

CONSIDERAÇÕES REFERENTES À DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS DE ABSORÇÃO (DE FÓSFORO ^{1/}

Alfredo J. Castells ^{2/}

Júlio César Lima Neves ^{3/}

Nairam Félix de Barros ^{3/}

Roberto Ferreira de Novais ^{3/}

Os parâmetros da cinética de absorção iônica — $V_{máx}$ e K_m — têm sido utilizados para caracterizar a eficiência de absorção de nutrientes (11), visando à obtenção de informações que levem à formulação de modelos que simulem a absorção de nutrientes (2, 5, 8, 14), bem como, mais recentemente, para caracterizar a tolerância diferencial de variedades de soja e de outras culturas ao alumínio (1, 4, 15).

Para determinar esses parâmetros cinéticos, tem-se empregado o método proposto por CLAASSEN e BARBER (6), baseado na velocidade de esgotamento do íon da solução nutritiva. Assim, pode-se estabelecer a curva de decréscimo da quantidade (Q) do íon da solução com o tempo (t) de absorção pelo ajuste de diferentes funções matemáticas aos dados experimentais. A partir dessa curva, determinam-se os parâmetros cinéticos, que podem ser também calculados diretamente por gráficos construídos com os dados originais (3).

Outra possibilidade para a obtenção dos parâmetros cinéticos da absorção é o cálculo dos valores da dQ/dt , seguido da determinação do influxo (I) do íon em cada intervalo de amostragem. Os valores de I relacionam-se com os de concentração (c) do íon na solução, usando-se as transformações lineares da equação de Michaelis-Mentem.

RUIZ (12), utilizando o método de CLAASSEN e BARBER (6), propôs um processo gráfico-matemático para que se pudessem obter os parâmetros cinéticos de absorção iônica. A partir de um ajuste gráfico, aplicam-se equações matemáticas

^{1/} Recebido para publicação em 5/9/1984.

^{2/} Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba. 5000, Argentina.

^{3/} Departamento de Solos da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

aos dados de Q vs t (ou c vs t , quando o volume da solução é considerado invariável durante o decorrer do experimento), com diferenciação de duas regiões: a da porção reta e a da curva.

Os parâmetros cinéticos de absorção de fosfato por diversos genótipos de soja, na presença ou ausência de alumínio, foram obtidos por CASTELLS (4) mediante o emprego das transformações lineares da equação de Michaelis-Mentem, propostas por LINEWEAVER-BURK (9) — ($1/I$ vs $1/c$) — por HANES-WOOLF — (c/I vs c) — e por HOFSTEE (6) — (I vs $1/c$), e do método gráfico-matemático proposto por RUIZ (12).

Utilizadas essas transformações lineares, obtiveram-se diferenças nos valores de R^2 das equações e nos valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m . Essas diferenças foram, em alguns casos, mais acentuadas, de acordo com a utilização, ou não, para o ajuste das equações, de alguns valores observados. Em alguns casos, houve inversão da tendência entre os tratamentos, segundo a transformação considerada. Acredita-se que isso tenha acontecido em razão das variações na quantidade de íon na solução, com a qual se calculara o influxo por grama de raiz. Esse fato ocasionou flutuações no valor do influxo nos intervalos de amostragem. Aplicando o método de RUIZ (12), o $V_{m\acute{a}x}$ foi calculado pela declividade da reta — (Q vs t) — considerando um intervalo de tempo de absorção mais prolongado para determinar dQ/dt , e só depois foi feito o cálculo, tendo por base o peso da raiz.

Nos Quadros 1 e 2 vêem-se os dados e os valores calculados de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , respectivamente, da absorção de fosfato pelo genótipo IAC-2, no tratamento sem alumínio, usando as diferentes equações das transformações lineares. Fez-se variar o número de pontos considerados em cada caso, de modo que se obtivesse o maior valor de R^2 . Vêem-se no Quadro 3 as variações nesses parâmetros quando considerados diferentes intervalos de tempo entre amostragens, na etapa inicial de exaustão. As flutuações dos valores de influxo de fosfato nos diferentes intervalos de amostragem provam haver necessidade de grande cuidado quando se trabalha com essa forma de cálculo, uma vez que podem ocorrer variações que são conseqüências próprias do manuseio, da metodologia analítica e do material genético em estudo. NYE e TINKER (10) indicaram que raramente se encontra bom ajuste na secção reta nos gráficos de Hofstee. Isso pode ser conseqüência da técnica empregada, que assim não seria, em todos os casos, adequada aos requisitos desse tipo de experimento. Considerando a morfologia das raízes, os efeitos dos tratamentos sobre elas são muito importantes, pois, segundo CANAL e MIELNICZUK (3), o efeito negativo do alumínio, por exemplo, sobre a absorção de potássio por plantas de milho não se refletiu na alteração dos parâmetros de absorção, mas na inibição do crescimento radicular. Eles encontraram diferenças na taxa máxima de absorção de potássio, quando expressa por unidade de comprimento de raiz, porém, quando ela foi relacionada com o volume da raiz, os valores de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m não se diferenciaram significativamente, para plantas cultivadas com e sem alumínio. Neste trabalho, foi observado que o alumínio causou o engrossamento das raízes, o que aumentou a área de absorção por unidade de comprimento radicular, área que foi ainda maior quando não apenas a superfície externa foi considerada área ativa de absorção das raízes. Isso concorda com o trabalho de RUSSELL e SANDERSON (13), que encontraram que a taxa de absorção de fósforo, em solução nutritiva, esteve mais relacionada com o volume radicular do que com a área superficial, sugerindo que o parâmetro estimado com base no peso da matéria fresca pode ser escolhido para expressar a taxa de absorção. O peso de matéria fresca é outro parâmetro cuja medida está, aparentemente, longe de ser precisa.

