

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Paulo Alexandre Alves de Almeida Neves

ESTUDO MICROCALORIMÉTRICO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE
PELO AGROTÓXICO CARBARYL

Belo Horizonte

2015

Paulo Alexandre Alves de Almeida Neves

Dissertação de Mestrado

ESTUDO MICROCALORIMÉTRICO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE
PELO AGROTÓXICO CARBARYL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão
Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Novato Silva

Belo Horizonte

2015

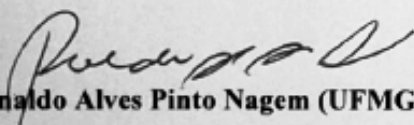


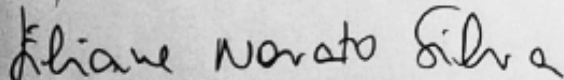
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

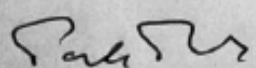


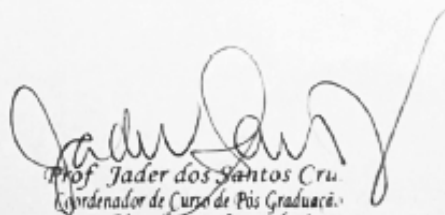
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE PAULO ALEXANDRE ALVES DE ALMEIDA NEVES. Aos seis dias do mês de fevereiro de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Estudo microcalorimétrico da inibição da Acetilcolinesterase pelo agrotóxico carbaryl", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo Sérgio Lacerda Beirão, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Ângela Maria Ribeiro (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Eliane Novato Silva - Co-orientadora (UFMG-Universidade Federal de MG.), aprovado; Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de fevereiro de 2015.


 Dra. Ângela Maria Ribeiro (UFMG)


 Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)


 Dra. Eliane Novato Silva (UFMG) – Co-orientadora


 Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão (UFMG) - Orientador


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Todos os seres humanos, por natureza, desejam o conhecimento

Aristóteles

RESUMO

O carbaryl é um inseticida carbamato inibidor competitivo da enzima acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina e alvo de diversos estudos em várias áreas da ciência. A maioria das técnicas utilizadas para se pesquisar cinética enzimática emprega substratos modificados ou sintéticos capazes de gerar sinais químicos ou elétricos reconhecíveis por alguns equipamentos. Para estudos com acetilcolinesterase, usa-se o substrato acetiltiocolina, onde um produto da catálise enzimática, a tiocolina, é capaz de reagir com algumas moléculas que tem a propriedade de absorver luz em um comprimento de onda. Essa reação acoplada pode sofrer variações de acordo com o meio e mascarar o resultado da reação em questão, ou seja, da hidrólise da acetiltiocolina. Sendo assim, esse método não é capaz de informar sobre a hidrólise de acetilcolina. Técnicas sofisticadas diretas podem ser empregadas, um exemplo é a calorimetria de titulação isotérmica. A técnica consegue mostrar a reação de hidrólise não só da acetiltiocolina, mas também da acetilcolina, por meio da troca de calor que acontece durante a catálise, não necessitando de quaisquer outras moléculas, senão a enzima e seu substrato. Com o objetivo de comparar os valores cinéticos obtidos nas hidrólises dos dois substratos, esse trabalho empregou duas técnicas, a espectrofotométrica e a calorimétrica. A técnica espectrofotométrica criada por Ellman utiliza uma molécula como agente cromóforo. A técnica calorimétrica consegue criar condições onde o substrato consegue se acumular na cela de reação e a cinética é determinada pela quantidade de calor trocada por tempo. Foram utilizadas distintas análises matemáticas, comuns da área de enzimologia, para comparar os resultados obtidos nas reações utilizando acetilcolina e acetiltiocolina, nos dois métodos empregados. O presente trabalho utilizou diferentes concentrações de carbaryl para se determinar a constante de inibição deste composto, também pelos métodos espectrofotométrico e calorimétrico, com uso de diferentes análises matemáticas. Os resultados mostram uma semelhança entre os valores obtidos com ambos os substratos, sendo esses sensivelmente maiores para a acetilcolina, o substrato natural da enzima. E ambas as técnicas, ainda que com erros maiores na espectrofotométrica, foram similares entre si. Isso mostra a robustez da técnica calorimétrica no estudo cinético e a proximidade dos valores de acetiltiocolina com a acetilcolina, demonstra que o uso desse substrato sintético retorna valores semelhantes com o substrato natural.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. Acetilcolina. Acetiltiocolina. Calorimetria. Carbaryl.

ABSTRACT

Carbaryl is a carbamate insecticide and a competitive inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase, an enzyme responsible for the hydrolysis of acetylcholine and subject of several studies in different fields of science. Most of the techniques used to screen enzyme kinetics employ modified or synthetic substrates capable of generating a chemical or an electrical signal, recognizable by some equipment. For studies using acetylcholinesterase, acetylthiocholine is used as a substrate, where one of its catalytic products, the thiocholine, is capable of reacting with some molecules having the property of absorbing light at one wavelength. This coupled reaction can vary according to the experimental conditions and alter the result of the aforementioned reaction, namely the acetylthiocholine hydrolysis. This method is not able to inform about the hydrolysis of acetylcholine. Direct techniques may be used, but are more sophisticated, an example is isothermal titration calorimetry. The technique can show not only the hydrolysis reaction of acetylthiocholine but also of acetylcholine, through the heat exchange that occurs during catalysis, not requiring any other molecules, but the enzyme and its substrate only. In order to compare the kinetic values obtained in the hydrolysis of both substrates; this work has employed two techniques, spectrophotometric and calorimetry. The spectrophotometric technique created by Ellman uses a molecule as chromophore agent. The calorimetric technique can create conditions where the substrate can accumulate in the reaction cell and the kinetics is determined by the amount of heat exchanged by time. Different mathematical analysis, common in enzymology area, was used to compare the results obtained in the reactions using acetylcholine and acetylthiocholine, at the two methods employed. The present study utilized different concentrations of carbaryl to determine the inhibition constant thereof also by spectrophotometric and calorimetric methods, using different mathematical analysis. The results show a similarity between the values obtained with both substrates, these being considerably greater for acetylcholine, the natural substrate of the enzyme. Moreover, both techniques, although with larger errors in spectrophotometric, were similar to each other. This shows the robustness of the calorimetric technique in the kinetic study, and the proximity of acetylthiocholine values with acetylcholine shows that the use of this synthetic substrate returns values similar to the natural substrate.

Keywords: Acetylcholinesterase. Acetylcholine. Acetylthiocholine. Calorimetry. Carbaryl.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do carbaryl	16
Figura 2 – Estruturas moleculares da acetilcolina e da acetiltiocolina	18
Figura 3 – Esquema das reações catalisadas pela acetilcolinesterase com dois substratos diferentes	19
Figura 4 – Formas da acetilcolinesterase com modificações pós-traducionais	21
Figura 5 – Imagens esquemáticas da garganta onde está o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase e do mecanismo de ação catalítico	23
Figura 6 – Esquema da reação com ATCh com DTNB	43
Figura 7 – Demonstração básica do funcionamento de um microcalorímetro isotérmico ...	45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Representação de uma coordenada de reação hipotética 30
- Gráfico 2** – Gráficos de dados brutos e regressões lineares nos modelos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee, com os erros associados..... 39
- Gráfico 3** – Mudança da energia fornecida ao sistema após adição de substrato..... 47
- Gráfico 4** – Obtenção do valor de $\Delta_r H^{\ominus}$ 49
- Gráfico 5** – Resultados obtidos dos testes de calibração do eixo-y e de diluição de água em água..... 50
- Gráfico 6** – Hidrólise da acetilcolina e acetiltiocolina, com o resultado das $\Delta_r H^{\ominus}$ na temperatura de 310,15 K e determinação do calor de ionização do ácido etanoico nas mesmas condições experimentais 54
- Gráfico 7** – Medidas realizadas em calorimetria, antes e depois da adição de metanol à reação e de sua padronização 57
- Gráfico 8** – Análise de regressão não-linear dos dados brutos obtidos de 4 ensaios de ITC com ACh sem inibidor a 310,15 K antes e depois da padronização do método de injeção..... 59
- Gráfico 9** – Constantes catalíticas, k_{cat} , obtidas em diferentes temperaturas, através de análise não-linear, e dados termodinâmicos de ativação obtidos por análises lineares de Arrhenius e Eyring utilizando o substrato ACh e ATCh 61
- Gráfico 10** – Gráficos de análises lineares de Eadie-Hofstee e Lineweaver-Burk com todos os ensaios contendo ou não inibidor..... 64
- Gráfico 11** – Análise de regressão não-linear com os dados das cinéticas na presença e ausência de inibidor para os substratos acetilcolina e acetiltiocolina 67
- Gráfico 12** – Análises de regressão linear para determinação de K_i pelo método de $K_{m,app}$ utilizando os dados de V_{max} e K_m obtidos por três análises diferentes para o substrato ACh..... 71
- Gráfico 13** – Análises de regressão linear pelo método de $K_{m,app}$ para determinação de K_i utilizando os dados de V_{max} e K_m obtidos por três análises diferentes para o substrato ATCh..... 72
- Gráfico 14** – Dados dos ensaios de cinética com ATCh na presença e ausência do inibidor carbaryl realizado pelo método de Ellman 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns dados obtidos dos ensaios de teste de calibração, relativos à titulação de propan-1-ol em água, testado em um microcalorímetro de titulação isotérmica	51
Tabela 2 – Valores de $\Delta_r G^\ominus$ para as várias temperaturas calculados pela equação de Gibbs-Helmholtz	55
Tabela 3 – Dados referentes a diferentes metodologias para obtenção dos resultados em uma cinética em calorimetria com o substrato ACh, comparando um método descrito com um alternativo	58
Tabela 4 – Valores de k_{cat} e parâmetros termodinâmicos de ativação obtidos na cinética de catálise de acetilcolina em diferentes temperaturas.....	62
Tabela 5 – Dados referentes às regressões lineares de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee das cinéticas obtidas em microcalorimetria utilizando os dois substratos e em diferentes concentrações do inibidor	65
Tabela 6 – Dados referentes à regressão não-linear ajustados à equação de Michaelis-Menten, com e sem inibidor	68
Tabela 7 – Valores de k_{cat} e K_m obtidos pelas análises lineares e não-lineares através do método de microcalorimetria	69
Tabela 8 – Dados de K_i obtidos pelos métodos de SNRL (análises não-linear simultânea) e de $K_{m,\text{app}}$, utilizando os valores de V_{max} e K_m alcançados pelas análises de regressão não-linear e lineares de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee... ..	70
Tabela 9 – Dados referentes ao ensaio de cinética com ATCh realizado pelo método de Ellman.... ..	75
Tabela 10 – Dados de parâmetros cinéticos e de ativação com valores obtidos da análise de cinética enzimática utilizando a integral e Michaelis-Menten para o substrato ACh.....	77
Tabela 11 – Dados de parâmetros cinéticos e de ativação com valores obtidos da análise de cinética enzimática utilizando a integral e Michaelis-Menten para o substrato ATCh	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ATCh	Acetiltiocolina
AChE	Acetilcolinesterase
G ₁	Monômero da forma globular da acetilcolinesterase
G ₂	Dímero da forma globular da acetilcolinesterase
G ₄	Tetrâmero da forma globular da acetilcolinesterase
A ₄	Tetrâmero da forma assimétrica da acetilcolinesterase
A ₈	Octâmero de forma assimétrica da acetilcolinesterase
A ₁₂	Dodecâmero da forma assimétrica da acetilcolinesterase
PRiMA	Porção polipeptídica ligada a uma âncora de glicolípide da acetilcolinesterase
ColQ	Porção tipo-colágeno da acetilcolinesterase
<i>G</i>	Energia de Gibbs
<i>H</i>	Entalpia
<i>S</i>	Entropia
<i>T</i>	Temperatura termodinâmica
<i>q</i>	Calor
<i>w</i>	Trabalho
<i>U</i>	Energia interna do sistema
<i>p</i>	Pressão
<i>V</i>	Volume
<i>m</i>	Massa
<i>c</i>	Concentração
$\Delta_r G^\ominus$	Varição da energia de Gibbs padrão da reação
$\Delta_r H^\ominus$	Varição da entalpia padrão da reação
$\Delta_r S^\ominus$	Varição da entropia padrão da reação
K_{eq}	Constante de equilíbrio

