

ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE DE BATATA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATO SEGUNDO A CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN

Ivo Henrique Pinto Andrade¹; José Ailton Conceição Bispo²; Marília Lordelo Cardoso Silva³;

¹ Bolsista PIBITI/CNPq, Graduando em Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia (DTEC), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), CP 252/294, Feira de Santana, Ba, CEP 44036-900, Brasil, email: ivo_henriquee@hotmail.com

² Orientador, Departamento de Tecnologia (DTEC), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), CP 252/294, Feira de Santana, Ba, CEP 44036-900, Brasil, email: ailton_bispo@hotmail.com

³ Participante, Departamento de Tecnologia (DTEC), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), CP 252/294, Feira de Santana, Ba, CEP 44036-900, Brasil, email: lilaengal@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Teoria de Transição, Processos enzimáticos, Proporção enzima-substrato.

INTRODUÇÃO

Peroxidases são enzimas existentes em células vegetais e animais, capazes de oxidar diferentes compostos na presença de peróxidos, gerando radicais livres (KOBLOITZ, 2010). Em muitos casos o produto da oxidação é colorido e serve como base para a determinação colorimétrica da atividade da peroxidase (BRITO ET AL., 2005). O campo de pesquisa com foco de ação da enzima tem merecido a tentativa de vários grupos desde os primeiros trabalhos realizados por Bohr, Henry, Michaelis-Menten e muitos outros em quase um século atrás (Cornish-Bowden, A., 2012). Estudos realizados por Michaelis-Menten (1913) relativos ao modelo cinético consistem na formação de um estado complexo entre o substrato (S) e da enzima (E), complexo (s), seguido de um lento passo em que o complexo é submetido ao produto (P) e enzima livre em um processo unidirecional, uma vez que a cinética é descrita para o processo inicial, com a presença de produtos negligenciada. Tais estudos têm estendido o processo de modelagem cinética enzimática com implicações no crescimento microbiano (Monod, J. 1949). No entanto, como se observa em Bispo et al. (2011), estes resultados são limitados à condição de estado estacionário e a situações em que as proporções de concentração de enzima-substrato são muito baixas. Os resultados obtidos expandiram a teoria de transição estrutural (que exclui as restrições do modelo Michaelis-Menten de: Estado estacionário e de situações em que as proporções de concentração de enzima-substrato são muito baixas), conduzindo a uma ferramenta poderosa para prever o comportamento cinético de outros processos enzimáticos em condições não descritas antes.

METODOLOGIA

O processo de ação da enzima foi investigado, sendo a fonte enzimática utilizada, proveniente de batatas maduras. Estas foram cortadas em cubos, passadas em multiprocessador com solução de NaCl em tampão pH = 6.0 e o extrato enzimático adquirido foi filtrado. Foram feitas análises espectrofotométricas da reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio (em tampão pH = 6.5), catalisada pela peroxidase, em comprimento de onda de 470 nm, mantendo fixo o peróxido e variando a concentração do guaiacol. Os dados de absorbância foram então coletados até um tempo de 3 minutos, em intervalos de 10 segundos, e utilizados para simulação numérica.

O modelo clássico de Michaelis e Menten (1913) foi recentemente ampliado para situações cinéticas para além da condição de estado estacionário (Bispo, JAC et al., 2011). Apesar desta recente expansão, uma limitação é que a curva de formação de produto em função do tempo, ao invés de ser linear, como no modelo de Michaelis-Menten, ou exponencial, como em Bispo et al. (2011), se deu efetivamente hiperbólica, como observado em Bispo et al. (2013a). Numa tentativa para resolver esta limitação, melhorar a caracterização deste modelo e aumentar a possibilidade de prever estas situações, foi proposta uma equação baseada na transição entre as duas estruturas de enzimas de baixa (L) e alta (H) afinidade com o substrato em solução, a qual é:

$$x_{1H}(t) = \frac{P_H}{(P_H - P_L)} \left(c_{ET} - \frac{c_{EL}}{f_L(t)} \right) + f_H(t)P(t)$$

Em que, $x_{1H}(t)$ é a extensão líquida da reação para a formação do complexo da espécie de alta afinidade com o substrato em relação ao tempo, P_H é o produto gerado pelas espécies de alta afinidade pelo substrato, P_L o produto gerado pelas espécies de baixa afinidade, c_{ET} é a concentração total de enzima, c_{EL} a concentração inicial de enzima no estado de baixa tendência, $f_H(t)$ a fração de enzima livre no estado de alta afinidade com o substrato em relação ao tempo, $f_L(t)$ a fração no estado de baixa afinidade em relação ao tempo e $P(t)$ o produto gerado em relação ao tempo.

RESULTADOS

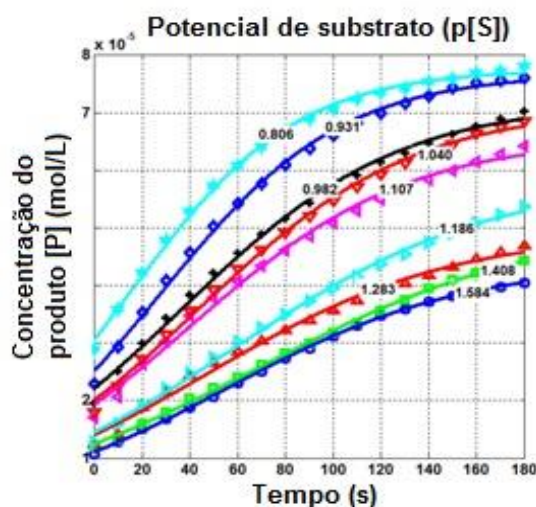


Figura 1: Dados experimentais para a formação de produto em função do tempo em diferentes potenciais de substrato ($p[S] = -\log([S])$).

