

## ESTIMATIVA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS $K_m$ E $V_{máx}$ POR UMA APROXIMAÇÃO GRÁFICO-MATEMÁTICA<sup>1/</sup>

Hugo A. Ruiz<sup>2/</sup>

A absorção de íons presentes em soluções de concentração relativamente baixa, pelos vegetais, segue, geralmente, a cinética de Michaelis-Mentem (2), cujo modelo matemático é representado pela equação

$$I = \frac{V_{máx} c}{K_m + c} \quad \text{eq. 1}$$

em que  $I$  é o influxo ou velocidade de absorção do íon ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) numa solução de concentração,  $c$  ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ). Os parâmetros  $V_{máx}$  ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e  $K_m$  ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) representam a velocidade máxima de absorção e a concentração em que a velocidade de absorção corresponde à metade da  $V_{máx}$ , respectivamente.

Para facilitar o cálculo dos parâmetros cinéticos, foram propostas diversas transformações, que permitem obter formas lineares da equação de Michaelis-Mentem. Assim, LINEWEAVER e BURK (4) relacionaram  $1/I$  com  $I/c$  por meio da equação

$$\frac{1}{I} = \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{c} + \frac{1}{V_{máx}} \quad \text{eq. 2}$$

e HOFSTEE (3) estimou  $I$  em relação a  $I/c$ :

$$I = - \frac{I}{c} K_m + V_{máx} \quad \text{eq. 3}$$

<sup>1/</sup> Recebido para publicação em 5-9-1984.

<sup>2/</sup> Departamento de Fitotecnia da U.F.E.S. 29500 Alegre, ES.

Uma representação não-linear foi proposta por CLAASSEN e BARBER (1). Eles caracterizaram a absorção pela velocidade de diminuição da quantidade,  $Q$  ( $\mu\text{mol}$ ), do nutriente na solução. Esse valor depende da concentração,  $c$  ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), e do volume da solução,  $v$  (l), no tempo,  $t$ :

$$Q = c_t v_t$$

eq. 4

A representação gráfica de  $Q$ , em relação ao tempo,  $t$  (h), denota a diminuição da quantidade do fôr em solução com o tempo, em consequência da absorção pela planta. O influxo, em qualquer ponto da curva, será o valor correspondente a  $-dQ/dt$  dividido pela massa radicular; pode-se usar também o comprimento ou superfície da raiz (1). CLAASSEN e BARBER (1) ajustaram  $Q$  vs  $t$  a uma série de funções cúbicas ou parabólicas e estimaram os parâmetros cinéticos. Esses parâmetros podem, também, ser determinados graficamente. Nesse último caso, a declividade da parte de maior comprimento dentro da curva permitirá o cálculo de  $V_{\text{máx}}$  e a tangente, na parte mais curva da mesma curva, com valor equivalente à metade da declividade anteriormente selecionada, determinará  $K_m$ .

Com o objetivo de minimizar as imprecisões devidas a uma estimativa exclusivamente gráfica, foi elaborada uma aproximação matemática para o cálculo dos parâmetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$ .

Os dados usados no cálculo foram obtidos num ensaio de absorção de fósforo, conduzido em câmara de crescimento, usando soja como planta-teste. Nesse ensaio, usou-se uma concentração inicial de fósforo igual a  $32,29 \mu\text{mol l}^{-1}$ , estimando-se a absorção de nutriente pela diminuição da atividade de  $^{32}\text{P}$  na solução, amostrada a cada meia hora. A atividade do  $^{32}\text{P}$  foi corrigida, para o tempo de contagem.

O volume de solução, para cada tempo,  $v_t$ , foi calculado levando em conta o volume inicial,  $v_i$  (0,801 l), o volume após 24 horas,  $v_f$  (0,410 l), o volume amostrado,  $v_a$  (0,026 l = 0,002 l para  $t=0$ , mais 0,001 l a cada meia hora), e uma taxa de transpiração uniforme, uma vez que a iluminação e a temperatura foram mantidas no mesmo nível por 24 horas. Assim, o volume da solução, em litros, foi estimado a cada meia hora, no intervalo de 0 a 12 horas, usando-se a expressão

$$v_t = v_i - 0,002 - \left( \frac{v_i - v_f - v_a}{24} + 0,002 \right) t \quad \text{eq. 5}$$

em que  $t$  é o tempo, em horas.

A concentração, para cada tempo,  $c_t$ , foi calculada pela equação

$$c_t = c_0 \frac{a_t}{a_0} \frac{v_t}{v_0} \quad \text{eq. 6}$$

sendo a a atividade corrigida,  $v$  o volume estimado e os subíndices 0 e  $t$  os tempos zero e  $t$ , respectivamente.

