Conforme Dixon o método dos inversos permite identificar facilmente os pontos correspondentes às diferentes concentrações de substrato, o que não acontece com os outros métodos.

No entanto, as equações de Hanes e Wolf e a CMPA não apresentam este problema.

Para o mesmo autor na equação de Eadie-Hofstee qualquer erro em "v" afeta ambas coordenadas deslocando o ponto da reta ideal.

Esse último argumento não pode ser aceito considerando que um experimento para determinação do Km e Vmax deve ser realizado com diversos pontos e, portanto, o desvio de um ou dois pontos não impede que o resultado mantenha a precisão desejada.

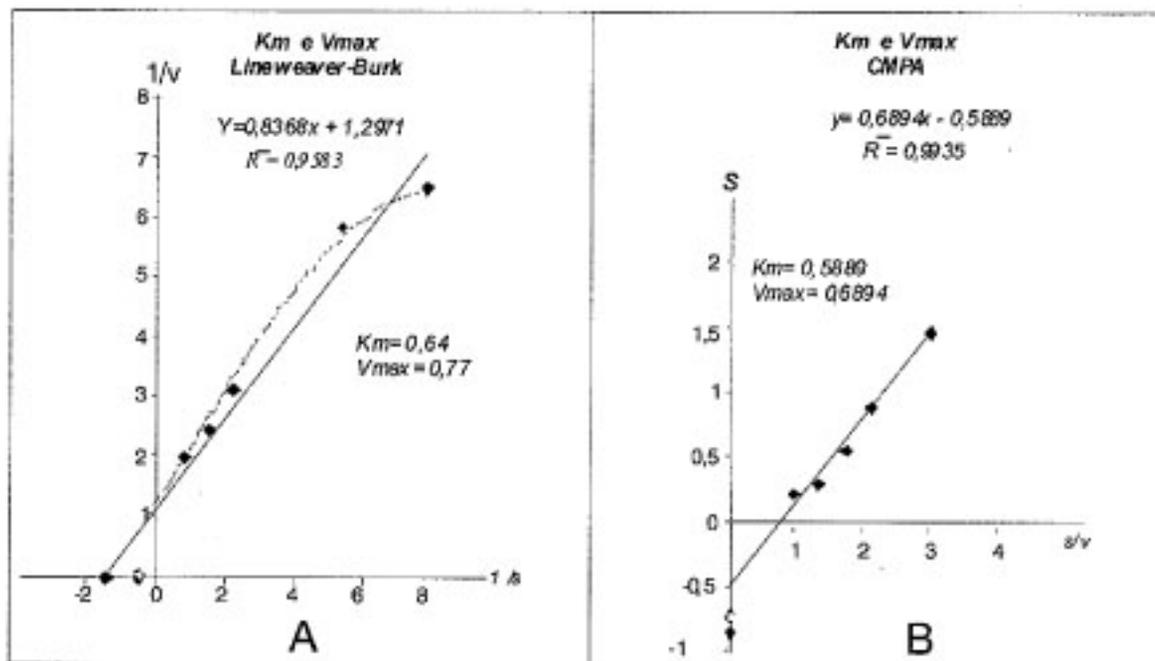
estatística dos resultados.

Valores de Km e Vmax da adenililtransferase com dados da Tabela 3 (WILKINSON, 1961) calculados pela equação CMPA ($Km=0,5889$ e $Vmax= 0,6884$) apresentaram uma diferença de apenas 1,02% para a primeira constante e de 0,084% para a segunda quando comparados com os resultados estatísticos de Wilkinson ($Km=0,595$ e $Vmax 0,69$). Como é possível verificar na Figura 2, os resultados obtidos com a equação de Lineweaver-Burk as variações foram de 7,5% e de 11,5% para Vmax em relação aos achados estatísticos.

Considerações Finais

As médias dos desvios e os desvios das médias mostraram claramente que a equação de Lineweaver-Burk evidencia o maior desvio da média tanto do Km como da Vmax. A mesma equação exige que sejam calculadas as recíprocas das concentrações do substrato e das velocidades das reações no início e no final dos cálculos o que

Figura 2- Determinação do Km e Vmax da nicotinamida adenililtransferase pelas equações de Lineweaver-Burk e CMPA.



Os pontos desviados podem ser desprezados no momento da confecção do gráfico. Além disso, para determinação das duas constantes, é necessário repetir várias vezes o mesmo experimento a fim de permitir uma análise

não ocorre com as outras equações.

Pelas razões apresentadas concordamos com os autores que recomendam o abandono da equação de Lineweaver-Burk para determinação do Km e Vmax.

Referências

- ATKINSON, J. F. *et al.* Nicotinamida Mononucleotide Adenyltransferase of Pig-Liver Nuclei. *Bioch. J.* v. 80, p. 318, 1961.
- BRIGGS, G. F.; HALDANE, J. B. S. A note on kinetics of enzyme action. *Bioch. J.* v. 19, p. 338, 1925.
- DIXON, M. & WEBB, E. C. Note, *Nature*, v. 184, p. 1298, 1959.
- EADIE, G. S. The Inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *J. Biol. Chem.*, v. 146, p. 85, 1942.
- HANES, C. S. CLXVII. Studies on plant amylases. *Bioch. J.* v. 112, p. 1406, 1932.
- HOFSTEE, B. H. On the Evaluation of the Constants V_m and K_m in Enzyme Reactions. *Science*, v. 116, p. 329, 1952.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of Enzyme Dissociation Constant. *J. Amer. Chem. Soc.* V. 56, p. 658, 1934.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. *Die Kinetik der Inhibitinwirkung* *Bioch. Z.* v. 49, 1913. p. 333.
- NEILANDS, J. B.; STUMPF, P. K. *Outlines of Enzyme Chemistry*. New York: John Wiley & Sons Inc, 1958. p. 95-109.
- PANASSE, L. *Les Enzymes: Cinétique et Mécanisme D'Action*. Paris: Masson et Cie, Éditeurs, 1974. p. 24-25.
- WALLACH, J. *Les enzymes*. Paris: Editeur Nathan, 1997.
- WILKINSON, G. N. – Statistical Estimations in Enzyme Kinetics. *Bioch. J.* v. 80, p. 324, 1961.