A Figura 1 mostra o ajuste não linear (linhas) dos resultados experimentais em cada condição de potencial de substrato definida como $p[S] = -\log[S]$. O coeficiente de determinação (R^2) obtido a partir desses ajustes não lineares foram todos $>0,967$, indicando uma boa concordância entre o modelo proposto por Bispo et al. (2011), e os dados experimentais. De uma forma geral, com o aumento da concentração do guaiacol, mantendo a concentração do peróxido constante, a absorbância aumenta com o tempo, ou seja, a atividade da peroxidase aumenta.

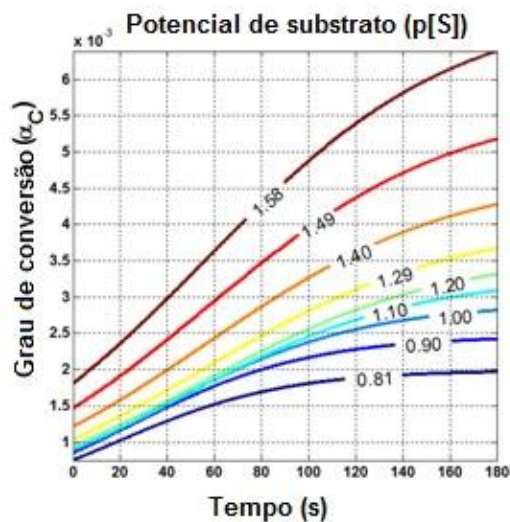


Figura 2: Grau médio de conversão (α_c) de substrato em produto como uma função do potencial de substrato e tempo de reação.

A figura 2 mostra que, para as condições experimentais consideradas, a eficiência desta enzima foi muito baixa, indicando baixa atividade, especialmente a uma concentração elevada de substrato ou de baixos valores de $p[S]$. Esta descoberta sugeriu que a elevada concentração de substrato atuou como um inibidor.

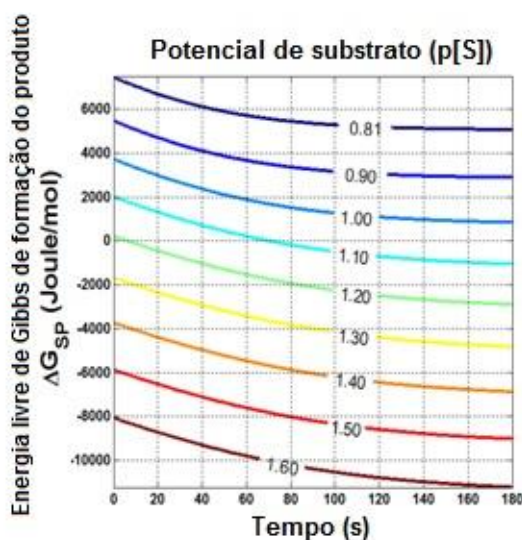


Figura 3: Linhas de Nível de ΔG_{sp} versus o tempo de reação dos diferentes potenciais de substrato. ($p[S]$).

A variação da energia livre de Gibbs de formação do produto é mostrada na Figura 3. Para valores de $p[S] < 1$ o processo de formação do produto não foi espontâneo

($\Delta G_{SP} > 0$) ao longo de todos os intervalos de tempo observados. Como o $p[S]$ aumentou, a formação de substrato se tornou mais espontânea, corroborando a observação inicial de que o substrato funciona como um inibidor.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram claramente que a inibição induzida pelo substrato deve ser levada conta durante a otimização de processos, sendo que essa inibição provocada não é considerada no modelo clássico de Michaelis-Menten. Esta abordagem não requer essas restrições e mostrou que a ideia de que a alta concentração de substrato permite uma aproximação com as condições ideais para a ação da enzima não é necessariamente verdade, pelo menos para algumas enzimas. É uma importante consideração na compreensão dos mecanismos de ação das enzimas e para a concepção de equipamentos e processos laboratoriais e industriais.

REFERÊNCIAS

Bispo, J. A. C., Bonafe, C. F. S., de Souza, V. B., Silva, J. B. A., & Carvalho, G. B. M. (2011). Extending the kinetic solution of the classic Michaelis-Menten model of enzyme action. *Journal of Mathematical Chemistry*, 49(9), 1976-1995.

Bispo, J. A. C., Bonafe, C. F. S., Koblitz, M. G. B., Silva, C. G. S., & Souza, A. R. (2013a). Substrate and enzyme concentration dependence of the Henri–Michaelis–Menten model probed by numerical simulation. *Journal of Mathematical Chemistry*, 51(1), 144-152.

BRITO, Carlos Alexandre Koguish de; SATO, Hélia Harumi; SPIRONELLO, Ademar and SIQUEIRA, Walter José. *Características da atividade da peroxidase de abacaxis (Ananas comosus (L.) Merrill) da cultivar IAC Gomo-de-mel e do clone IAC-1. Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.25, p. 244-249, 2005.

Cornish-Bowden, A. (2012). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 4th edition. Wiley-Blackwell.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Michaelis, L. and Menten M.L., *Biochem. Z.* **49**, 333 (1913)

Monod, J.. The growth of bacterial cultures. *Ann. Review of Microbiol.* Vol.3, p. 371-394 (1949).