No Quadro 1 apresentam-se os dados de uma repetição desse ensaio, que foram usados no cálculo dos parâmetros cinéticos. A seqüência do ajuste gráfico e matemático foi a seguinte:

a) os valores de  $Q$  vs  $t$  foram representados graficamente (Figura 1);

QUADRO 1 - Radioatividade corrigida (a), volume corrigido estimado (v), concentração (c) e quantidade de fósforo (Q) de uma solução, em relação ao tempo de exaustão (t)

t	a	v	c	Q
h	cpm	ℓ	$\mu\text{mol } \ell^{-1}$	$\mu\text{mol}$
0	4998,8	0,7990	32,29	25,80
0,5	4452,6	0,7904	28,45	22,49
1,0	3490,5	0,7818	22,06	17,25
1,5	3128,8	0,7732	19,56	15,12
2,0	2447,4	0,7646	15,13	11,57
2,5	1747,9	0,7560	10,68	8,08
3,0	1526,6	0,7474	9,22	6,89
3,5	870,6	0,7388	5,20	3,84
4,0	462,2	0,7302	2,73	1,99
4,5	346,2	0,7216	2,02	1,46
5,0	162,5	0,7130	0,94	0,67
5,5	127,2	0,7044	0,72	0,51
6,0	106,8	0,6958	0,60	0,42
6,5	83,4	0,6872	0,46	0,32
7,0	81,0	0,6786	0,44	0,30
7,5	74,1	0,6700	0,40	0,27
8,0	56,8	0,6614	0,30	0,20
8,5	69,5	0,6528	0,37	0,24

- b) na região inicial da curva, onde são observadas as maiores declividades, escolheram-se, em seqüência ininterrupta, os pontos que melhor se ajustaram a uma reta (intervalo 1,0-3,5 horas, no exemplo), determinando-se a equação de regressão linear

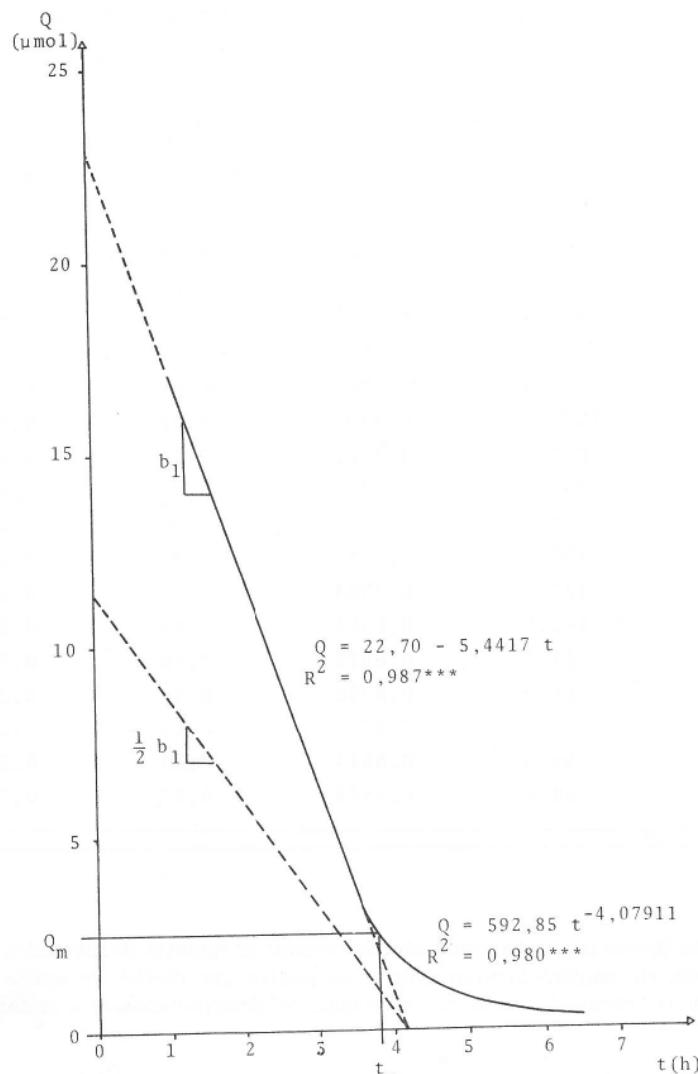
$$Q = a_1 + b_1 t \quad \text{eq. 7}$$

em que  $a_1$  e  $b_1$  são os valores da interseção e declividade, respectivamente;

c) calculou-se  $V_{\text{máx}}$  pela equação

$$V_{\text{máx}} = - \frac{b_1}{M} \quad \text{eq. 8}$$

sendo  $M$  a massa seca da raiz (0,9348 g);