$\Delta^\ddagger G^\ominus$	Varição da energia de Gibbs padrão de ativação
$\Delta^\ddagger H^\ominus$	Varição da entalpia padrão de ativação
$\Delta^\ddagger S^\ominus$	Varição da entropia padrão de ativação
C_p	Capacidade térmica à pressão constante
E_a	Energia de ativação
k_B	Constante de Boltzmann = $1,380\ 648 \times 10^{-23}$ J K ⁻¹
h	Constante de Planck = $6,626\ 069 \times 10^{-34}$ J s
R	Constante dos gases ideais = $8,314\ 462$ J K ⁻¹ mol ⁻¹
k	Constante de uma reação qualquer
$[E]$	Concentração de enzima
$[S]$	Concentração de substrato
$[I]$	Concentração de inibidor
$[P]$	Concentração de produto
$[ES]$	Concentração do complexo enzima-substrato
v_0	Velocidade inicial da reação
I_{50}	Metade da concentração inibitória máxima
k_{cat}	Número de renovação
K_m	Constante de Michaelis-Menten
K_i	Constante de inibição
$K_{m,app}$	Constante de Michaelis-Menten aparente
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática
DTNB	Ácido 5,5'-ditio- <i>bis</i> -(2-nitrobenzoico)
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
P	Potência
SNLR	Regressão não-linear simultânea
LB	Lineweaver-Burk
EH	Eadie-Hofstee

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Considerações gerais sobre pesticidas	14
1.1.1	<i>Riscos à saúde humana</i>	<i>15</i>
1.1.2	<i>Carbaryl.....</i>	<i>16</i>
1.2	Acetilcolina e acetilcolina	17
1.3	Acetilcolinesterase	19
1.4	Sítio ativo.....	21
1.4.1	<i>Porções adicionais da garganta de AChE</i>	<i>22</i>
1.5	Estudos cinéticos.....	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivos específicos.....	25
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
3.1	Introdução à termodinâmica	26
3.1.1	<i>Variação da energia de Gibbs padrão da reação, $\Delta_r G^\ominus$</i>	<i>28</i>
3.1.2	<i>Energia de ativação, E_a</i>	<i>29</i>
3.2	Cinética enzimática	32
3.2.1	<i>Catálise Enzimática</i>	<i>33</i>
3.2.2	<i>Pressupostos do estado estacionário</i>	<i>34</i>
3.2.2.1	<i>Eficiência catalítica</i>	<i>35</i>
3.2.3	<i>Inibição enzimática.....</i>	<i>36</i>
3.2.3.1	<i>Inibidor competitivo.....</i>	<i>36</i>
3.2.4	<i>Obtenção dos valores de V_{max}, K_m e K_i por métodos lineares</i>	<i>37</i>
3.2.5	<i>Análises não-lineares para obtenção dos parâmetros cinéticos</i>	<i>40</i>
3.2.6	<i>Forma integrada de Michaelis-Menten</i>	<i>41</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1	Método de Ellman	43

4.2	Calorimetria de titulação isotérmica	43
4.2.1	<i>Cinética enzimática em calorimetria</i>	45
4.3	Materiais.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Determinação dos parâmetros cinéticos de hidrólise dos substratos pela acetilcolinesterase	52
5.1.1	<i>Ensaio para determinação das entalpias das reações</i>	52
5.1.2	<i>Determinação dos parâmetros termodinâmicos da reação de hidrólise da acetilcolina gerando seus produtos, ácido etanoico e colina</i>	55
5.1.3	<i>Determinação das constantes cinéticas da catálise enzimática</i>	56
5.1.3.1	Cálculo de $\Delta^\ddagger G^\ominus$, $\Delta^\ddagger H^\ominus$, $\Delta^\ddagger S^\ominus$ por obtenção de k_{cat} em diferentes temperaturas	60
5.1.3.2	Obtenção dos dados de V_{max} e K_m por análises lineares.....	63
5.1.3.3	Obtenção dos dados de V_{max} e K_m por análises não-lineares.....	67
5.1.4	<i>Determinação de K_i</i>	70
5.1.5	<i>Método de Ellman</i>	73
5.1.6	<i>Integral de Michaelis-Menten</i>	76
6	CONCLUSÃO	81
7	PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Na literatura científica é possível observar um grande número de publicações sobre estudos enzimáticos, realizados nas mais diversas condições experimentais. A imensa maioria desses estudos é realizada com métodos quantitativos espectrofotométricos, onde o objetivo a ser alcançado é a determinação dos valores de inibição de alguma substância sobre uma enzima de importância médica ou mesmo comercial. Poucos são os estudos que utilizam métodos mais acurados para se determinar essas constantes e obter valores mais precisos, mesmo porque métodos mais robustos necessitam de aparelhos mais complexos e requerem recursos humanos capacitados. Ensaio *in vitro* que possuam uma grande precisão e garantam resultados com maior confiabilidade dentro da comunidade científica são chamados de padrão-ouro, e dentre esses está a calorimetria, método que utiliza a troca de calor entre as moléculas para determinar constantes de afinidade. E esse método também pode ser empregado para se estudar cinética enzimática, assim como a capacidade de uma molécula qualquer de inibir uma enzima.

Dentre os mais diversos estudos com inibidores enzimáticos, encontram-se os que possuem relevância comercial, como exemplo os pesticidas utilizados contra pragas agrícolas. Ainda que não se saiba exatamente os efeitos fisiológicos desses compostos sobre a saúde humana, esses pesticidas ou agrotóxicos são utilizados no âmbito comercial e industrial, podendo afetar o meio-ambiente e a vida das pessoas sem que elas ao menos saibam.

Por isso, estudos que empregam métodos de grande precisão e acurácia devem ser utilizados para se conhecer os efeitos sobre enzimas de importância médica ou comercial causados por substâncias potencialmente nocivas aos seres humanos, como os agrotóxicos.

1.1 Considerações gerais sobre pesticidas

Agrotóxicos são definidos como substâncias ou misturas quaisquer usadas para atrair, mitigar ou destruir qualquer tipo de praga ou infestação provocada por espécies que trazem algum dano à saúde humana direta ou indiretamente, ou mesmo danos financeiros às culturas mantidas pelo homem (FAO, 2007). Diferentes classes de substâncias podem ser utilizadas para esses fins, e uma delas são os inseticidas, capazes de matar espécies de insetos na fase adulta ou na fase larval, (IUPAC, 2014).

O uso intensivo de pesticidas ou defensivos agrícolas, em especial, inseticidas, iniciou-se em uma escala global após o término da Segunda Guerra Mundial, quando um movimento começou para alavancar a produção mundial de alimentos, chamada de Revolução Verde. Nesse processo, o ponto central era o beneficiamento e armazenamento de insumos agrícolas e substâncias que deveriam ser utilizadas para alterar a composição da fauna e flora, a fim de preservar o ecossistema e ambientes urbanos de espécies consideradas nocivas (BORSOI et al, 2014).

No Brasil, desde meados da década de 1970, houve um significativo aumento da produção e consumo de pesticidas agrícolas. Isso devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, além da ampliação do mercado consumidor dado o aumento populacional e significativo crescimento da qualidade de vida nos países desenvolvidos. Esse processo foi fortalecido por políticas governamentais do período, com aumento de crédito agrícola para compra específica de pesticidas, vinculado, também, às propagandas que exaltavam os benefícios do uso de substâncias sintéticas na lavoura, reduzindo custos causados por pragas, assim como o trabalho causado por essas (MELO, 2012). Em um primeiro momento, as políticas eram voltadas para a importação desses produtos, porém, com o crescimento do parque industrial brasileiro no final da década de 1980, o país se tornou um importante produtor de pesticidas, e esse passou, definitivamente, a produzir essas substâncias em larga escala (AUGUSTO, 2012).

Impulsionado por essas políticas e sucessivas outras adotadas pelo Governo, o Brasil saltou para o primeiro lugar como consumidor de pesticidas, consumindo um total de 700 mil toneladas de defensivos agrícolas e, até 2013, essa posição foi mantida, com um volume total utilizado no país de um bilhão de litros (FIOCRUZ, 2012; PEDLOWSKI et al, 2012).

1.1.1 Riscos à saúde humana

Como pesticidas são compostos químicos, a utilização de tais produtos trouxe impactos à saúde humana e que precisam ser levados em consideração (EL-SHANAWY, 2009). Alguns grupos de indivíduos possuem maior risco à ação desses defensivos agrícolas, e quem aplica um pesticida na lavoura ou em seu domicílio está exposto a uma maior quantidade de produto que qualquer outra pessoa. Outro grupo afetado, em menor escala, é constituído pelos consumidores dos alimentos ou produtos secundários que, ao longo de muito tempo, podem acumular resíduos de pesticidas no organismo (LONDRES, 2011). O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA/ANVISA, mostrou

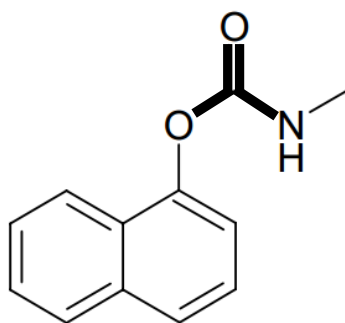
em seu último resultado que, no período de 2011/2012, 36% das amostras de alimentos de 2011 e 29% das amostras de 2012 apresentaram resultados insatisfatórios e riscos para o consumo humano (ANVISA, 2014).

Como os insetos são o principal grupo de animais que ameaçam as culturas em todo o mundo, vários tipos diferentes de inseticidas foram desenvolvidos para controlar essas pragas agrícolas. Os dois grupos de inseticidas mais utilizados são os carbamatos e os organofosforados, ambos conhecidamente inibidores da acetilcolinesterase (AChE). Uma vez que a acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de insetos, a enzima que atua na clivagem de ACh torna-se um importante alvo para o controle das populações de insetos (QUINN, 1987). Interessante notar que carbamatos possuem efeitos neurotóxicos, e, durante a história, foram utilizados como armas químicas durante a Primeira Guerra e a Segunda Guerra Mundiais e em outros conflitos armados, como a Guerra do Vietnã. Acidentes com a produção de pesticidas também são causadoras de mortes, como o incidente em Bhopal, Índia, onde um dos reagentes utilizados na síntese química de carbaryl vazou da fábrica e causou a morte de 3.800 pessoas imediatamente além de danos à saúde de outros milhares em 1984 (BROUGHTON, 2005).

1.1.2 *Carbaryl*

O carbaryl (1-naftil metilcarbamato) é um carbamato inseticida muito utilizado no campo e em domicílios, para controle de artrópodes ectoparasitos de animais e pestes agrícolas (KING; AARON, 2015). A estrutura de carbamatos apresenta um grupo NCOO inserido na cadeia, que no caso do carbaryl será importante para a sua função de inibidor da AChE (Figura 1) (GALGANI; BOCQUENE, 1990.).

