Representações gráficas de dados de cinética enzimática

Representação directa dos dados

$$v = \frac{V_{\max}[\mathrm{A}]}{K_{\mathrm{m}} + [\mathrm{A}]}$$

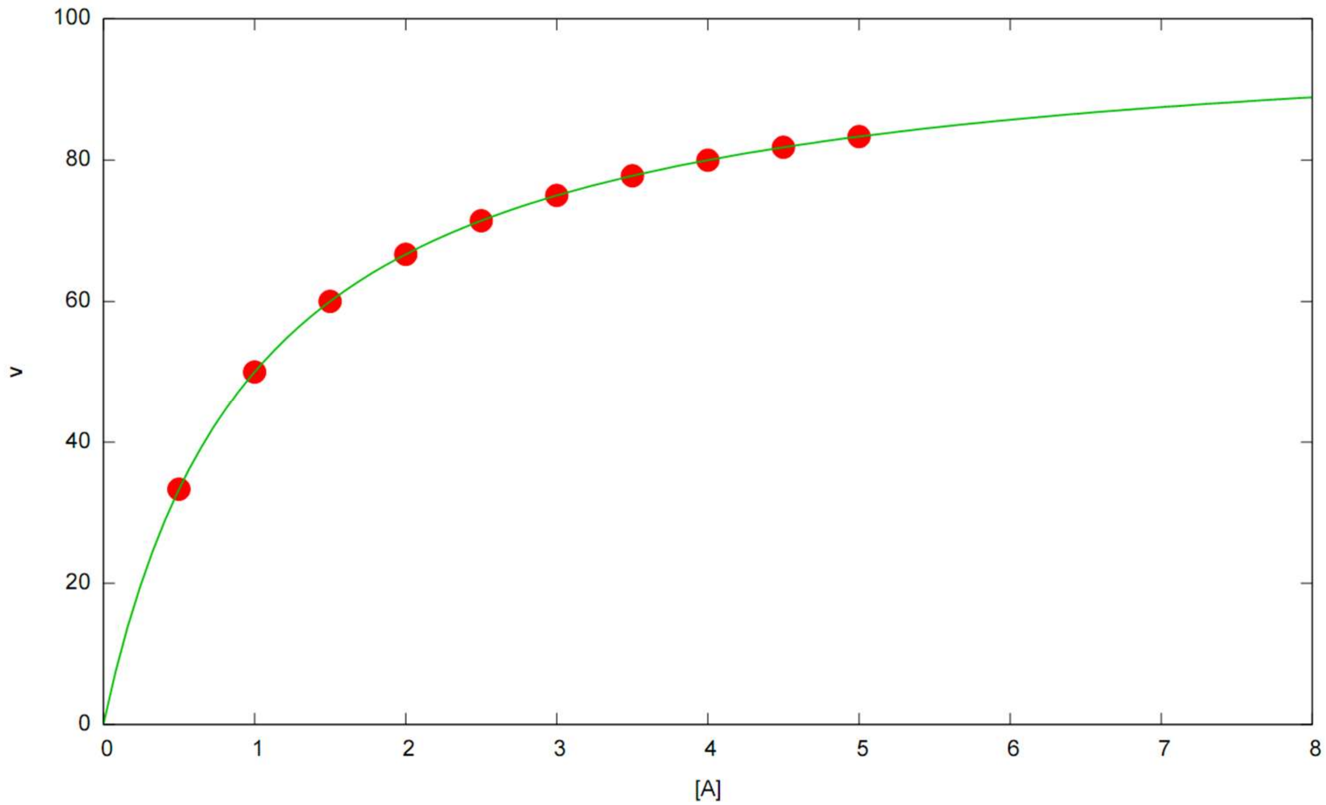


Gráfico de Lineweaver-Burke

$$v = \frac{V_{max}[A]}{K_m + [A]} \Rightarrow \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Tomando o inverso de ambos os membros

$$Y = m \cdot X + b$$

$m = K_m / V_{max}$

$b = 1/V_{max}$

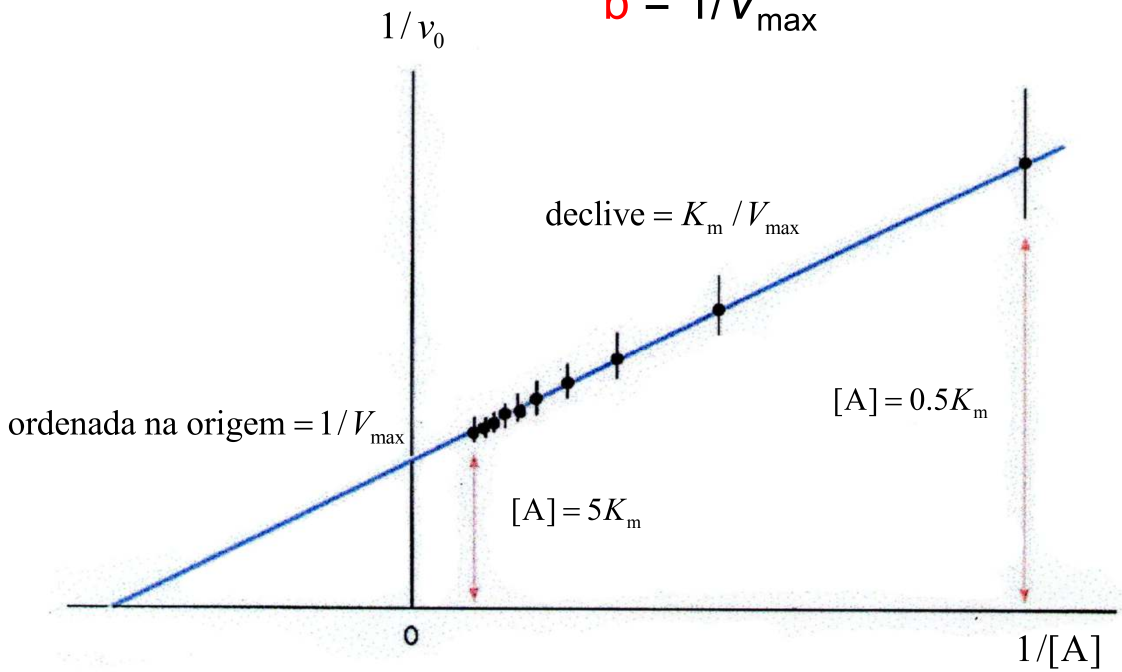


Gráfico de Lineweaver-Burke

Vantagens:

- Representação mais familiar
- Observação fácil dos mecanismos de inibição
- *v* e [A] separados

Desvantagens:

- Distorção do erro inversamente proporcional a [A]
- Mascara os desvios à cinética Michaeliana
- Sensível a "outliers"
- A regressão linear *correcta* tem que ser pesada

Gráfico de Hanes-Woolf

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \Rightarrow \quad \frac{[A]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{[A]}{V_{max}}$$