Essas considerações ressaltam a aplicabilidade e conveniência do método gráfico-matemático adaptado por RUIZ (12), em razão da grande variabilidade, para

QUADRO 1 - Concentração de fósforo na solução determinada nos diferentes períodos de amostragens e valores calculados do influxo de fósforo para o genótipo IAC-2, no tratamento sem alumínio

Tempo	Conc. P	Volume	Quantidade P	ΔQ	$\Delta Q/t$	Influxo P 1/	Influxo P 2/
	μM	ml	μmol	μmol	$\mu mol \cdot h^{-1}$	$\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	$\mu mol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$
0,0	21,150	1499,00	31,704	-	-	-	-
0,5	19,192	1492,45	28,643	3,061	6,122	0,452	-
1,0	17,601	1484,90	26,136	2,507	5,104	0,370	0,411
1,5	15,581	1477,35	23,019	3,117	6,234	0,460	0,460
2,0	14,603	1469,80	21,462	1,557	3,114	0,230	-
2,5	12,216	1462,25	17,863	3,599	7,198	0,531	0,381
3,0	10,235	1454,70	14,889	2,948	5,948	0,439	0,439
4,0	6,410	1441,60	9,241	5,648	5,648	0,417	0,417
5,0	4,085	1428,50	5,835	3,406	3,406	0,251	0,251
6,0	2,027	1415,40	2,869	2,966	2,966	0,219	0,219
6,5	1,193	1407,85	1,679	1,190	2,380	0,176	0,176
7,0	0,834	1400,30	1,168	0,510	1,022	0,075	0,075
7,5	0,520	1392,75	0,724	0,444	0,888	0,066	0,066
8,0	0,551	1385,20	0,763	-	-	-	-
8,5	0,344	1377,65	0,473	0,290	0,580	0,043	0,043
9,0	0,260	1370,10	0,356	0,117	0,234	0,017	0,017

1/ Excluiu-se o valor de influxo correspondente ao tempo de oito horas de absorção.

2/ Excluíram-se os influxos correspondentes aos tempos de meia, uma e meia e oito horas de absorção.

FONTE: CASTELLS (4).

QUADRO 2 - Determinação dos valores de V_{\max} e K_m de fósforo, mediante o emprego de diferentes métodos e transformações da equação matemática de Michaelis-Menten, para o genótipo IAC-2, no tratamento sem alumínio^{1/}

Tempo de amostragem (h)	Equação de ajuste	R^2	V_{\max} ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K_m (μM)
GRÁFICO MATEMÁTICO:				
(0 - 5)	$Q = 31,355074 - 5,302752 t$	0,995**		
(5 - 9 sem oitava hora)	$Q = 16001,54045 \cdot t^{-4,890995}$	0,993**	0,3913	2,1925
LINEWEAVER-BURK:				
(0,5 - 7,5)	$1/I = 1,878759 + 7,278934 \cdot 1/C$	0,916**	0,5323	3,8743
(0,5 - 7,5 sem segunda hora)	$1/I = 1,620014 + 7,402325 \cdot 1/C$	0,953**	0,6173	4,5693
HANES-WOOLF:				
(0,5 - 6,5)	$C/I = 3,765926 + 2,362478 \cdot C$	0,714**	0,4233	1,5941
(0,5 - 6,5 sem segunda hora)	$C/I = 4,377078 + 1,992877 \cdot C$	0,940**	0,5018	2,1964
HOFSTEE:				
(0,5 - 6,5)	$I = 0,452162 - 1,749594 \cdot 1/C$	0,353 ^{ns}	0,4522	1,7496
(0,5 - 6,5 sem segunda hora)	$I = 0,510159 - 2,353302 \cdot 1/C$	0,649**	0,5102	2,3533

^{1/} Dados do influxo da coluna 1 do Quadro 1.

** Significativo a 1% de probabilidade.

ns Não significativo.

FONTE: CASTELLS (4).