Figura 1 – Estrutura molecular do carbaryl



Estrutura molecular do 1-naftil metilcarbamato, em destaque mais escuro, as ligações NCOO, que definem a classe dos carbamatos. *Fonte: FAO, 2007, p. 3.*

A toxicidade estimada do carbaryl em humanos é considerada baixa, com uma LD₅₀ (dose letal para matar 50% dos indivíduos) maior que 200 mg kg⁻¹. O grupo naftila do composto o torna altamente lipofílico, podendo ser capturado pelas reservas de gordura do organismo e ficar armazenado. Isso acarreta um atraso no desenvolvimento de sintomas e os pode prolongar. Caso ocorra uma perda da massa de gordura, os compostos armazenados podem reintoxicar o indivíduo afetado. Porém, a baixa toxicidade aguda do carbaryl em mamíferos é devido a sua inativação rápida nos organismos destes, promovida pela metabolização em compostos menos tóxicos (MURPHY; LAWVERYS; CHEERER, 1968; KING; AARON, 2015).

O carbaryl é menos resistente que outros inseticidas clorados, que podem permanecer no ambiente por décadas, por isso o uso de carbaryl se tornou recorrente e em grande escala, tornando-se um dos inseticidas mais comercializados no mundo, inclusive por governos para controle de pragas em parques e reservas ambientais (HASTINGS et al, 2001)

Carbamatos são reconhecidamente inibidores reversíveis que competem com a acetilcolina pelo sítio ativo da acetilcolinesterase. Como a inibição da enzima causa um acúmulo de substrato, a ACh em excesso pode levar a uma “síndrome colinérgica”. Os sintomas podem variar de intensidade e são dados pelo excesso de características da atividade colinérgica como ptialismo ou sialorreia (excessiva salivação), dacriorreia (lacrimejamento excessivo), diarreia, poliúria (aumento da micção) e hipersecreção brônquica. Outros sintomas podem incluir bradicardia, fasciculação muscular e alteração mental. Mortes decorrentes dessa síndrome são causadas, usualmente, por complicações respiratórias devido ao comprometimento da troca gasosa, dificultada pelo excesso de secreção brônquica, ou pela diminuição do esforço para respiração, causada pela fraqueza muscular (DART, 2003).

1.2 Acetilcolina e acetiltiocolina

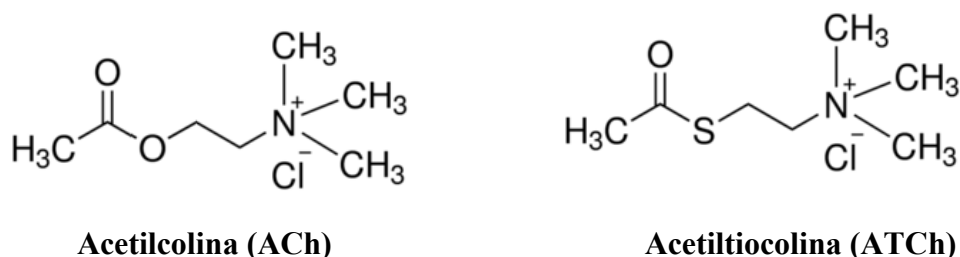
Para entender os sintomas causados pela intoxicação por carbamatos, deve-se, primeiro, compreender a função fisiológica da acetilcolina. A acetilcolina, ACh, é um neurotransmissor que possui dois tipos de receptores no sistema nervoso, os receptores muscarínicos e os nicotínicos, e podem ser reclassificados de acordo com a localização no corpo e a ação que ACh desempenha quando essa se liga a esses receptores. De maneira geral, os receptores muscarínicos se localizam no sistema nervoso central, glândulas exócrinas e órgãos inervados pelo sistema nervoso autônomo parassimpático. Já os nicotínicos são localizados em neurônios pós-ganglionares tanto do parassimpático quanto do simpático, na

medula adrenal e na junção muscular. No cérebro, pode ser encontrado tanto muscarínico quanto o nicotínico (KING; AARON, 2015). Com um excesso de ACh, os sintomas de hipersecreção encontrados na síndrome colinérgica se devem à ativação dos receptores muscarínicos, já os efeitos visualizados na junção muscular são devidos à ativação do nicotínicos (DART, 2003).

Interessante notar que, em alguns animais aquáticos como arraias e outros peixes, os receptores nicotínicos desempenham uma função adicional (GALZI et al, 1991). Nesses animais, há um órgão elétrico, composto por centenas de milhares de eletrócitos, pequenas células cujo funcionamento se assemelha a de um miócito. Nessas células também há o bombeamento ativo de íons sódio para o meio extracelular. Quando um estímulo é transmitido através da fibra nervosa colinérgica, vesículas de ACh são liberadas na junção com os eletrócitos e a ACh se liga aos receptores nicotínicos presentes na membrana celular. Como esses receptores são ionotrópicos, eles funcionam como canais específicos para cátions permitindo a entrada de íons Na^+ , gerando assim uma descarga elétrica (ZIMMERMANN; DENSTON, 1977; MIYAZAWA; FUJIYOSHI; UNWIN, 2003).

Em muitos ensaios fisiológicos para se medir a degradação de ACh, utilizam-se outros substratos com características diferentes, que tenham a capacidade de gerar sinais ou produtos que possam ser reconhecidos por um aparelho. Um desses substratos artificiais mais utilizados é a acetiltiocolina, ATCh, onde um enxofre é o substituinte do heteroátomo de oxigênio da ligação éster (Figura 2) (ELLMAN et al, 1961).

Figura 2 – Estruturas moleculares da acetilcolina e da acetiltiocolina

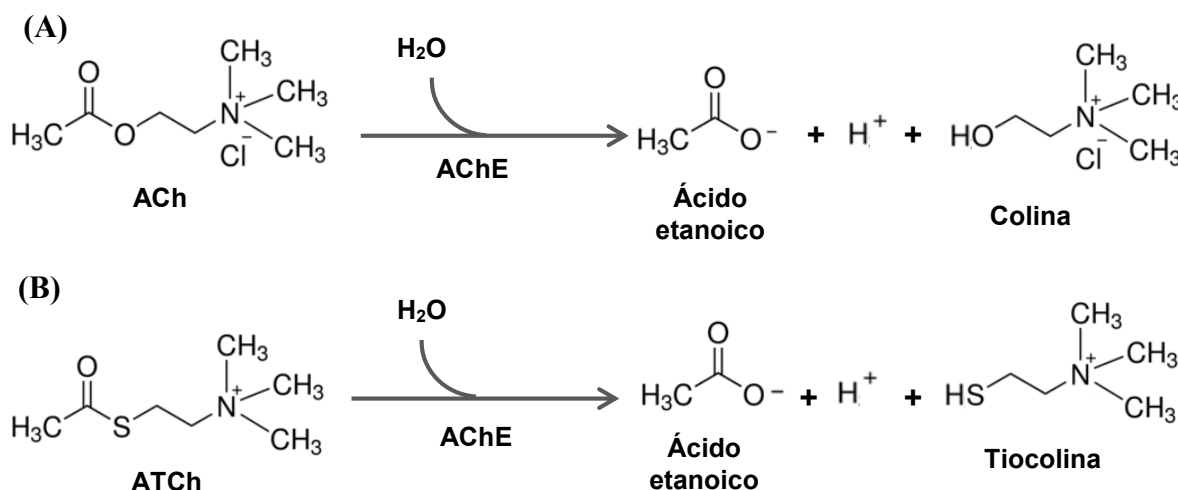


Os substratos da acetilcolinesterase se diferem pelo heteroátomo da cadeia principal, sendo um oxigênio, formando uma ligação éster, na ACh, e um enxofre formando um tioéster na ATCh. Em ambos os casos, o contra-íon é o cloro. *Fonte: www.Sigma-Aldrich.com.*

Em uma reação catalítica fisiológica, a ACh é clivada em colina, que será reaproveitada para gerar nova acetilcolina, e ácido etanoico ou ácido acético, que será incorporado no ciclo de Krebs (Figura 3A). Porém, nenhum desses dois produtos possui alguma propriedade química que o permite ser visualizado por algum método (QUINN, 1987;

RAND, 2007). Quando a AChE cliva ATCh, resultando em tiocolina e ácido etanoico, a tiocolina possui um grupamento tiol ou sulfidríla (Figura 3B), capaz de reagir com grupamentos dissulfetos.

Figura 3 – Esquema das reações catalisadas pela acetilcolinesterase com dois substratos diferentes



A reação em (A) mostra a hidrólise de acetilcolina (ACh) em ácido acético ou etanoico e em colina feita pela acetilcolinesterase (AChE). Em (B) a mesma reação, mas como substrato a acetiltiocolina (ATCh), formando colina e ácido etanoico. *Fonte: autoria própria.*

Uma notável diferença é que ligações C–O são mais curtas que C–S e, pelo fato do enxofre ser menos eletronegativo que o oxigênio, a ligação S–H é menos polar que o análogo com o oxigênio, O–H. Quando comparado com o substrato natural, a ligação éster da ACh possui um ângulo médio de $110^\circ \pm 3^\circ$, porém a ligação tioéster da ATCh se aproxima de $105^\circ \pm 3^\circ$, e essa pequena diferença proporciona interações distintas com qualquer proteína que interaja com ACh e ATCh, incluindo a acetilcolinesterase (HEUCKEROTH; GLASER; GORDON, 1988; SOLOMONS; FEYHLE, 2012).

1.3 Acetilcolinesterase

A clivagem de ACh e ATCh é realizada pela enzima acetilcolinesterase, ou AChE, (E.C. 3.1.1.7), presente em diferentes locais do organismo. A AChE pode ser classificada como uma serino-protease, hidrolase de um éster carboxílico, também conhecida como acetilcolina acetilidrolase. A AChE chamada de sináptica está presente nas fendas sinápticas na membrana de neurônios, e impede a permanência de ACh na fenda e a consequente ativação contínua de seus receptores. A AChE também está presente em eritrócitos, porém sua

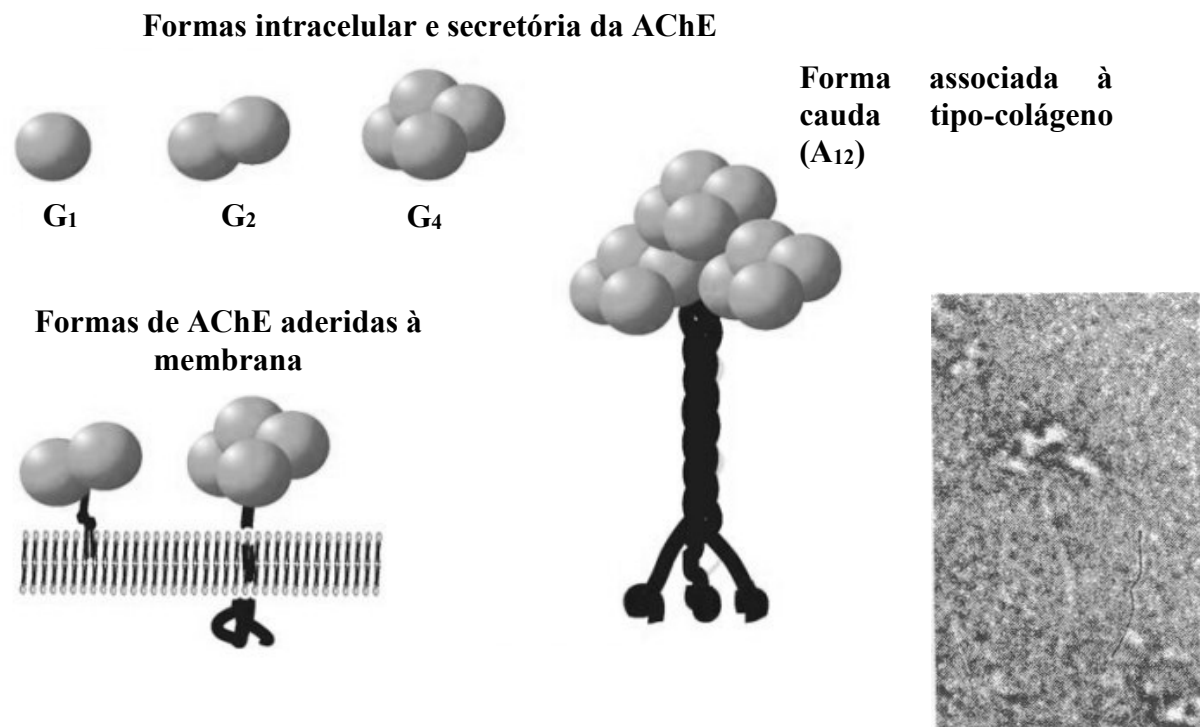
função não é ainda bem elucidada, e ainda há a butirilcolinesterase, presente em hepatócitos e é responsável no auxílio da metabolização de xenobióticos (KING; AARON, 2015). Sua atividade está ligada à alta capacidade de processar seu substrato, ACh, em pouco tempo, controlando a concentração de ACh na fenda sináptica. Por esse fator e a importância que desempenha na função neural a tornam um excelente alvo de estudos cinéticos (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

O gene de AChE é transcrito e traduzido para uma única cadeia polipeptídica com atividade catalítica e sua estrutura terciária se manteve praticamente inalterada ao longo da evolução, inclusive nos órgãos elétricos de peixes-elétricos, como *Electrophorus electricus*. O seu sítio ativo, surpreendentemente para uma enzima com alta capacidade catalítica, se localiza no final de uma estrutura com o formato de uma garganta. As teorias para responder às dúvidas de como a enzima consegue manter tamanha atividade mesmo com o longo caminho que o substrato precisa para chegar ao sítio ativo se baseiam na composição dessa garganta e do próprio sítio ativo (SOREQ; SEIDMAN, 2001).