Multiplicando ambos os membros por [A]

$$Y = m \cdot X + b$$

$m = 1/V_{max}$

$b = K_m / V_{max}$

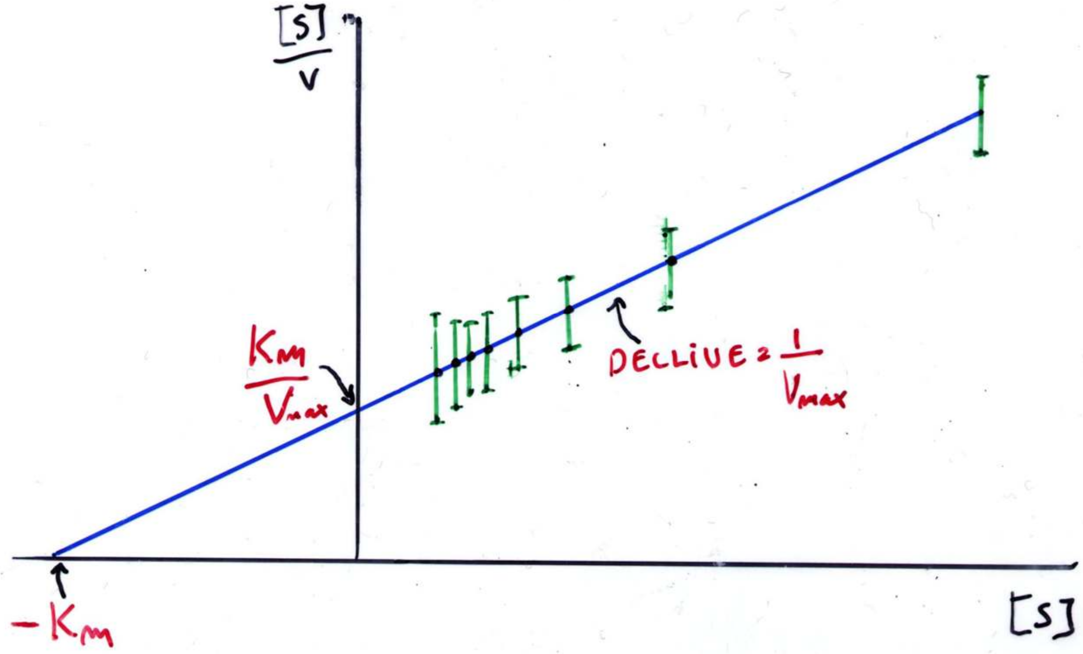


Gráfico de Hanes-Woolf

Vantagens:

- O erro nas observações quase não é distorcido ao longo do eixo dos *xx*
- Os valores de concentração são representados directamente no gráfico

Desvantagens:

- [A] nos dois eixos provoca falsas correlações
- O erro dos pontos “explode” para valores próximos da origem

Gráfico de Eadie-Hofstee

$$\frac{1}{v}=\frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[A]}+\frac{1}{V_{max}} \Rightarrow V_{max}=\frac{vK_m}{[A]}+v \Rightarrow \boxed{v=-\frac{v}{[A]}K_m+V_{max}}$$

Multiplicando ambos os membros por vV_{max}

$$Y = m \cdot X + b$$

$m = -K_m$

$b = V_{max}$

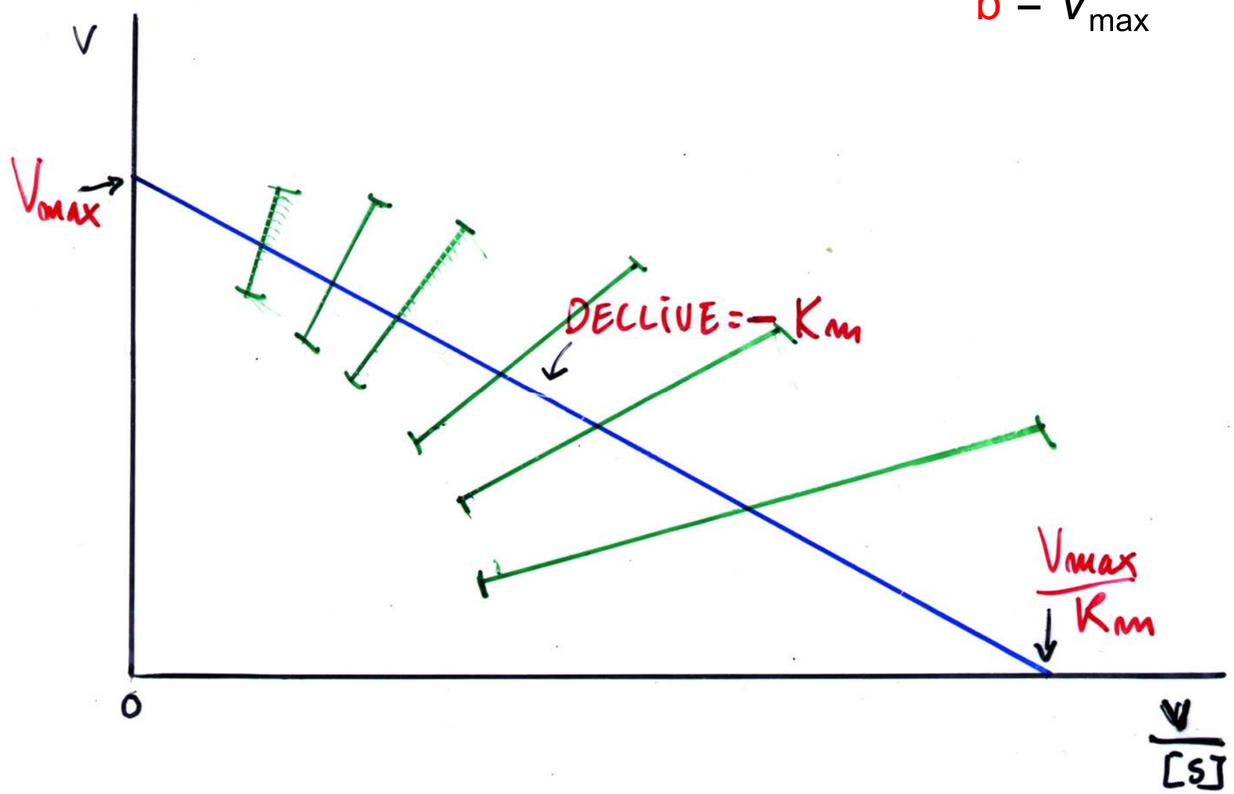


Gráfico de Eadie-Hofstee

Vantagens:

• Erro da velocidade presente em ambos os eixos torna este gráfico muito sensível a desvios à cinética Michaeliana

• O intervalo $[0, V_{max}]$ é directamente representável no eixo dos yy

Desvantagens:

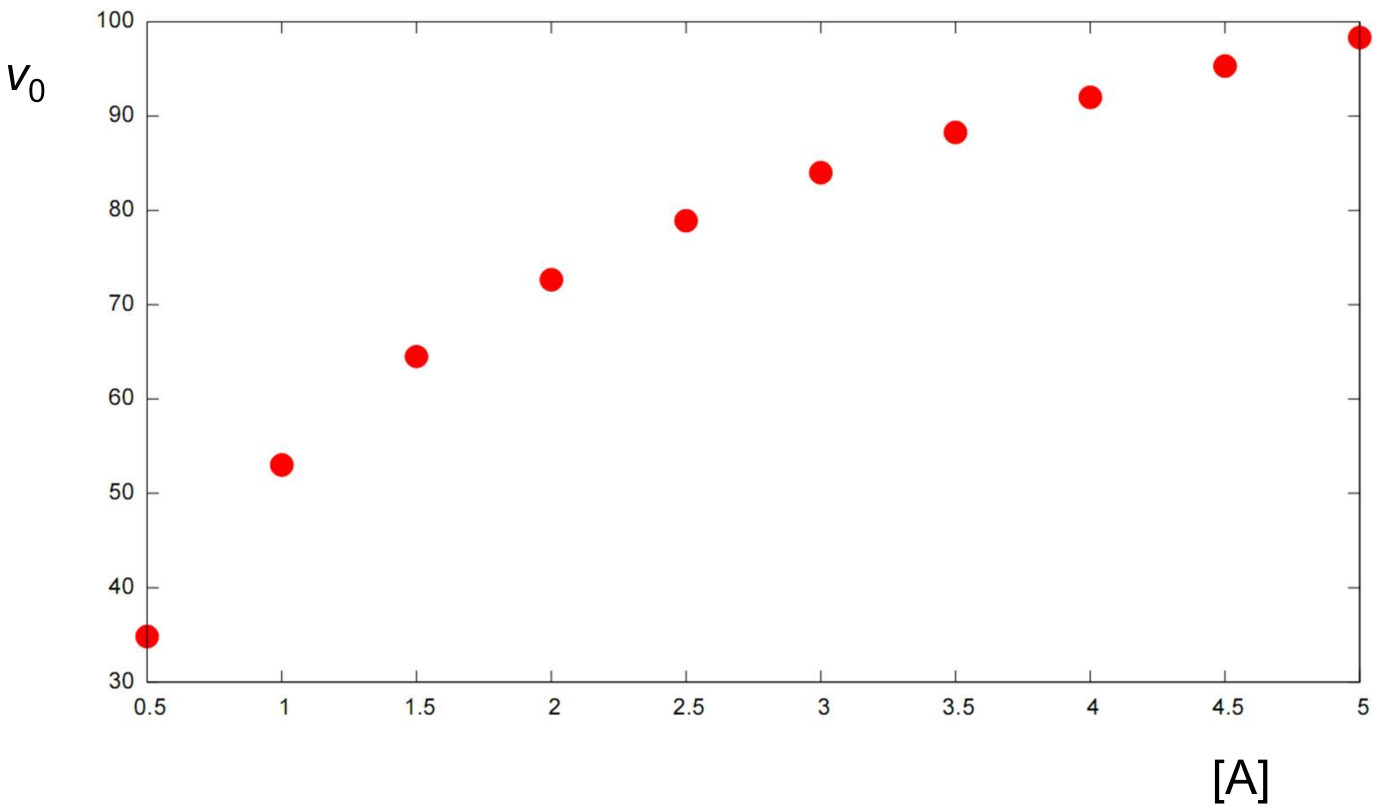
• Distorção do erro, barras de erro não parelas aos eixos