\*\*\* excede o nível de probabilidade de 0,1%

FIGURA 1 - Diminuição da quantidade de fósforo ( $Q$ ) com o tempo de exaustão ( $t$ ) e indicação das equações de regressão usadas para o cálculo dos parâmetros cinéticos.

d) na região curva da parte inferior do gráfico (intervalo 3,5-6,5 horas, no exemplo), determinou-se a equação de regressão com melhor ajuste aos pontos experimentais. Para os dados analisados, a melhor aproximação correspondeu a uma equação potencial:

$$Q = a_2 t^{b_2} \quad \text{eq. 9}$$

sendo  $a_2$  e  $b_2$  o coeficiente e o expoente, respectivamente. O critério de menor soma do quadrado dos desvios (5) foi usado para escolher os pontos da reta e da curva. Considerando que a exaustão é um fenômeno contínuo, usou-se como critério a coincidência do último ponto da reta com o primeiro ponto da curva; e)  $K_m$  foi calculado por uma relação semelhante à equação 4:

$$K_m = \frac{Q_m}{v_m} \quad \text{eq. 10}$$

em que  $Q_m$  é a quantidade de íons para a qual a velocidade de absorção equivale à metade da  $V_{máx}$  e  $v_m$  é o volume de solução correspondente.

$Q_m$  é o ponto da curva da região inferior do gráfico no qual sua tangente iguala-se à metade da declividade da reta usada no cálculo de  $V_{máx}$ . Matematicamente:

$$\frac{1}{2} \frac{d}{dt} (a_1 + b_1 t) = \frac{d}{dt} (a_2 t^{b_2}) \quad \text{eq. 11}$$

$$\frac{1}{2} b_1 = a_2 b_2 t_m^{(b_2 - 1)} \quad \text{eq. 12}$$

sendo  $t_m$  o tempo em que  $Q$  iguala-se a  $Q_m$ . Reordenando:

$$t_m = \left( \frac{b_1}{2 a_2 b_2} \right)^{1/(b_2 - 1)} \quad \text{eq. 13}$$

Calculado  $t_m$ , estimaram-se  $v_m$ ,  $Q_m$  e  $K_m$ , usando as equações 5, 9 e 10, respectivamente.

Os valores numéricos obtidos com os dados apresentados no Quadro 1 foram os seguintes:

equação da reta:  $Q = 22,70 - 5,4417 t \quad R^2 = 0,987***$

equação da curva:  $Q = 592,85 t^{-4,07911} \quad R^2 = 0,980***$

$$V_{máx} = 5,821 \mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$$

$$t_m = 3,81 \text{ h}$$

$$v_m = 0,7334 \text{ l}$$

$$Q_m = 2,5310 \mu\text{mol}$$

$$K_m = 3,451 \mu\text{mol l}^{-1}$$

\*\*\* Excede o nível de probabilidade de 0,1%.

## SUMMARY

(A GRAPHICO-MATHEMATICAL METHOD FOR THE ESTIMATION OF THE KINETIC PARAMETERS,  $K_m$  AND  $V_{max}$ )

A simple mathematical approach is proposed for calculating the kinetic parameters of  $V_{max}$ , the maximum rate of influx, and  $K_m$ , the Michaelis constant. The depletion of a nutrient quantity ( $\mu$ mole) in solution is graphically represented as a function of time, and two regression equations are determined: one linear for the maximum slope region, and the other curvilinear, for the curvilinear region. The negative value of the slope of the linear regression equation divided by root mass represents  $V_{max}$ . By setting equal the first derivative of the curvilinear regression equation with half the slope of the linear regression equation, a time is calculated. This value, introduced in the curvilinear regression equation, permits the estimation of the quantity of nutrient which, when divided by the solution volume, expresses  $K_m$ .

## LITERATURA CITADA

1. CLAASSEN, N. & BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. *Plant Physiol.* 54:564-568. 1974.
2. EPSTEIN, E. *Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas*. São Paulo, Ed. da Universidade de São Paulo, 1975. 433 p.
3. HOFSTEE, B.H.J. On the evaluation of constants  $V_m$  and  $K_m$  in enzyme reactions. *Science* 116:329-333. 1952.
4. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658-666. 1934.
5. NELSON, R.A. & ANDERSON, R.L. Partitioning of soil testcrop response probability. In: PECK, T.R. (ed.). *Soil testing: correlating and interpreting the analytical results*. Madison, ASA, CSSA, SSSA, 1977. 19-38 (ASA Special Publication Number 29).