O evento de *splicing* alternativo existe e produz pelo menos duas isoformas de AChE, a sináptica e a eritrocitária. A eritrocitária é capaz de formar dímeros ou tetrâmeros, dependendo da espécie, e é covalentemente ligada a uma cauda com uma âncora de glicolípide pela porção carboxi-terminal, chamada de PRiMA. Um tetrâmero dessa isoforma é encontrado nos órgãos elétricos de alguns peixes (DUDAI; HERZBERG; SILMAN, 1973, PERRIER; MASSOULIÉ; KREJCI, 2002). A isoforma sináptica gera enzimas que podem ser secretadas para a matriz extracelular e que sofrem modificações pós-traducionais dando origem a duas classes, a globular G, e a assimétrica A. Análises de cristalografia mostraram que o resíduo de cisteína a três resíduos do carboxi-terminal da isoforma sináptica G₁ (globular monomérica) permite a dimerização da AChE por pontes dissulfeto, formando a forma globular dimérica G₂, e análises posteriores mostraram que mais dois monômeros G₂ podem se associar por interações hidrofóbicas com o dímero, resultando em um tetrâmero globular G₄ (Figura 4) (ROTUNDO, 2003). A forma A possui dois domínios principais: o catalítico e a cauda tipo-colágeno ColQ, uma porção que possui hidroxiprolina e hidroxilisina, da mesma forma que o colágeno, adicionada após a tradução. Por meio dessas caudas, um tetrâmero catalítico, A₄, pode ser formado por ligações dissulfetos e esses podem se unir a outros tetrâmeros e formar os oligômeros A₈ e A₁₂ (Figura 4). Sabe-se que as formas globulares G₁ e G₂, estão presentes intracelularmente e são precursoras de formas mais complexas, e G₄ pode ser secretado. As formas assimétricas também são secretadas e estão

presentes na matriz extracelular da junção neuromuscular (QUINN, 1987; BON; COUSSEN; MASSOULIÉ, 1997; ROTUNDO, 2003).

Figura 4 – Formas da acetilcolinesterase com modificações pós-traducionais



O gene da acetilcolinesterase gera principalmente dois transcritos, um que produz uma proteína associada à membrana, chamada de isoforma eritrocitária (também presentes em peixes elétricos), e outro que produz a isoforma sináptica. Essa última sofre modificações pós-traducionais que resultam em duas classes de enzimas, as globulares (G), que podem formar dímeros ou tetrâmeros, e as assimétricas (A), que são associadas a uma cauda tipo-colágeno e são encontradas nas junções neuromusculares de mamíferos. Em destaque, micrografia eletrônica de transmissão mostrando a forma associada à membrana da AChE encontrada em *Electrophorus electricus*. Fonte: adaptado de Rotundo, 2003, p. 745, Micrografia de Dudai et al., 1973.

1.4 Sítio ativo

O sítio ativo da acetilcolinesterase revela o seu poder catalítico, pois está em uma garganta, dividida primariamente em duas regiões distintas e importantes para a catálise enzimática. A primeira região é chamada de sítio “esterático”, onde a tríade catalítica está presente, contendo uma serina, uma histidina e um glutamato; geralmente serino-proteases possuem aspartato como resíduo ácido (SOREQ; SEIDMAN, 2001; DVIR et al, 2010). Nessa região, o pK_a intrínseco é cerca de 6,3, permitindo a histidina possuir o grupo imidazol funcional, importante para a formação do grupo tetraédrico intermediário por meio de uma catálise ácido-base geral. Uma vez formado o grupo tetraédrico, a colina, ou tiocolina, é

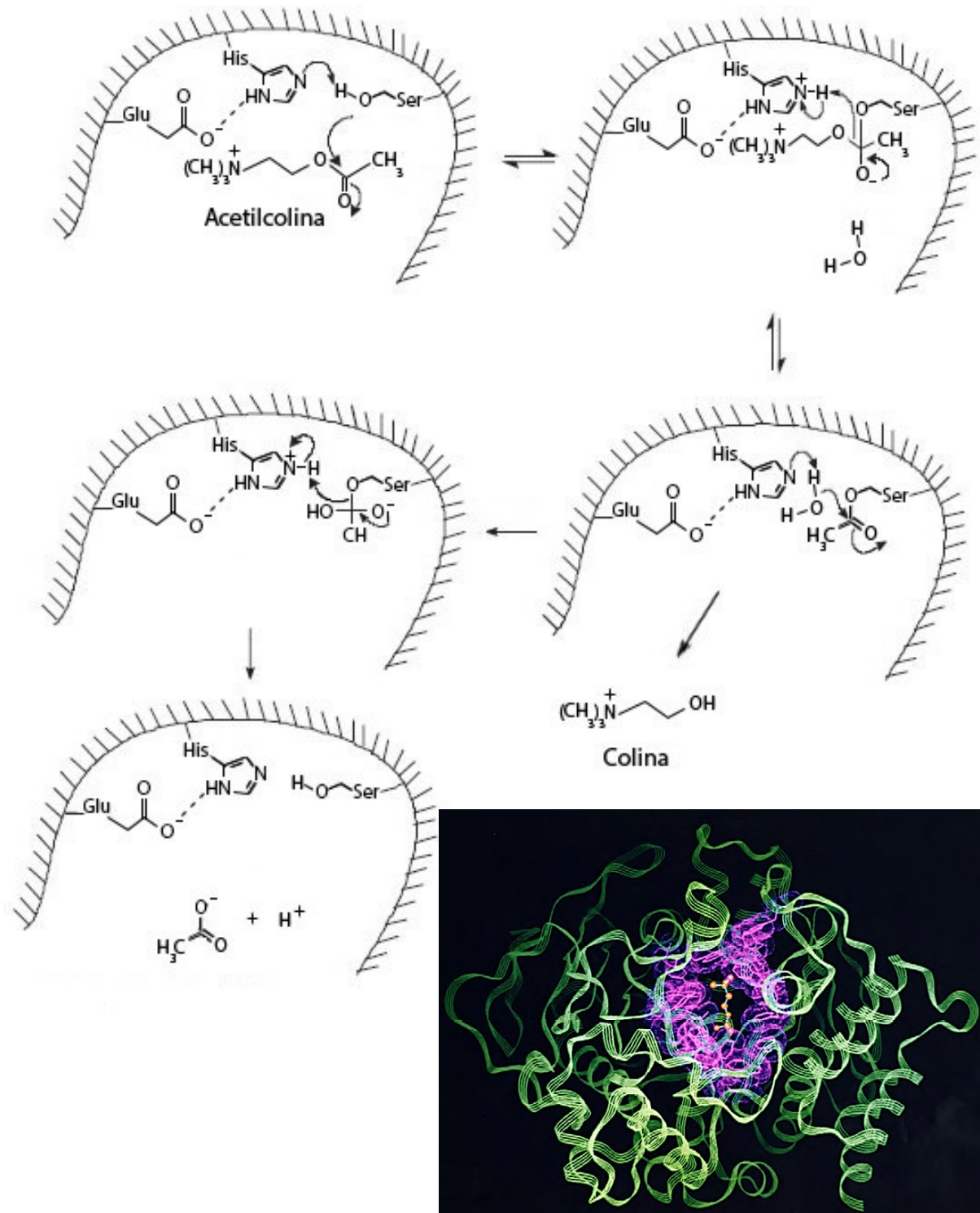
liberada do sítio ativo, e a enzima permanece ligada a um grupo acila pela serina, sendo chamada agora de acil-enzima. Esse passo é comum entre várias esterases, e a meia-vida desse intermediário é menor que 100 μ s. A histidina consegue catalisar uma transferência de próton proveniente de uma molécula de água para o grupo tetraédrico, restaurando a histidina e a serina do sítio ativo (QUINN, 1987; PRYOR et al, 1992).

1.4.1 Porções adicionais da garganta de AChE

Outra parte da garganta da AChE é o sítio aniônico, onde a ACh ou ATCh se ligam pela parte da colina. Esse sítio, na verdade, possui 14 resíduos aromáticos, que interagem com os grupos metila da colina, inicialmente de maneira fraca. Teorias sugerem que esses resíduos aromáticos guiam o substrato para dentro da garganta como uma esteira. Os resíduos aromáticos também atuam modificando a estrutura da enzima quando esta alcança o estado de transição com o substrato, principalmente os resíduos de fenilalanina que interagem por ligações π sobrepostas (ROSENBERRY; NEUMANN, 1977; DELFINO; RIBEIRO; FIGUEROA-VILLAR, 2009). Algumas porções menores também estão presentes na garganta, como o bolsão oxiânion, com resíduos de glutamina e asparagina, cujas cadeias nitrogenadas interagem com o grupo carbonila dos substratos, permitindo à histidina da tríade permanecer próxima do oxigênio do éster de ACh, ou do enxofre do tio éster de ATCh (Figura 5). Porém, o mecanismo de entrada do substrato nessa garganta e da saída dos produtos não é muito bem esclarecido (QUINN, 1987; DVIR et al, 2010).

A ação de inibidores faz uso desses sítios para uma maior interação com a enzima e bloquear fisicamente a entrada da garganta. O carbaryl não é diferente, e com a presença do grupo naftila, é fácil perceber a interação dele com o sítio aniônico, onde estão os vários resíduos aromáticos da garganta e, também, com o bolsão oxiânion, onde o grupamento carbonila interage. Como ele é grande o suficiente para fechar a entrada do sítio ativo, o carbaryl consegue inibir a entrada do substrato no sítio ativo (FORSBERG; PUU, 1984; QUINN, 1987).