• Erro das observações nos dois eixos torna impossível de aplicar a versão mais habitual do método dos mínimos quadrados

Detecção de desvios sistemáticos à cinética Michaeliana

A detecção de desvios sistemáticos à cinética de Michaeliana pode ser difícil, sobretudo se for usado um método inaproriado.

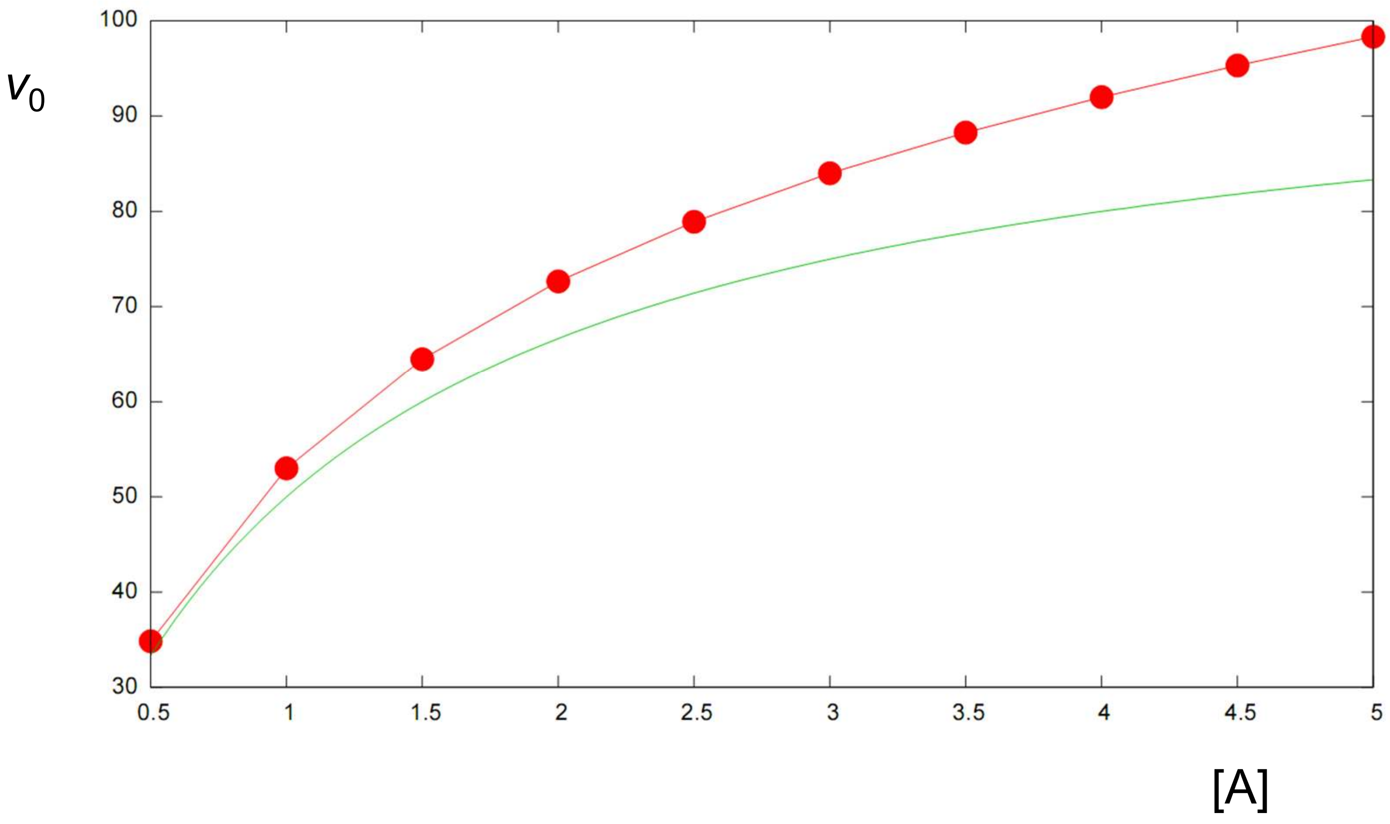
Consideremos o seguinte conjunto de valores de v_0 em função de [A]:



Detecção de desvios sistemáticos à cinética Michaeliana

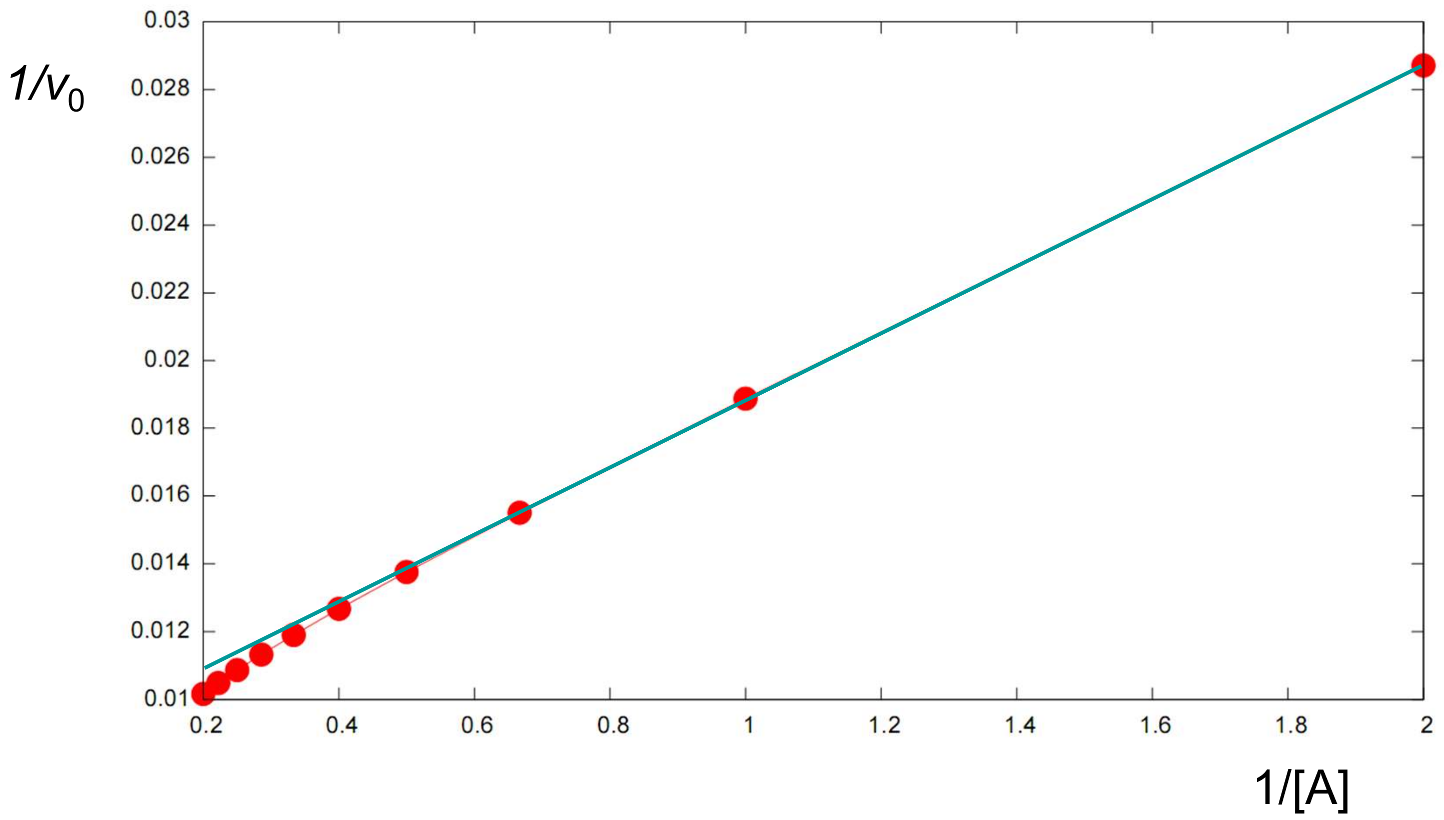
A simples inspecção visual do gráfico não nos permite prever o acentuado desvio à cinética Michaeliana.

A linha verde corespondo ao “verdadeiro” comportamento Michaeliano do enzima, na ausência de perturbação:



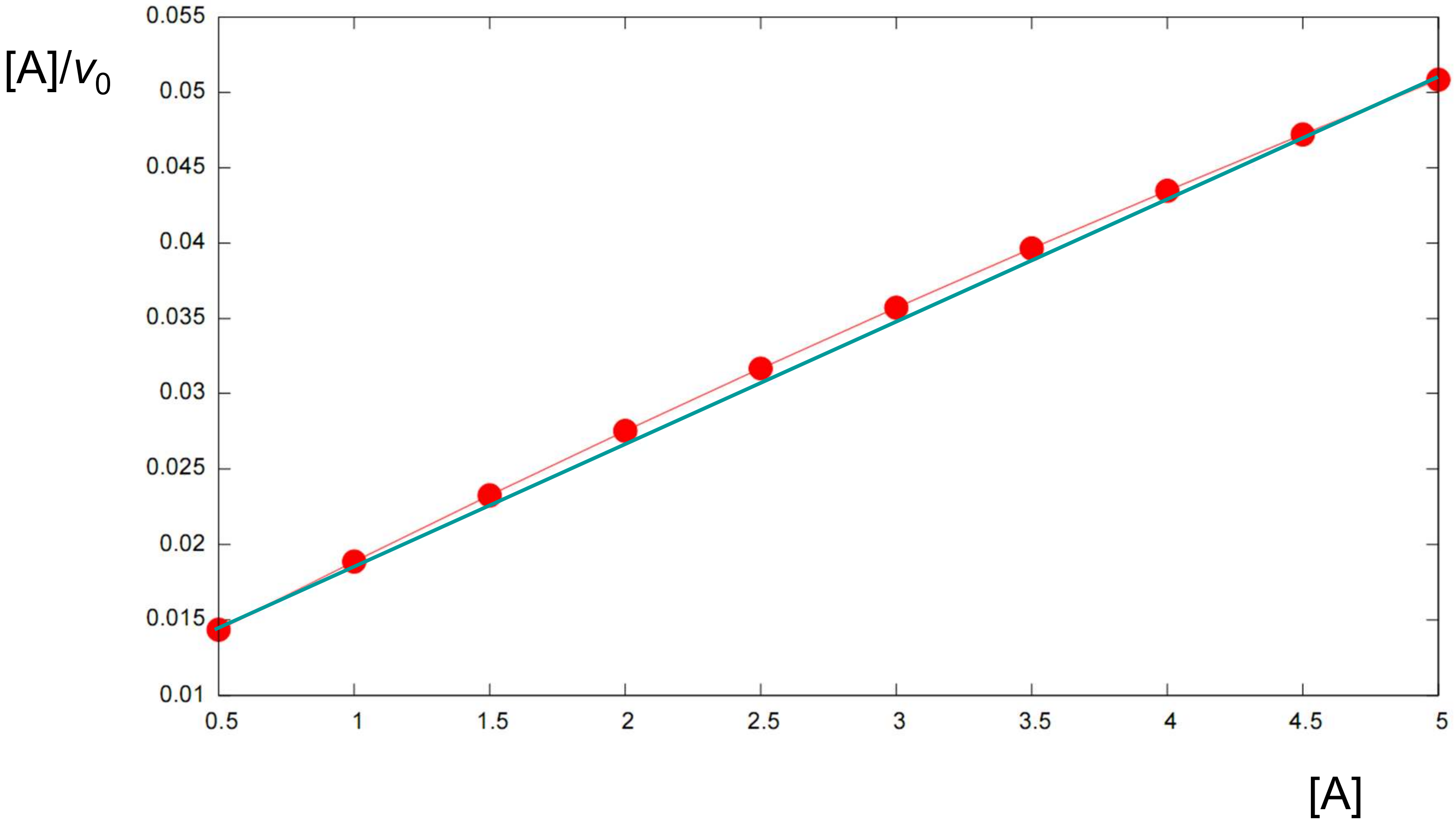
Detecção de desvios sistemáticos à cinética Michaeliana

A transformação de Lineweaver-Burke dificilmente permite suspeitar da anomalia - o desvio da linearidade ocorre muito próximo da origem e a compressão das variâncias mascara o erro.



Detecção de desvios sistemáticos à cinética Michaeliana

A transformação de Hanes-Woolf também mascara o erro e o e o desvio da linearidade é bastante ligeiro:



Detecção de desvios sistemáticos à cinética Michaeliana

A transformação de Eadie-Hofstee, graças à presença dos valores de v_0 nos dois eixos, revela um desvio da linearidade bastante maior:

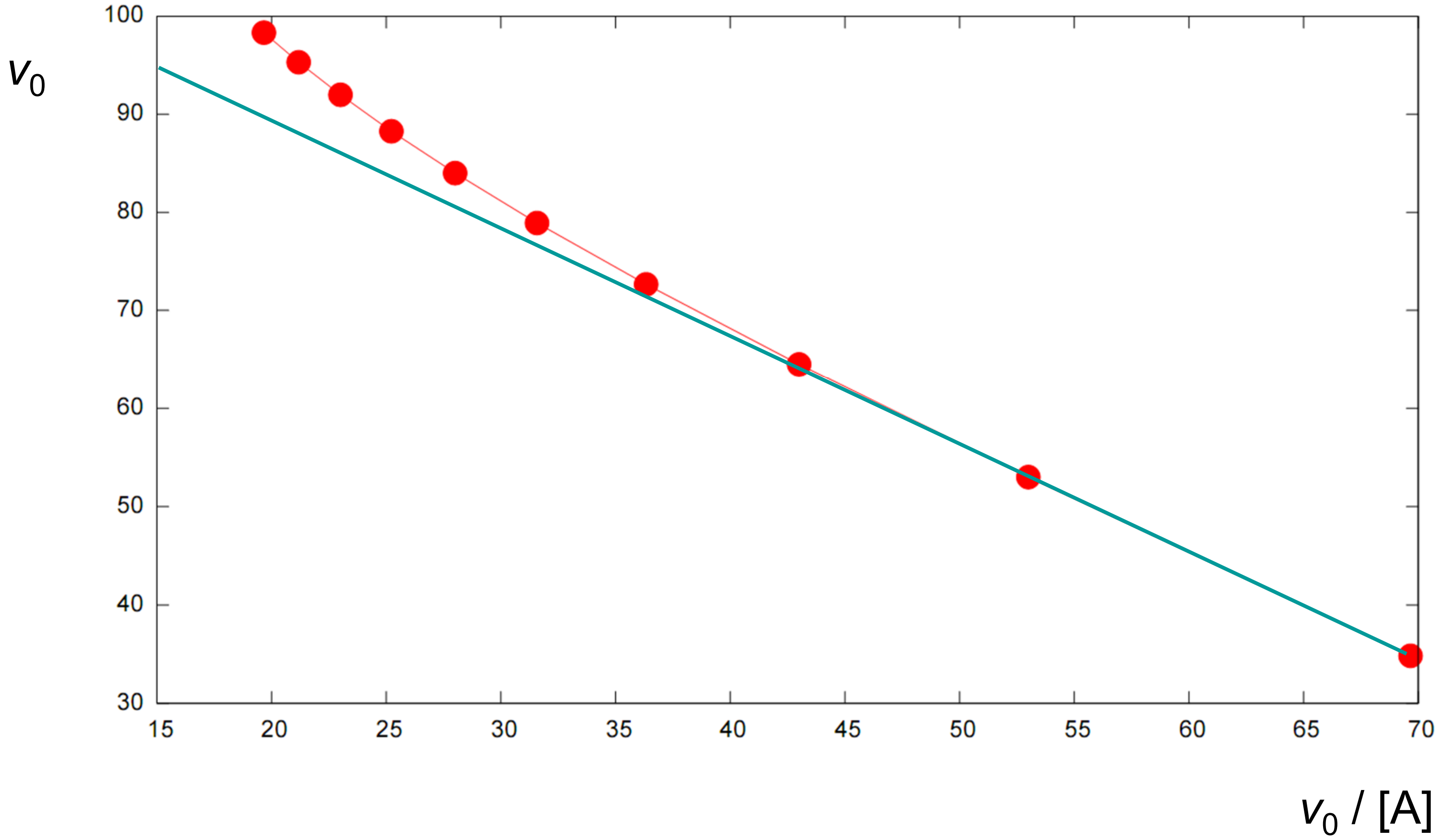


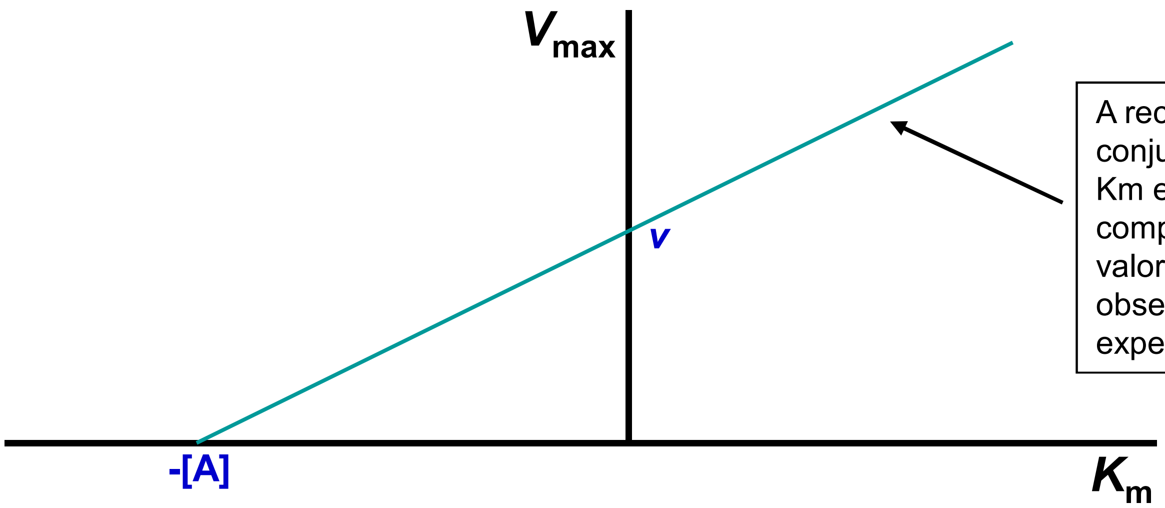
Gráfico de Eisenthal-Cornish-Bowden (gráfico linear directo)

$$v = \frac{V_{\max}[\mathrm{A}]}{K_{\mathrm{m}} + [\mathrm{A}]} \quad \Rightarrow \quad V_{\max} = v + \frac{v}{[\mathrm{A}]} K_{\mathrm{m}}$$

Inversão das variáveis dependentes e independentes. A equação

$$V_{\max} = v + \frac{v}{[\mathrm{A}]} K_{\mathrm{m}}$$

Pode ser vista como uma recta de V_{max} em função de K_m, com declive v/[A], ordenada na origem v e abcissa na origem -[A] :



A recta corresponde ao conjunto de valores de Km e Vmax que são compatíveis com os valores de *v* e [A] observados experimentalmente.

Gráfico de Eisenthal-Cornish-Bowden (gráfico linear directo)

Existe um único par de valores (Vmax, Km) compatível com duas observações experimentais. Este par de valores corresponde ao ponto de intersecção das duas rectas no gráfico linear directo:

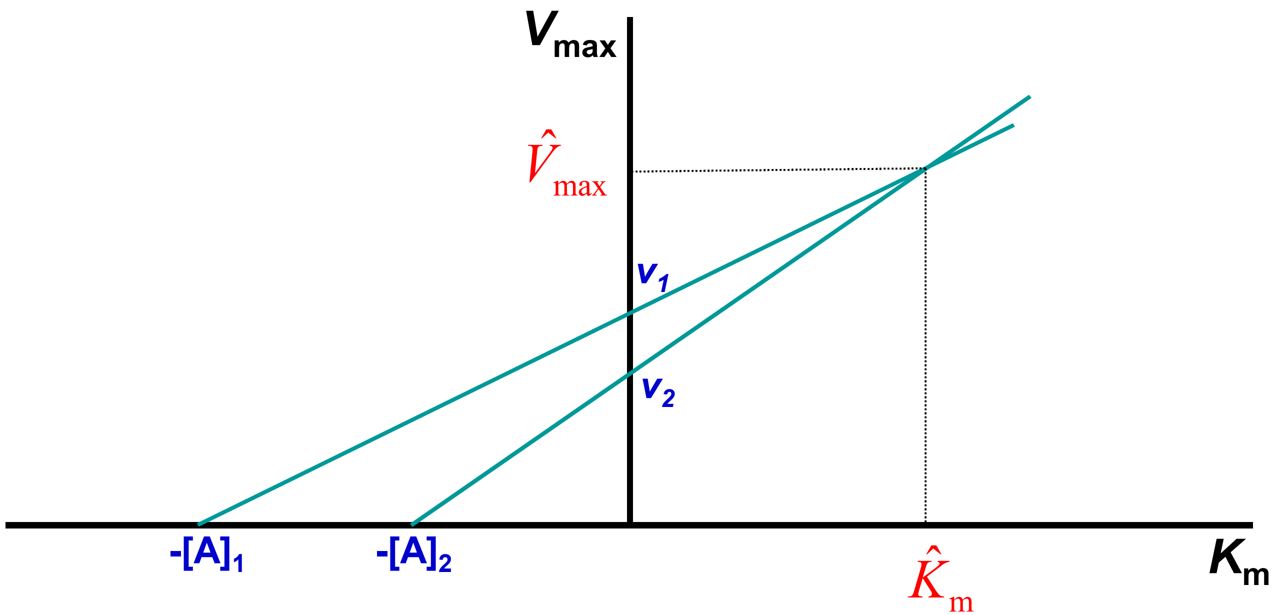


Gráfico de Eisenthal-Cornish-Bowden
(gráfico linear directo)

Para três medições experimentais, e *na ausência de erro* (situação hipotética), as 3 rectas teriam como ponto de intersecção o valor "verdadeiro" de Vmax e Km.