QUADRO 3 - Determinação dos valores de V_{\max} e K_m de fósforo, mediante o emprego de diferentes métodos e transformações da equação matemática de Michaelis-Menten, para o genótipo IAC-2, no tratamento sem alumínio^{1/}

Tempo de amostragem (h)	Equação de ajuste	R^2	V_{\max} ($\mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	K_m (μM)
GRÁFICO MATEMÁTICO:				
(0 - 5)	$Q = 31,236867 - 5,292416 t$	0,995**		
(5 - 9)	$Q = 13,471,377290 t^{-4},788983$	0,986**	0,3906	2,1174
(0 - 5)	$Q = 31,236867 - 5,292416 t$	0,995**		
(5 - 9 sem oitava hora)	$Q = 16,001,54045 t^{-4},890995$	0,993**	0,3906	2,1890
LINEWEAVER-BURK				
(1,0 - 7,0)	$1/I = 1,447054 + 8,183745 \cdot 1/C$	0,873**	0,6019	4,4380
(1,0 - 7,5)	$1/I = 1,661426 + 7,373428 \cdot 1/C$	0,930**	0,6910	5,6552
HANES-WOOLF:				
(1,0 - 6,5)	$C/I = 4,872462 + 2,029984 \cdot C$	0,966**	0,4926	2,4002
HOFSTEE:				
(1 - 6,5)	$I = 0,483953 - 2,196150 \cdot 1/C$	0,743**	0,4839	2,1961

^{1/} Dados do influxo da coluna 2 do Quadro 1.

** Significativo a 1% de probabilidade.

FONTE: CASTELLS (4).

uma mesma condição, dos valores dos parâmetros cinéticos calculados pelas transformações lineares da equação de Michaelis-Mentem, como demonstrado neste trabalho (Quadros 1, 2 e 3).

SUMMARY

(CONSIDERATIONS OF THE DETERMINATION OF KINETIC PARAMETERS FOR THE ABSORPTION OF PHOSPHORUS)

Considerations are given to the determination of kinetic parameters of phosphorus uptake by soybean plants. Estimating kinetic parameters of P uptake, such as V_{max} and K_m , using models as those proposed by Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, and Hofstee have resulted in erratic values. These errors are obtained whether all observed points, particularly those corresponding to the initial phase of the uptake period, are included or deleted. Some possible reasons for this fact are discussed. Equations for estimating the kinetic parameters by use of these models are presented. In order to overcome this problem, the use of a graphic-mathematical approach is suggested, which permits the estimation of consistent values of V_{max} and K_m of P uptake by soybean plants.

LITERATURA CITADA

1. ALVES, V.M.C. *Efeito do alumínio sobre a cinética de absorção e translocação de fosfato e sobre o crescimento e composição mineral de dois cultivares de trigo*. Viçosa, U.F.V., 1984. 45 p. (Tese M.S.).
2. ANGHINONI, I. & BARBER, S.A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. *Agron. J.* 72:685-688. 1980.
3. CANAL, I.N. & MIELNICZUK, J. Parâmetros de absorção de potássio em milho (*Zea mays* L.), afetados pela interação alumínio-cálcio. *Ciência e Cultura* 35:336-340, 1983.
4. CASTELLS, A. *Absorção de fósforo e de cálcio como critério de seleção de genótipos de soja (Glycine max (L.) Merrill) quanto à tolerância ao alumínio*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1984. 62 p. (Tese M.S.).
5. CLAASSEN, N. *Development and verification using measured soil and plant parameters of a mathematical model for nutrient flux to plant roots growing in soil*. Purdue University, 1975. 157 p. (Ph.D. Dissertation).
6. 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.
7. HOFSTEE, B.H.J. On the evaluation of constant V_m and K_m in enzyme reactions. *Science* 116:329-333. 1952.
8. JUNCK, A. & BARBER, S.A. Plant age and the phosphorus uptake characteristics of trimmed and untrimmed corn roots systems. *Plant Soil* 42: 227-239. 1975.

9. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56:658-666. 1934.
10. NYE, P.H. & TINKER, P.B. *Solute movement in the soil-root systems*. Studies in Ecology — Vol. 4 Berkeley, University of California Press, 1977. 342 p.
11. OLIVEIRA, R.F. & MIELNICZUK, J. Caracterização de três cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) quanto à eficiência de absorção e utilização de K. *Agron. Sulriogr.* 14:251-260. 1978.
12. RUIZ, H. Estimativa dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ por uma aproximação gráfico-matemática. *Rev. Ceres* 32:79-84. 1985.
13. RUSSELL, R.S. & SANDERSON, J. Nutrient uptake by different parts of the intact roots of plants. *J. Exp. Bot.* 18:491-508. 1967.
14. SCHENK, M.K. & BARBER, S.A. Potassium and phosphorus uptake by corn genotypes grown in the field as influenced by root characteristics. *Plant Soil* 54:65-76. 1980.
15. VILELA, L. & ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de soja afetados pela interação alumínio-fósforo. *R. Bras. Ci. Solo* 8:91-96. 1984.