Figura 5 – Imagens esquemáticas da garganta onde está o sítio ativo da enzima acetilcolinesterase e do mecanismo de ação catalítico



Mecanismo de ação da hidrólise da acetilcolina no sítio ativo da enzima acetilcolinesterase, onde é possível ver que a histidina capta um próton da serina, e esta forma um nucleófilo que ataca a carbonila da ACh, gerando um grupo tetraédrico. A histidina protonada é estabilizada pelo glutamato da tríade catalítica e a enzima torna-se acilada com a liberação a colina. Na desacilação, uma molécula de água entra no sítio ativo, ataca o grupo carbonila e a histidina captura o próton da água, permitindo a oxidação do grupo tetraédrico, instável, que irá recaptar o próton da histidina e ser liberado na forma de ácido acético. *Fonte: Dvir et al., 2010, modificado.*

1.5 Estudos cinéticos

O estudo da cinética e dinâmica da AChE ainda está em passos iniciais, o entendimento dessa molécula e sua atuação fisiológica ainda precisam ser melhor esclarecidos. Compreender os processos catalíticos também envolve entender a estrutura e funcionamento da dinâmica molecular por trás das altas taxas de catalisação proporcionadas pela AChE. O funcionamento dos inibidores da enzima também não pode ser trabalhado sem se compreender seu mecanismo molecular. Estudos cinéticos utilizam diferentes substratos, muitos sintéticos, para se buscar entender os mecanismos envolvidos na catálise enzimática. Essas substâncias apresentam similaridades com a ACh, porém não são totalmente iguais, e isso resulta em dados aproximados quando comparados com os obtidos com o substrato natural.

Algumas técnicas se apresentam como clássicas dentro do estudo da enzimologia, como o método espectrofotométrico, no qual a absorbância de uma molécula qualquer é medida em função de um determinado comprimento de onda. Para isso, um feixe de luz é aplicado sobre uma amostra, uma parte dessa luz atravessa a amostra e outra é absorvida. Um aparelho, denominado espectrofotômetro, consegue detectar a quantidade de luz que chega a seu sensor, e, subtraindo a absorbância do solvente, é capaz de dizer qual é a absorbância da amostra (RENDINA, 1976).

Porém, métodos como este, na enzimologia, normalmente carecem de uma espécie molecular que seja capaz de gerar um produto capaz de absorver no espectro luminoso. Para isso, frequentemente é necessário que outra reação acoplada ocorra para se visualizar o processo bioquímico, e a medida da reação torna-se indireta (HAYNES, 2012-2013).

Nesse cenário, análises diretas das reações são mais difíceis e utilizam aparelhos mais complexo. Um modo preciso e acurado de se realizar tais análises é por calorimetria, ainda que não seja tão sofisticado quanto a outros métodos analíticos. A vantagem nessa técnica é a utilização apenas da enzima e de seu substrato, conseguindo, por meio de experimentos controlados, determinar com muita precisão os valores cinéticos do processo enzimático (LEAVITT; FREIRE, 2001). Não só isso, como também pode servir com método comparativo entre um substrato comumente utilizado, como a ATCh, e o natural, ACh.

2 OBJETIVOS

Utilizar o método calorimétrico para determinação dos parâmetros cinéticos da catálise da acetilcolina, substrato natural, pela acetilcolinesterase, e comparar com os dados obtidos para cinética com um substrato artificial, a acetiltiocolina, assim como a inibição causada pelo carbaryl sobre a ação da enzima nesses dois substratos.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) caracterização dos parâmetros termodinâmicos de ativação tanto da catálise da acetilcolina quanto da acetiltiocolina pelo método calorimétrico;
- b) determinação dos valores cinéticos de k_{cat} e K_m de ambos os substratos, pelo método calorimétrico;
- c) comparar os valores obtidos das cinéticas utilizando calorimetria por diferentes análises matemáticas;
- d) comparar os valores cinéticos obtidos por calorimetria com os valores obtidos por espectrofotometria;
- e) comparar os valores de K_i obtidos para cada substrato para a inibição do carbaryl sobre a acetilcolinesterase.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Introdução à termodinâmica

As reações químicas podem ser caracterizadas como exergônicas ou endergônicas, onde as primeiras liberam energia e as segundas a absorvem. Como formar macromoléculas a partir de moléculas menores consome energia, uma célula viva é capaz de acoplar as diferentes formas de reações a fim de se obter um balanço energético propício para seu crescimento e replicação (SEGEL, 1993).

A forma encontrada pela bioquímica para determinar a espontaneidade de uma reação qualquer é definindo a variação da energia de Gibbs (G) a pressão e temperatura constantes. Uma reação é dita espontânea nesses termos quando ocorre diminuição da energia de Gibbs. Para se determinar a variação resultante da energia de Gibbs, usa-se a clássica equação (1):

$$dG = dH - TdS \quad (1)$$

Para se entender um pouco melhor essa ideia, deve-se definir um sinalizador da mudança espontânea, a entropia (S). Entropia é uma função de estado termodinâmica que exprime a ideia das possibilidades de dispersão de energia em um determinado processo, de acordo com a Segunda Lei da termodinâmica. Isso pode ser mais facilmente descrito como o número de modos como a energia térmica pode ser distribuída entre os estados permitidos em uma coleção de partículas, assim, cada um desses modos possui uma probabilidade igual de ocorrer, e cada um é chamado de microestado. Com isso, uma variação na forma como a energia é dispersa depende da quantidade de energia que é trocada na forma de calor. A troca de calor altera a energia cinética da vizinhança, ou seja, o movimento das moléculas dentro do sistema. O conceito de dS pode ser definido matematicamente como a razão entre dq_{rev} , o calor trocado reversivelmente entre sistema e vizinhança, e T , a temperatura termodinâmica. Simplificadamente, um processo reversível é aquele onde o sistema fechado, não isolado, muda infinitesimalmente de estado em um equilíbrio dinâmico sem dissipar energia ($\Delta S_{total} = 0$), e um processo irreversível é aquele onde isso não ocorre. Entendendo isso em uma forma finita:

$$\Delta S = \int_i^f \frac{\bar{d}q_{rev}}{T} \quad (2)$$

Com isso, a variação de entropia do sistema é o calor total trocado em cada etapa infinitesimal do processo dividido pela temperatura constante a qual a reação acontece (ATKINS; DE PAULA, 2012).

Se, em um sistema, podemos definir a energia interna como a somatória de calor e trabalho trocados pelo sistema, então, a Primeira Lei da termodinâmica pode ser descrita como:

$$dU = \delta q + \delta w \quad (3)$$

Onde U é a energia interna do sistema, que pode ser definida como a energia contida no sistema, excluindo quaisquer fatores externos como a energia potencial e cinética aplicadas ao sistema por forças externas. E q e w são o calor e o trabalho, respectivamente, trocados pelo sistema. Se a δw é dado para qualquer movimento percebido nas vizinhanças ocasionado por uma variação infinitesimal do volume (V) do sistema sobre determinada pressão externa constante (p_{ex}), quando o sistema não altera seu volume, pode-se dizer que não foi realizado trabalho e dU é igual a dq .

Para um sistema que altera o seu volume ou o mantém sob determinada p_{ex} , o calor absorvido pelo sistema, em qualquer condição diatérmica, não pode ser considerado igual à U . Com isso, parte da energia trocada com o sistema na forma de calor, sai ou retorna à vizinhança na forma de trabalho de compressão/expansão. Se p_{ex} é constante, como a pressão atmosférica, outra função de estado pode ser lançada para se entender uma transformação química, a entalpia (H), definida como uma função de estado onde qualquer variação infinitesimal é:

$$dH = dU + dpV \quad (4)$$

Nesse caso, p é a pressão interna do sistema. Substituindo a equação (4) com a **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, tem-se:

$$dH = \delta q + \delta w + pdV + Vdp \quad (5)$$

Se o sistema estiver em equilíbrio dinâmico com a vizinhança ($p = p_{ex}$) pode-se dizer que $\delta w = 0$ e, $pdV = 0$. Como as reações biológicas ocorrem à pressão constante, $dp = 0$. Assim a equação (5) transforma-se na igualdade fundamental para se entender a calorimetria:

$$dH = \delta q \quad (6)$$

Ao se retornar à equação (2), com a ideia que o calor trocado em um processo reversível é sempre maior que o calor trocado em um processo irreversível, tem-se que:

$$dS \geq \frac{dq}{T} \quad (7)$$

A equação (7) é também conhecida como Desigualdade de Clausius. Como a equação (6) demonstra que a quantidade de calor trocado com o sistema é igual à variação de entalpia do sistema quando a pressão é constante, a desigualdade torna-se:

$$TdS \geq dH \quad \therefore dH - TdS \leq 0 \quad (8)$$

Analisando essa afirmação, a equação (8) é a própria Segunda Lei da termodinâmica, pois, se a entalpia for constante assim como a pressão (sistema fechado), a variação da entropia é sempre positiva. Agora é possível tornar essa equação mais simples, igualando-a a uma nova função de estado, a energia de Gibbs, como mostrado pela equação (1). Assim, para qualquer reação espontânea, $(dG)_{T,p} \leq 0$ (ATKINS; DE PAULA, 2012).

3.1.1 Variação da energia de Gibbs padrão da reação, $\Delta_r G^\ominus$

Como definido pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o estado padrão é:

Estado de um sistema escolhido como padrão para referência por convenção. (...) Para um soluto em solução é o estado (hipotético) do soluto à molalidade padrão m^\ominus , pressão padrão p^\ominus ou concentração padrão c^\ominus .

Os termos citados acima também são definidos pela mesma IUPAC onde $p^\ominus = 10^5$ Pa, $m^\ominus = 1 \text{ mol kg}^{-1}$ e $c^\ominus = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ (IUPAC, 1997). Como descrito, a variação da energia de Gibbs padrão pode ser definida como a diferença de energia de Gibbs, G , entre os produtos e os reagentes puros em uma concentração ou molalidade padrões a uma pressão padrão. Para valores cujas condições experimentais carregam erros que não são conhecidos, as constantes apresentam o termo de aparente, como o símbolo ' adicionado.

Como visto anteriormente, a combinação simples entre H e S resulta em uma nova função de estado, G , que consegue dizer a tendência do sentido de uma reação, onde temperatura termodinâmica, T , e pressão, p , são constantes. Deve-se notar que o valor de $\Delta_r G^\ominus$ não prediz a velocidade que a reação ocorre, apenas a tendência dessa ser espontânea ou não nas condições fixadas.

O valor de energia de Gibbs padrão é definido apenas para uma reação conduzida sob condições padrões, ou seja, cada reação possui apenas um valor de $\Delta_r G^\ominus$. Em contraste a isso, toda reação possui infinitos valores de $\Delta_r G$, pois reflete a mudança contínua até atingir um estado de equilíbrio entre reagentes e produtos e as infinitas possíveis composições entre esses desde o extremo onde somente há reagentes puros até o outro extremo onde somente há produtos puros, não significando necessariamente, que todo reagente será transformado em produto.

Quando o valor de $\Delta_r G = 0$, significa o ponto onde os produtos e reagentes estão em equilíbrio nas condições físico-químicas determinadas para aquele sistema. Se as condições são as mesmas para o estado padrão, então é possível saber o valor de $\Delta_r G^\ominus$, conhecendo-se o valor da constante de equilíbrio, K_{eq} , de qualquer reação química. E, com isso, é possível, também, descobrir quais os valores de entalpia e entropia (SOLOMONS; FEYHLE, 2012), (PIEKLIK; GUYNN, 1975).

$$\Delta_r G = \Delta_r G^\ominus + RT \ln K_{\text{eq}} \quad (9)$$

Onde R é a constante universal dos gases (SOLOMONS & FEYHLE, 2012).