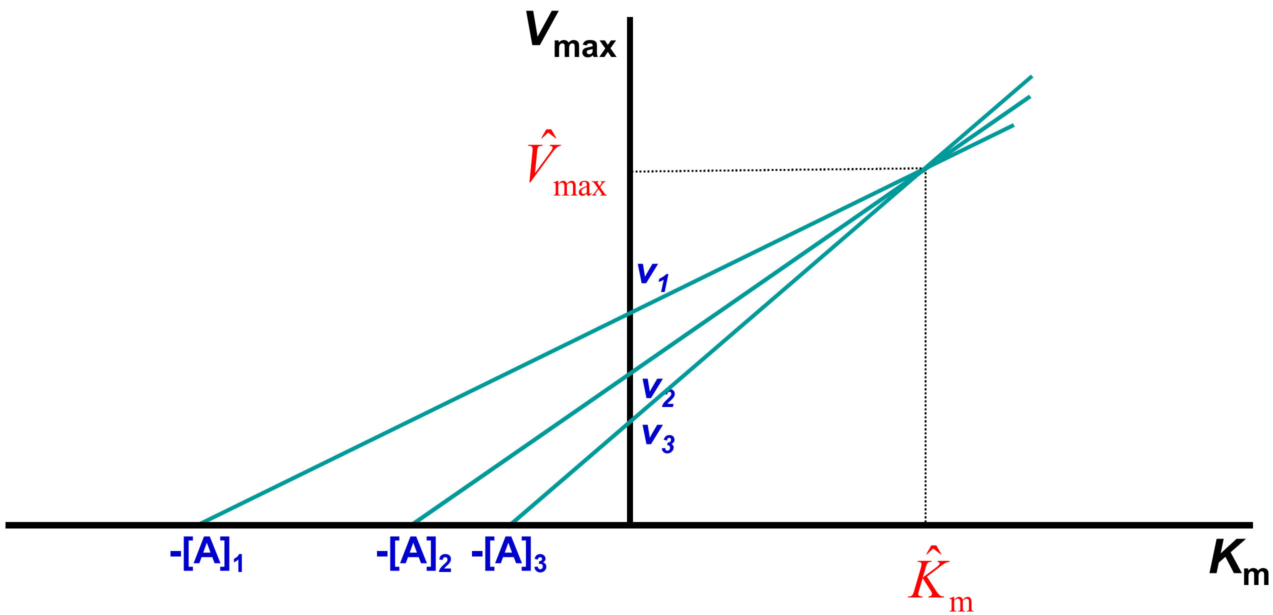
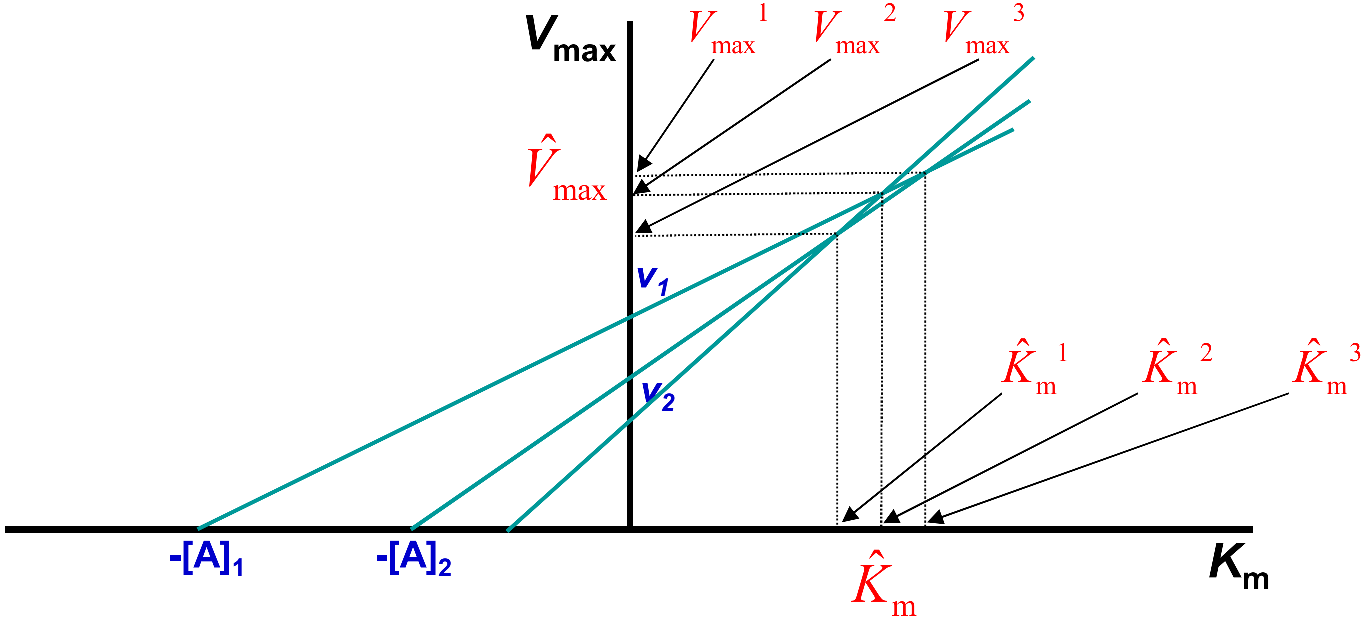


Gráfico de Eisenthal-Cornish-Bowden (gráfico linear directo)

Numa situação real, porém, os valores medidos são afectados de erro experimental e as 3 rectas não irão ter um ponto de intersecção comum, mas *três* pontos de intersecção. Como estimar então os melhores valores de Km e Vmax a partir destes pontos ?

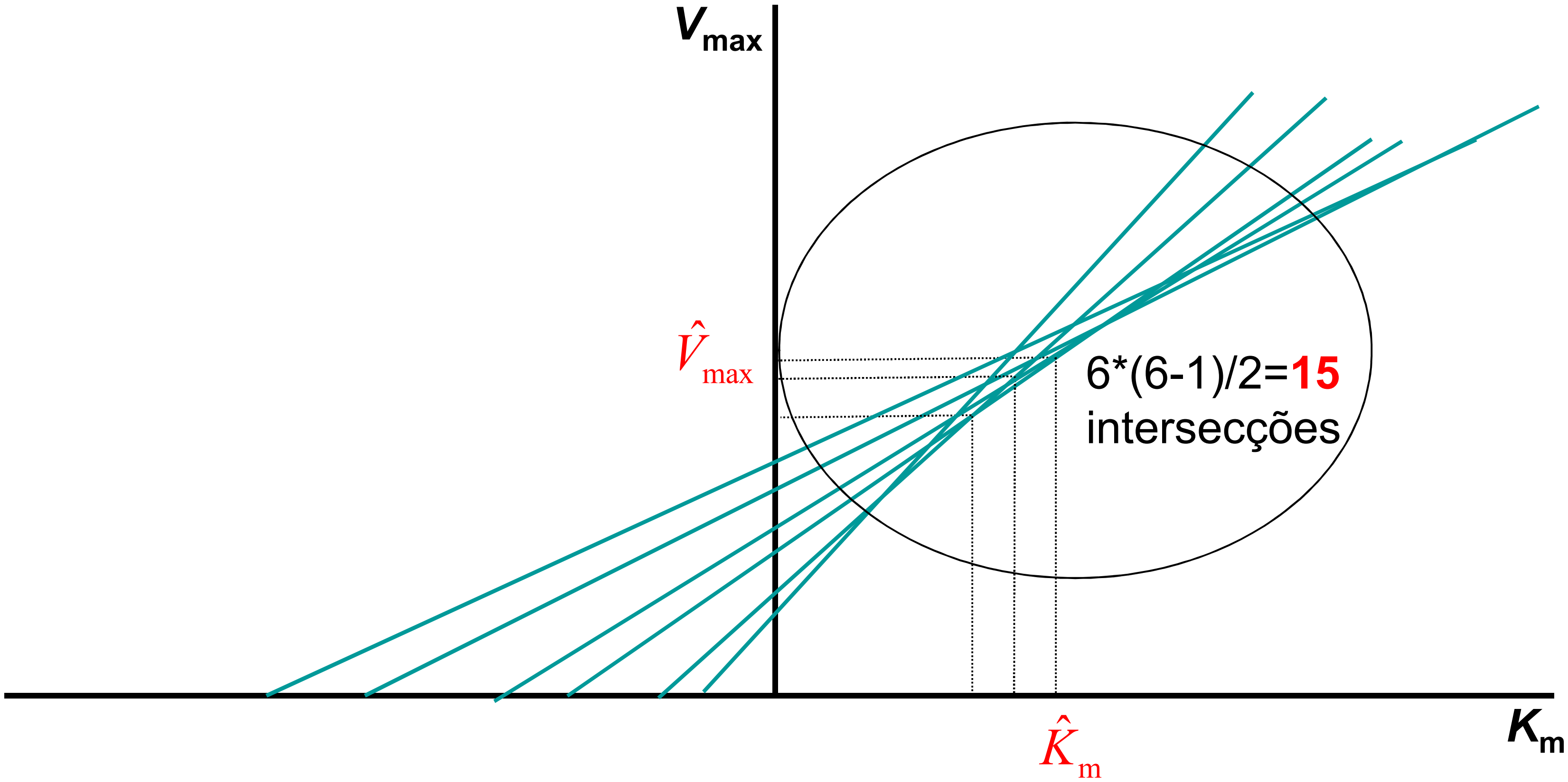


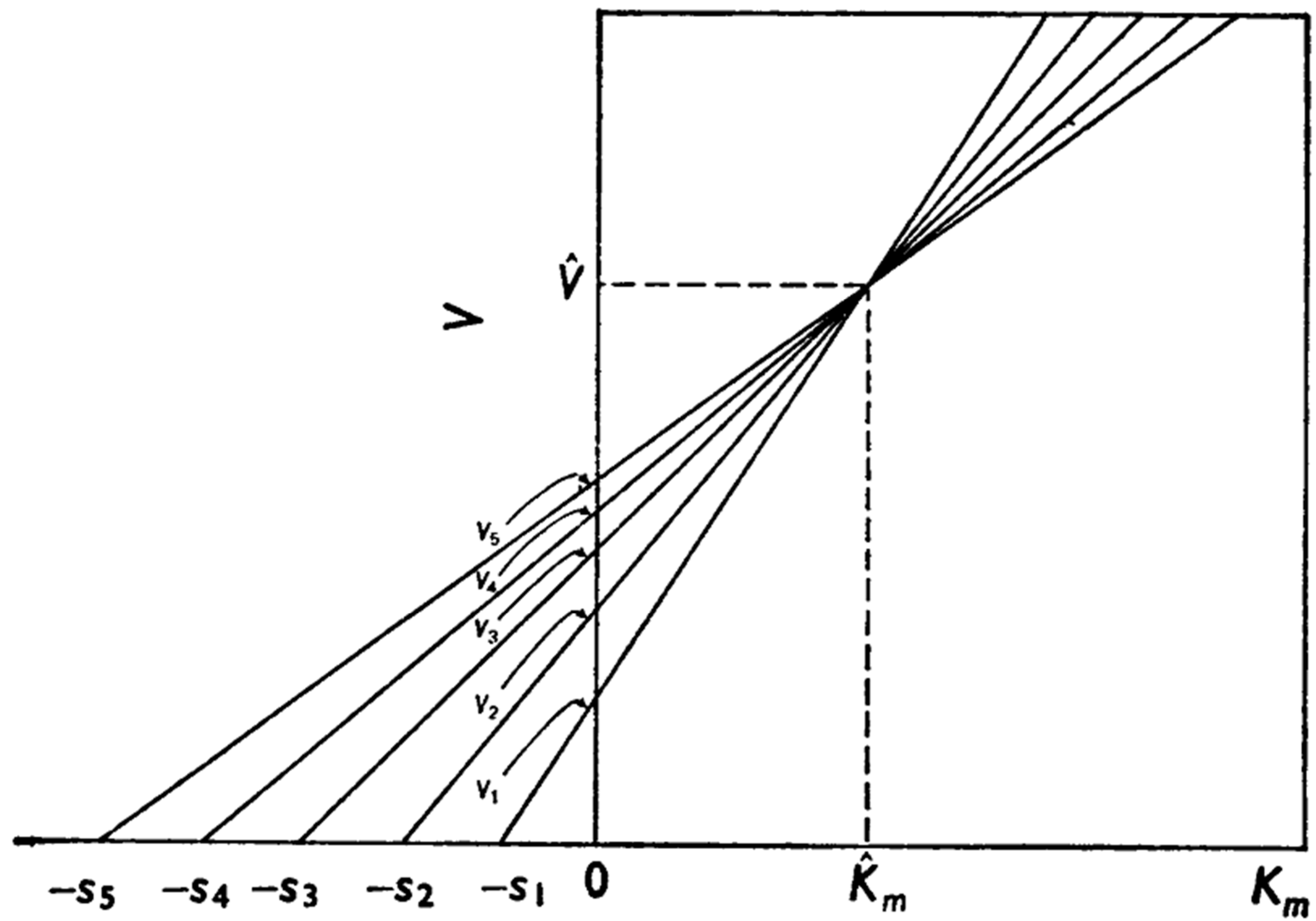
$$\hat{V}_{max} = \text{Mediana}(V_{max}{}^1, V_{max}{}^2, V_{max}{}^3)$$