Para sistemas onde é conhecido $\Delta_r H^\ominus$ em diferentes temperaturas, T , é possível calcular $\Delta_r G^\ominus$ para outras temperaturas apenas conhecendo o valor em uma, através da equação de Gibbs-Helmholtz:

$$\frac{\Delta_r G^\ominus_{T_1}}{T_1} - \frac{\Delta_r G^\ominus_{T_2}}{T_2} = (\Delta_r H^\ominus)_p \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (10)$$

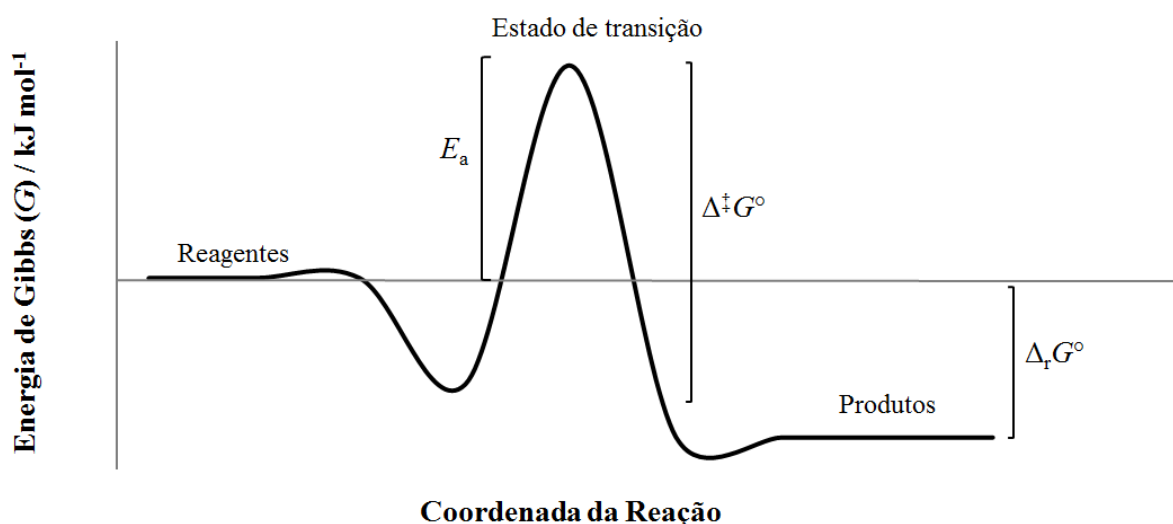
Nesse caso, considera-se que $\Delta_r H^\ominus$ é próximo de uma constante, pois o calor liberado em função da mudança de temperatura é muito pequeno. De outro modo, há a necessidade de calcular o calor específico à pressão constante, C_p , dos reagentes e produtos (ATKINS & DE PAULA, 2012).

3.1.2 Energia de ativação, E_a

Em processos químicos gerais, as moléculas possuem diferentes tipos de energia nas formas cinéticas e potenciais. No movimento dessas moléculas dentro do sistema, o choque colisional pode levar a transformações químicas dessas partículas. Para que essa mudança possa ocorrer é necessário vencer uma barreira energética, chamada de energia de ativação, E_a , primeiramente introduzida por Svante Arrhenius em 1889 (LEVINE, 2004).

Em um processo dinâmico, uma molécula alcança um determinado estado ativado em uma reação, chamado de estado de transição, que é a conformação de maior energia potencial que a molécula pode obter durante a reação. Assumindo uma reação irreversível, as moléculas dos reagentes que alcançam esse estado formarão produtos. Assim, em uma coordenada de reação (Gráfico 1) os reagentes se transformam em produtos sempre que ultrapassem essa barreira energética.

Gráfico 1 – Representação de uma coordenada de reação hipotética



O estado basal dos reagentes é maior que a energia dos produtos, e o pico separando os dois é referente à energia de ativação. A variação da energia de Gibbs padrão de ativação, $\Delta^{\ddagger}G^{\ominus}$, é a diferença entre o máximo de energia da reação e a energia dos reagentes. (Fonte: *Autoria própria.*)

Então, pode-se definir a variação da energia de Gibbs padrão de ativação, $\Delta^{\ddagger}G^{\ominus}$, como a diferença entre as energias de Gibbs dos reagentes e o estado de transição. É importante manter em mente que esse parâmetro cinético descreve uma relação de equilíbrio entre reagentes e reagentes ativados no estado de transição, e isso é uma aproximação, pois o estado de transição é apenas um ponto pelo qual os reagentes passam até se tornarem produtos (LONHIENNE; GERDAY; FELLER, 2000).

Como a relação entre G e H e S se mantém ainda que se refiram a um estado ativado, podemos também obter os mesmos parâmetros para reações químicas, assim:

$$\Delta_r G^{\ominus} = \Delta_r H^{\ominus} - T \Delta_r S^{\ominus} \quad (11)$$

Para obter esses valores experimentalmente, alguns recursos matemáticos são lançados. O próprio Arrhenius propôs uma relação entre a velocidade da reação e a

temperatura onde essa ocorre (WILSON e CABIB, 1956; LONHIENNE, GERDAY e FELLER, 2000; WOLFENDEN e YUAN, 2011), criando a famosa equação de Arrhenius:

$$k = Ae^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \quad (12)$$

Onde k a constante de velocidade da reação, i.e, de formação de produtos por tempo, A é o fator pré-exponencial, que pode ser medido empiricamente ou algebricamente, e R é a constante universal dos gases e E_a é a energia de ativação. Em uma maneira mais fácil e, ainda assim, acurada, pode-se medir experimentalmente a reação em diferentes T e determinar a velocidade nessas temperaturas, e rearranjando a equação, obtém-se uma relação linear entre $\ln(k)$ e T^{-1} , assim:

$$\ln(k) = \frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln A \quad (13)$$

Em 1935, Eyring e Polanyi propuseram, quase que juntos, uma relação que se assemelha à equação de Arrhenius, porém com $\Delta^\ddagger G^\ominus$, assim, tendo em mente a equação (11), tem-se:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{\left(\frac{\Delta^\ddagger S^\ominus}{R}\right)} e^{\left(\frac{-\Delta^\ddagger H^\ominus}{RT}\right)} \quad (14)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, e h é a constante de Planck (PETERS et al, 2012). De acordo com Eyring e Polanyi, a relação $(k_B T/h)$ denota a constante universal para um estado de transição, e não depende da reação em questão (WOLFENDEN, 1976; DAVIS; DAVIS, 2003). Rearranjando a equação (14) para uma forma linear, tem-se:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \frac{-\Delta^\ddagger H^\ominus}{R} \left(\frac{1}{T}\right) + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta^\ddagger S^\ominus}{R} \quad (15)$$

Com essa equação é possível determinar em uma única análise os valores de $\Delta^\ddagger S^\ominus$ e de $\Delta^\ddagger H^\ominus$ e, conseqüentemente, de $\Delta^\ddagger G^\ominus$. Percebe-se que o valor do primeiro termo da equação (14), $(k_B T/h) \times \exp(\Delta^\ddagger S^\ominus/R)$, possui uma relação da mesma ordem que o fator A da equação (12), e expressa se a formação do grupo ativado é mais ou menos fácil, dependendo se o grau de liberdade é menor ($\Delta^\ddagger S^\ominus > 0$) ou maior ($\Delta^\ddagger S^\ominus < 0$) que o estado basal dos reagentes; também, $\Delta^\ddagger H^\ominus$ tem mesma significância que E_a , ambos descrevem a diferença de energia entre o estado basal e o estado ativado em termos de calor trocado (LONHIENNE, GERDAY e FELLER, 2000; PETERS et al, 2012). Assim, é possível determinar as constantes termodinâmicas de ativação, ao se utilizar qualquer uma das aproximações típicas da área, utilizando a equação de Eyring (14) ou a equação de Arrhenius (12). A vantagem sobre Eyring é a possibilidade de

se obter duas variáveis da equação (11) em uma só análise. Porém, como o cálculo para a variação da energia de Gibbs padrão de ativação é indireto, ou seja, necessita da obtenção de outras constantes, a aproximação não mostra que $\Delta^\ddagger G^\ominus$ seja diretamente proporcional ao k_{cat} , também chamado de número de renovação, explicado a seguir. Por isso, comparar os dados obtidos por Eyring com a aproximação de Arrhenius é interessante para se mostrar livre de dados enviesados (LONHIENNE; GERDAY; FELLER, 2000). O valor de k_{cat} pode ser entendido como o número de moléculas que uma enzima converte por unidade de tempo, como é uma constante de 1ª ordem, é expresso em s^{-1} (FERSHT, 1977). Pode ser definido após reorganização das equações (11) e (14):

$$k_{\text{cat}} = \ln \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta^\ddagger G^\ominus}{RT}} \quad (16)$$

Para tanto, um cálculo direto do valor de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ para uma temperatura pode ser feito com a equação:

$$\Delta^\ddagger G^\ominus = RT \left(\ln \frac{k_B T}{h} - \ln k_{\text{cat}} \right) \quad (17)$$

Por esse processo, o cálculo para $\Delta^\ddagger H^\ominus$ e $\Delta^\ddagger S^\ominus$ podem ser feito pela relação entre a energia de ativação e entalpia de ativação, e pela relação da equação (11) (ATKINS & DE PAULA, 2012). Assim, reescrevendo as equações de Arrhenius (13) e a equação (14):

$$\ln(k_{\text{cat}}) = \frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \ln A \quad (18)$$

$$\frac{d(\ln k_{\text{cat}})}{dT} = \frac{E_a}{RT} \quad (19)$$

$$\frac{d(\ln k_{\text{cat}})}{dT} = \frac{1}{T} + \frac{\Delta^\ddagger H^\ominus}{RT^2} = \frac{\Delta^\ddagger H^\ominus + RT}{RT^2} \quad (20)$$

$$\Delta^\ddagger H^\ominus = E_a - RT \quad (21)$$

3.2 Cinética enzimática

Enzimas são, em sua grande maioria, proteínas e são capazes de acelerar uma reação química por diminuírem a energia de ativação de uma reação qualquer. Para conseguirem isso, elas dispõem de mecanismos moleculares como a complementaridade pelo substrato, grupos reativos e uso de cofatores/coenzimas. O estudo desses mecanismos adotados pelas

enzimas para acelerar uma reação, assim como as velocidades que possuem em cada etapa do processo é chamado de cinética enzimática. Elucidar cada ponto da reação catalisada permite entender o mecanismo de funcionamento de uma enzima, assim como os possíveis alvos de inibição que podem ser utilizados por um fármaco ou outro inibidor (SEGEL, 1993).

3.2.1 *Catálise Enzimática*

Os processos químicos biológicos são viabilizados por atividades enzimáticas, uma vez que esses processos levariam muito tempo para ocorrerem, ainda que tenham favorecimento entrópico ou entálpico. Enzimas são definidas como catalisadores biológicos específicos que atuam estabilizando os estados de transição e o próprio estado de transição em seu sítio ativo, diminuindo, assim, E_a necessária para a continuidade da reação. De fato, enzimas possuem uma maior afinidade de interação com o estado de transição do que com o substrato em si, isso por si só já torna a reação mais rápida, pois parte da energia necessária para que o substrato alcance o estado de transição é diminuída pelas interações com a enzima. Isso altera $\Delta^\ddagger G^\ominus$, porém como não modificam a energia nem de substrato nem de produto, o $\Delta_r G^\ominus$ não é modificado (FERSHT, 1977).

A maioria das enzimas são cadeias polipeptídicas únicas, mas podem também ser complexos proteicos ou mesmo possuírem outros polímeros biológicos, como RNA. Algumas ainda necessitam de cofatores para a catálise, que funcionam como aceptores ou doadores de grupos funcionais. Todas as enzimas, como partes de um organismo biológicos, atuam sob as condições fisiológicas dos mesmos, necessitando de pH, temperatura e força iônicas ótimas para seu funcionamento (FERSHT, 1977; SEGEL, 1988; SOLOMONS e FEYHLE, 2012).

No entendimento do processo catalítico realizado por uma enzima, pode-se realizar uma aproximação tal que:



Nesse esquema simplificado, há duas partes distintas, na primeira há a formação e quebra do complexo enzima-substrato, ES , em uma reação de segunda-ordem tipo II; na segunda há a quebra de $[ES]$ em produto $[P]$ e enzima $[E]$, em uma reação de primeira-ordem.