$$\hat{K}_m = \text{Mediana}(\hat{K}_m{}^1, \hat{K}_m{}^2, \hat{K}_m{}^3)$$

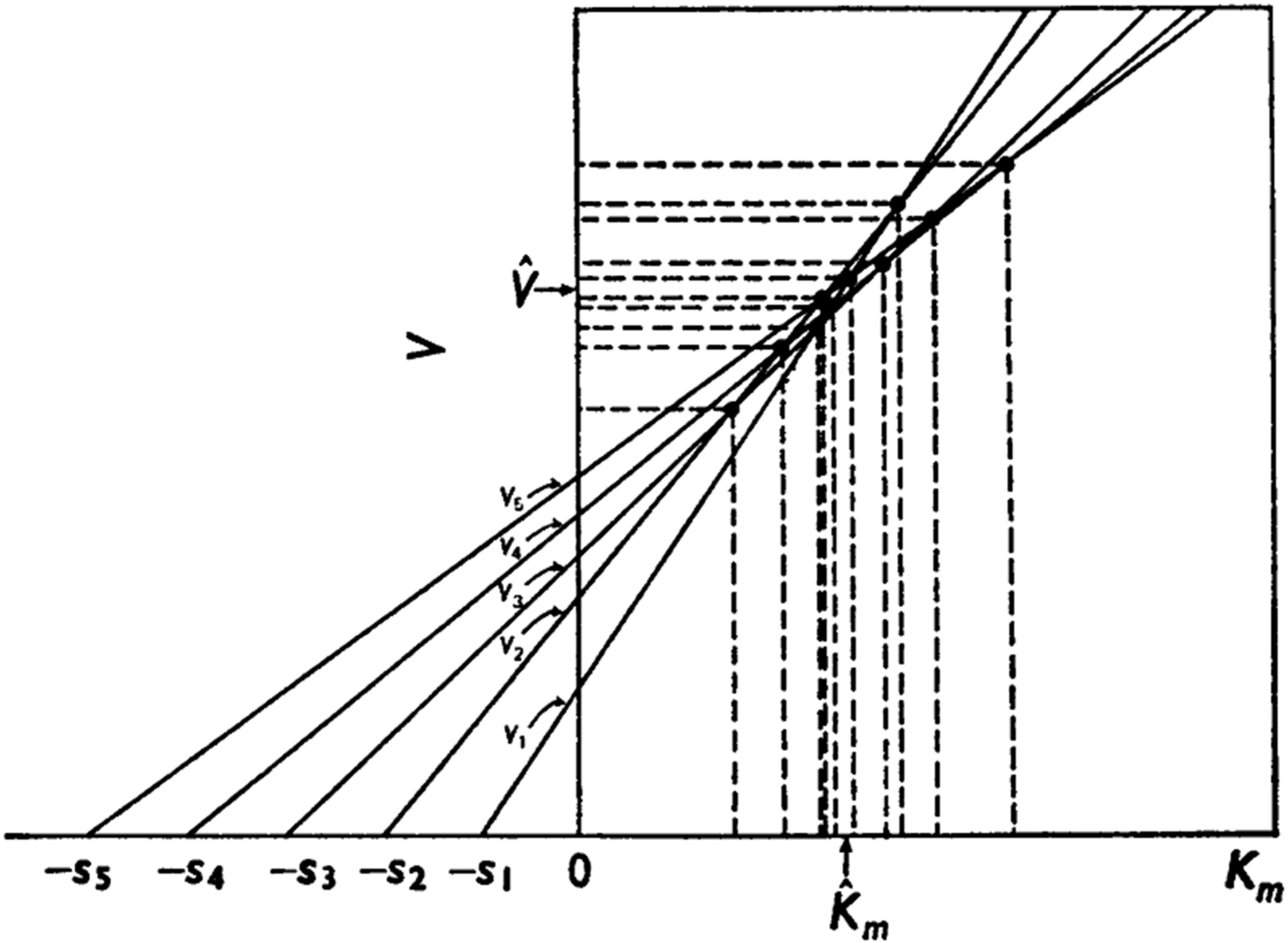
Gráfico de Eisenthal-Cornish-Bowden
(gráfico linear directo)

Para *n* medições experimentais, as *n* rectas têm *n(n-1)/2* pontos de intersecção!

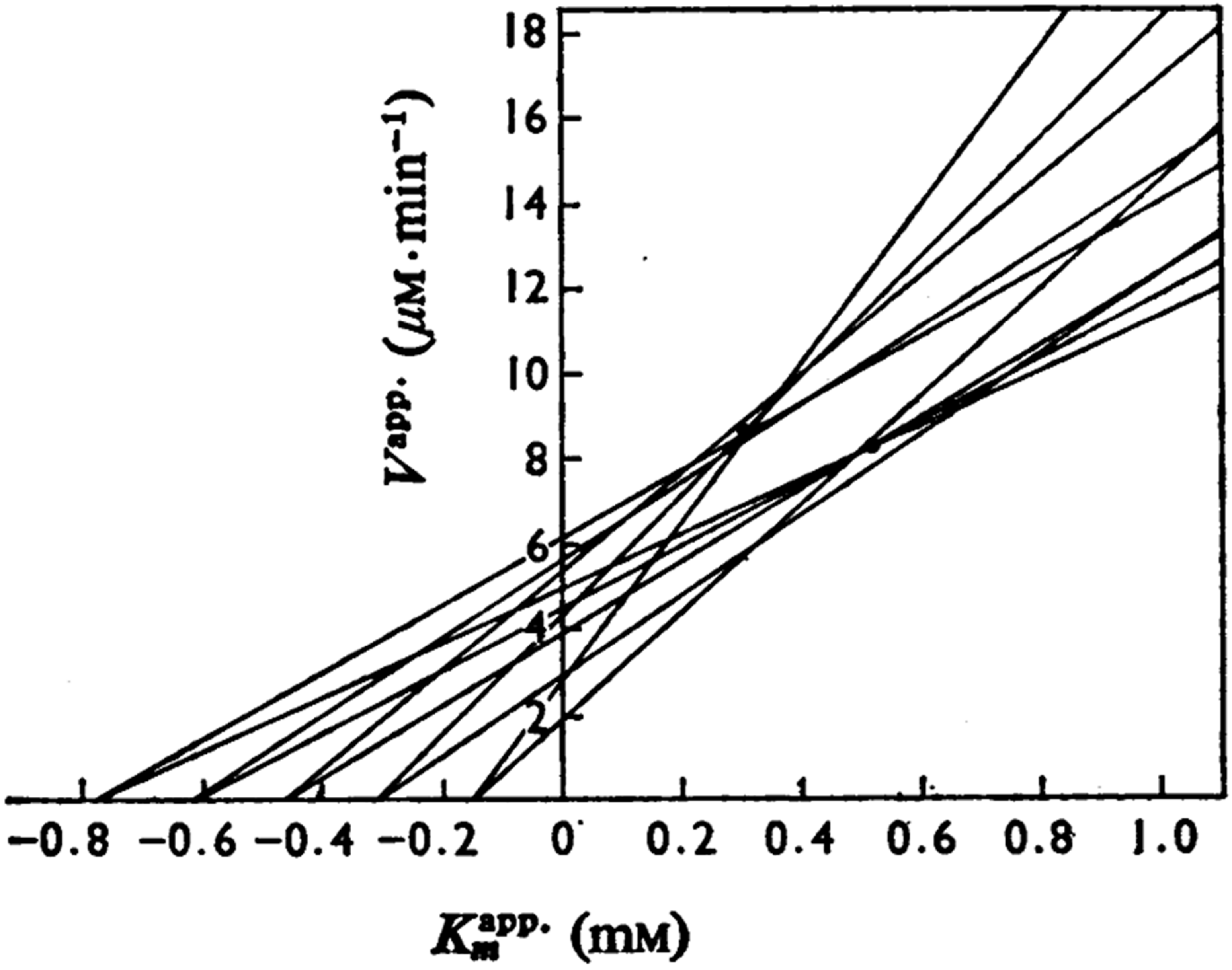




$\hat{V}$
V
v_5
v_4
v_3
v_2
v_1
$-s_5$
$-s_4$
$-s_3$
$-s_2$
$-s_1$
0
$\hat{K}_m$
K_m



$\hat{V}$
V
v_5
v_4
v_3
v_2
v_1
$-s_5$
$-s_4$
$-s_3$
$-s_2$
$-s_1$
0
$\hat{K}_m$
K_m


$V^{app.}$ (μM·min^{-1})
18
16
14
12
10
8
6
4
2
−0.8
−0.6
−0.4
−0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
$K_m^{app.}$ (mM)