Os pesquisadores Leonor Michaelis e Maud Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913) trabalharam com enzimas invertases e conseguiram chegar a um modelo matemático

para demonstrar uma catálise enzimática irreversível. Levando em consideração a lei de ação das massas, o esquema (22) pode ser transcrito para a forma de uma equação:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (23)$$

3.2.2 Pressupostos do estado estacionário

Para que a relação descrita em (23) possa ser simplificada à famosa equação de Michaelis-Menten, que descreve uma hipérbole retangular, algumas suposições devem ser feitas (BRIGGS; HALDANE, 1925; SEGEL, 1993; FERSHT, 1977):

- a) A reação nos períodos iniciais entra em um estado estacionário, onde $d[ES]/dt = 0$. Com isso, é possível igualar os termos de (23), e essa aproximação é válida, pois enzimas não são consumidas durante a reação, com isso, a taxa de formação de $[ES]$ é igual a sua taxa de quebra;
- b) A reação inversa de produtos $[E] + [P]$, para a formação do complexo $[ES]$ é desprezível. Ainda que isso não seja totalmente verdade, na maioria das enzimas estudadas *in vitro* as condições podem ser criadas para que esse pressuposto se torne aceitável, i.e., nas velocidades iniciais, v_0 , onde $[P] \approx 0$;
- c) A inibição ocasionada pelo acúmulo de produtos é desprezível. Outra vez um pressuposto que deve ser tratado com cuidado, pois, ainda que exista, nas condições experimentais isso pode e deve ser minimizado, exceto onde essa inibição é muito forte;
- d) Apenas um complexo $[ES]$ existe na reação, i.e., $[ES]$ é clivado diretamente a $[E] + [P]$;
- e) A $[E]_{\text{total}}/([S]_0 + K_m) \ll 1$, ou seja, a concentração de substrato inicial, $[S]_0$, é muito maior que a concentração de enzima total, de modo que pouco substrato esteja ligado à enzima (SCHNELL; MAINI, 2000).

Esses pressupostos são conhecidos como aproximação do estado quase-estacionário padrão (sQSSA – *standard Quasi-Steady State Approximation*). Ao medir as velocidades iniciais (v_0), ou seja, as velocidades nos tempos iniciais da reação em cada $[S]$, obtêm-se várias retas cujas inclinações são as taxas de formação de produto, $d[P]/dt$. Ao se comparar essas velocidades iniciais com as próprias $[S]$, para a maioria das enzimas estudadas, uma

hipérbole retangular surge. Com os pressupostos acima descritos para os dados obtidos experimentalmente, obtém-se a partir de (23) a equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{[E]_{total} \cdot k_2 \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (24)$$

Onde $[E]_{total} \times k_2 = V_{max}$, e K_m , a constante de Michaelis, é definida como a razão entre as constantes da reação, $(k_{-1} + k_2)/k_1$. A constante k_2 também é conhecida como k_{cat} , mas pode assumir outros valores quando esquemas cinéticos mais complexos são propostos (SEGEL, 1988; SCHNELL; MAINI, 2000).

3.2.2.1 Eficiência catalítica

Análises enzimológicas geralmente são analisadas do ponto de vista da “eficiência catalítica”, onde a razão k_{cat}/K_m é vista como um indicador útil da capacidade relativa de processamento de diferentes substratos por uma mesma enzima (CORNISH-BOWDEN; CÁRDENAS, 2010). Desde o início do estudo de enzimas, a utilização dessa razão para comparar enzimas diferentes se mostrou uma questão recorrente na literatura. Em 2007, Eisinger e colaboradores mostraram que diferentes enzimas podem ter mesma razão k_{cat}/K_m dependendo da concentração de substrato utilizados no ensaio, e que, sozinho, não é um indicador muito razoável da eficiência de enzimas distintas, porém ainda útil quando utilizado para se comparar uma mesma enzima com diferentes substratos (EISENTHAL; DANSON; HOUGH, 2007; CARILLO; CECARRELI; ROVERI, 2010).

Em sQSSA, pode-se afirmar que as enzimas que possuem altas capacidades catalíticas, ou seja, processam a reação de formação de produto em tempos muito curtos, apresentam, nas velocidades iniciais, a constante k_2 muito maior que k_{-1} . Essa afirmação só pode ocorrer nas condições de tempos iniciais e onde $[S]$ é pequeno, ou seja, $[E]_{livre} \approx [E]_{total}$, pois $[ES]$ formado é muito pequena. Esse pressuposto torna o valor de k_{cat}/K_m necessariamente menor ou igual a qualquer constante de segunda-ordem no sentido de formação do complexo enzima-substrato, ou seja, k_1 , como demonstrado nas equações a seguir:

$$\frac{k_2}{K_m} = \frac{k_2 k_1}{k_2 + k_{-1}} \quad \text{se } k_2 \gg k_{-1} \quad \therefore \quad \frac{k_2}{K_m} \approx k_1 \quad (25)$$

Assim, k_{cat}/K_m seria a constante de segunda-ordem aparente, ou o maior valor que a velocidade de formação pode atingir no extremo caso onde o fator limitante da reação é o

encontro da enzima com o substrato. Esse valor máximo foi avaliado como próximo a 10^8 a 10^9 $(\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$ (BRIGGS; HALDANE, 1925; LESKOVAC, 2003; KUZMIĆ, 2009).

3.2.3 *Inibição enzimática*

Muitas doenças atuam em processos biológicos inibindo a atuação de enzimas, de maneira semelhante, fármacos contra algumas doenças ou microrganismos patogênicos também atuam como inibidores específicos das enzimas envolvidas nesses processos nocivos. Esses inibidores causam um acúmulo de substrato sem permitir a formação de produto na catálise enzimática (WIGGERS, 2007).

Estudos cinéticos comparativos entre a presença e a ausência de inibidores ainda são úteis para a determinação dos parâmetros de inibição, a despeito de processos computacionais que conseguem prever com certa precisão a capacidade de uma molécula qualquer inibir uma enzima específica, com base em estudos de interação molecular utilizando as estruturas tanto do inibidor quanto da enzima (KAKKAR; BOXAMBAUM; MAYERSOHN, 1999; GOULART, 2012).

Enzimas podem sofrer diferentes tipos de inibição, classificadas quanto a ligação à enzima, sendo reversíveis (interações fracas tipo van der Waals ou eletrostáticas) dos tipos competitiva, acompetitiva, não-competitiva ou mista, ou inibição irreversíveis (ligações covalentes). Basicamente um inibidor competitivo atua competindo com o substrato pelo sítio ativo da enzima, um não-competitivo atua se ligando à enzima em outro lugar que não o sítio ativo, e acompetitiva parece com a não-competitiva, mas se liga especificamente ao complexo $[ES]$ (ASCENZI; ASCENZI; AMICONI, 1987; WIGGERS, 2007).

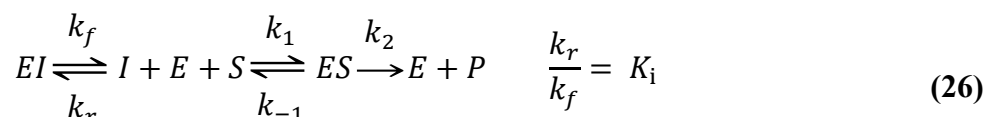
3.2.3.1 Inibidor competitivo

Uma molécula que é considerada um inibidor competitivo liga-se cineticamente como um substrato ou, ainda, em semelhança molecular com o estado de transição, porém como sua estrutura não é a mesma, não há a continuidade da reação química. Assim, com o acréscimo de inibidor junto à enzima, há uma diminuição da catálise enzimática.

Desse modo, em estudos cinéticos, percebe-se uma diminuição de $[ES]$, pois parte de $[S]$ não liga à $[E]$, com isso o valor de k_1 aparente é reduzido, mas uma vez que ocorra a formação do complexo, a catálise acontece, de modo que k_{cat} não é modificado. Como explicado em 3.2.1, K_m é uma razão entre as constantes, logo se k_1 diminui, mas a taxa de

clivagem de $[ES]$ se mantém, K_m aumenta, com isso ele passa a ser chamado de constante aparente de Michaelis, $K_{m,app}$. Como também explicado na mesma seção, $[E]_{total} \times k_{cat} = V_{max}$, e, como dito, o inibidor competitivo não atua sobre $[P]$ e nem sobre $[S]$, as taxas de formação desses a partir de $[ES]$ mantêm-se inalteradas, assim observa-se o mesmo V_{max} da reação na presença do inibidor (FORSBERG e PUU, 1984; LINDGREN, LINDGREN, *et al.*, 1985).

Com isso, o esquema (22), torna-se:



Onde I é o inibidor e K_i é a constante de dissociação do inibidor, i.e., a concentração onde metade do inibidor está ligada à enzima na ausência de substrato, e esse esquema só é válido para inibidores reversíveis, onde a velocidade de dissociação do inibidor da enzima pode ser observada. Esse conceito é diferente de I_{50} , definida como $[I]$ que produz metade de inibição (CHENG; PRUSOFF, 1973). Por definição:

$$I_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right) \quad (27)$$

Assim, como o valor de K_i é uma razão entre $[E][I]/[EI]$ quando $[P]$ gerado é insignificante, e a $[E]_{total} = [E]_{livre} + [ES] + [EI]$, obtém-se:

$$v_0 = \frac{[E]_{total} \cdot k_2 \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (28)$$

Dessa forma, em um estudo cinético onde se realiza os ensaios na ausência e na presença de diferentes concentrações do inibidor, é possível obter o valor de K_i , mas como I_{50} depende da $[S]$, seu valor varia de acordo com as condições de cada experimento (CHENG; PRUSOFF, 1973). Essa aproximação de Cheng-Prusoff é válida para condições onde não há uma ligação forte entre inibidor e enzima, ou seja $[E] > K_i$, caso esse pressuposto não seja atendido, outro método deve ser utilizado, levando em consideração a concentração enzimática (CHA, 1975).

3.2.4 Obtenção dos valores de V_{max} , K_m e K_i por métodos lineares

Várias são as formas para se obter os valores cinéticos de uma reação enzimática experimental. No princípio da enzimologia, enzimas chamadas de enzimas de Michaelis-Menten, isto é, que seguem a cinética clássica já descrita, tinham a sua curva de reação

avaliadas por métodos matemáticos mais simples. Uma das formas mais utilizadas até hoje na literatura, é o duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934), onde:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad (29)$$

No caso citado, quando $1/[S] = 0$, a reta cruza o eixo $1/v_0$ no valor de $1/V_{\max}$, e o K_m é obtido multiplicando esse valor pela inclinação da reta ou é o intercepto de $1/[S]$ quando $1/v_0 = 0$. Essa linearização possui uma falta de precisão, i.e., um coeficiente de variação alto, principalmente porque os parâmetros gerados são preponderantemente afetados pelos resultados em baixas concentrações de substrato, exatamente aqueles mais sujeitos a erros experimentais (DOWD; RIGGS, 1964; ATKINS; NIMMO, 1975; TSENG; HSU, 1990). Outros modelos lineares comumente vistos em trabalhos de enzimologia básica são os de Hanes-Woolf, Eisenthal-Cornish-Bowden e Eadie-Hofstee (TSENG; HSU, 1990). Esse último, Eadie-Hofstee, apresenta a variável dependente tanto no eixo das ordenadas quanto das abcissas, o que leva ao rearranjo dos erros ao longo da regressão linear. Desse modo:

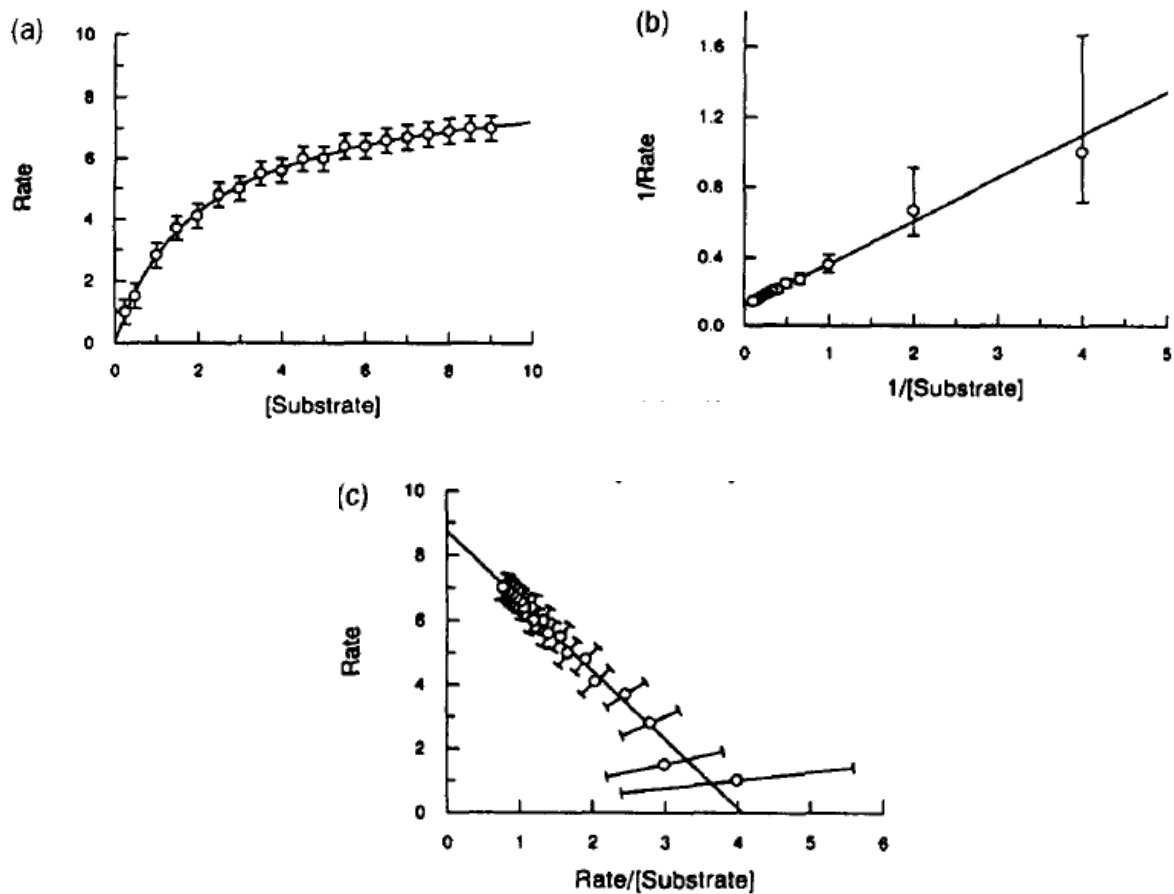
$$v_0 = -K_m \left(\frac{v_0}{[S]} \right) + V_{\max} \quad (30)$$

Esse modelo retorna os valores para K_m e V_{\max} mais diretamente que os outros citados, tornando a análise mais rápida, porém com um aumento do erro associado (FUHRMANN; VÖLKER, 1993).

Uma regressão linear comum assume que o erro está em apenas um dos eixos, geralmente com a variável dependente, como no duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ou de Hanes-Woolf, o que é coerente, uma vez que a $[S]$ pode ser razoavelmente controlada. Ao contrário desse pressuposto, a análise de Eadie-Hofstee coloca o erro em ambos os eixos da regressão (Gráfico 2).

Para que esses dados tenham os erros minimizados, pesos estatísticos diferenciados devem ser associados a essas análises. Porém, nem todo programa estatístico que era comumente utilizado possuía maneira para realizar uma pesagem diferenciada (LEATHERBARROW, 1990; FUHRMANN; VÖLKER, 1993). Hoje, praticamente todos já possuem condições para se realizar uma regressão tanto linear quanto não-linear melhor ajustada para dar pesos e significância diferenciada aos pontos da curva.

Gráfico 2– Gráficos de dados brutos e regressões lineares nos modelos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee, com os erros associados



Os gráficos mostram os efeitos que regressões lineares causam aos erros de dados cinéticos. Em (a) é mostrado dados brutos com erros constantes hipotéticos, ajustados para a equação de Michaelis-Menten, em (b) é mostrado uma análise com o modelo de Lineweaver-Burk, percebe-se um aumento do erro em pontos iniciais da cinética, e em (c) uma análise com Eadie-Hofstee, onde nota-se a presença de erro em ambos os eixos. (Fonte: *Leatherbarrow, 1990, p. 456*)

Métodos para encontrar K_i também existem vários, os mais comuns para análises lineares são o gráfico de Dixon e o método de $K_{m,app}$. O método de Dixon também coloca no eixo das abcissas o inverso das velocidades e nas ordenadas a concentração de inibidor, nesse método, o K_i é definido no ponto onde as curvas de cada concentração de substrato se encontram (BUTTERWORTH, 1972).

O método de $K_{m,app}$ utiliza uma aproximação onde, no eixo das abcissas, a razão entre o $K_{m,app}/V_{max}$ é colocado em função da concentração de inibidor, assim onde a reta cruzar o eixo x quando $y = 0$, será $-K_i$, de acordo com a função:

$$\frac{K_m}{V_{max}} = \frac{K_m}{V_{max}K_i} ([I]) + \frac{K_m}{V_{max}} \quad (31)$$

Esse modelo apresenta o mesmo problema já discutido, com a necessidade de incluir pesos estatísticos no método dos mínimos quadrados, geralmente ignorados, na análise de regressão linear (KAKKAR; BOXAMBAUM; MAYERSOHN, 1999).

É importante notar que, na maioria das condições fisiológicas e experimentais observadas, as quantidades de inibidor são maiores que as quantidades de enzima. Assim, a concentração de inibidor inicial é, aproximadamente, a quantidade de inibidor livre durante a cinética enzimática, pois apenas parte dele estará ligada à enzima. Porém, em condições onde isso não ocorra, o inibidor competitivo livre diminui ao longo do tempo, pois parte dele se ligará à enzima, e o que pode levar a erros nos valores de K_i obtidos. (FUKUSHIMA; USHIMARU; TAKAHARA, 2002).

3.2.5 Análises não-lineares para obtenção dos parâmetros cinéticos

A alternativa para os modelos mais simples citados é a análise de regressão não-linear dos dados cinéticos, isso pois a curva de velocidade da enzima por concentração de substrato apresenta-se como uma hipérbole retangular, ou seja, uma função que depende de duas constantes relacionadas (K_m e V_{max}) e a variável independente. O ajuste direto de uma hipérbole retangular à distribuição dos dados, utilizando a equação de Michaelis-Menten e métodos de iteração computacionais, minimiza a soma dos quadrados dos erros. Nesse caso, considera-se que a variável dependente possui erros mais ou menos constantes ao longo de toda a curva (DUGGLEBY, 2009).

Desse modo, não há a necessidade de rearranjo dos dados cinéticos para análise, evitando distorção nos erros associados. A única diferença prática entre o uso desse modelo para os anteriores era a capacidade para se realizar tais análises, uma vez que o processo iterativo demanda sucessivos cálculos impraticáveis de se forem feitos à mão. Como, hodiernamente, os computadores pessoais possuem capacidade de processamento de dados superior a um computador médio anterior à década de 1980, essas análises, inclusive os modelos lineares, podem ser executados em programas computacionais rotineiramente utilizados em laboratório, como o GraphPad Prism[®], SigmaPlot[®] ou Origin[®] (GOLIČNIK, 2013).

As análises não-lineares diretamente com os dados de v_0 contra $[S]$ também podem ser utilizados para o cálculo de K_i , bastando que se analise simultaneamente as curvas

cinéticas na ausência e presença de quantidades crescentes de inibidor (KAKKAR; BOXAMBAUM; MAYERSOHN, 1999).

3.2.6 Forma integrada de Michaelis-Menten

Desde a sua formulação pelos pesquisadores Michaelis e Menten, a equação (24) pode ser reescrita em uma superposição de função linear e logarítmica, obtida pela integração da equação de Michaelis-Menten (HOMMES, 1962):

$$V_{\max}t = K_m \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]_t} \right) + [S]_0 - [S]_t \quad (32)$$

Onde $[S]_0$ é a concentração do substrato inicial, e $[S]_t$ é a concentração de substrato em um tempo t , as outras constantes já foram definidas no texto. Dessa forma, a função é dita implícita, com várias variáveis, as quais podem ser resolvidas pelo método numérico, inclusive com o auxílio do Microsoft® Office Excel (NIMMO; ATKINS, 1974; BEZERRA; DIAS, 2007; GOLIČNIK, 2012; BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013). Impraticável de ser resolvida na época que foi apresentada, por falta de algoritmos capazes de resolver problemas complexos e, certamente, de computadores. De certa forma, foi mais conveniente trabalhar os dados de (24) para simplificar a análise de uma cinética enzimática, assim como proposto por Lineweaver e Burk (1934).

Para uma reação com um inibidor competitivo, pode-se calcular o valor da constante de inibição, K_i , sabendo a concentração do produto $[P]_t$, em cada tempo t , tem-se:

$$t = \frac{1}{V_{\max}} \left\{ \left(1 - \frac{K_m}{K_i} \right) ([P]_t - [I]) + K_m \left(\frac{[S]_0}{K_i} + \frac{[I]}{K_i} + 1 \right) \times \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]_0 + [P]_t} \right) \right\} \quad (33)$$

A vantagem ao se utilizar essa equação em detrimento das anteriores é o fato de não requerer o cálculo das velocidades iniciais em cada concentração de substrato, e a capacidade de se resolver, em condições muito bem determinadas, por apenas as curvas de $[S]_0$ e $[P]_t$ os parâmetros de K_m e V_{\max} . As condições experimentais para realizar o ensaio com apenas uma concentração de substrato exigem uma concentração de enzima maior que o preconizado pela sQSSA, sendo necessário uma outra aproximação, a rQSSA (*reverse Quasi-Steady State Assumption*), na qual também será possível calcular as constantes de primeira ordem e de segunda ordem da reação de formação e quebra de $[ES]$ (SCHNELL; MENDOZA, 1997; SCHNELL; MAINI, 2000).

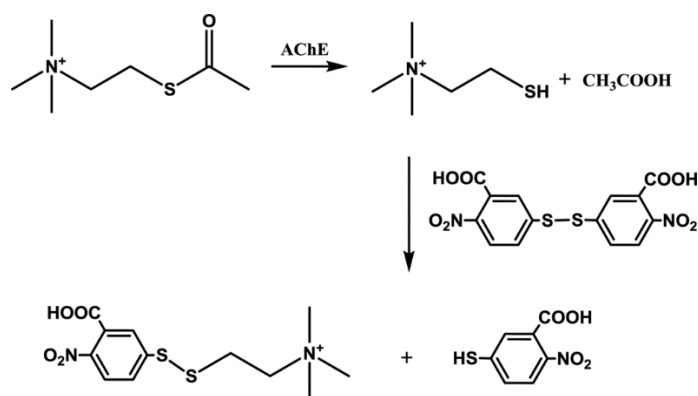
Outra forma de se obter os parâmetros com uma curva simples de $[S]_0$ sem a necessidade de uma outra aproximação ou mesmo de processos numéricos é utilizando a forma fechada explícita da equação (32), realizada por Schnell e Mendoza (1997), onde a equação gerada é expressa em termos da função ômega, ou W - Lambert, sendo que as taxas da reação são apresentadas em função do tempo e não de $[S]$ (SCHNELL; MENDOZA, 1997; GOUDAR; SONNAD; DUGGLEBY, 1999; GOLIČNIK, 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Método de Ellman

A técnica laboratorial mais comumente utilizada para se medir a atividade da enzima acetilcolinesterase é o método de Ellman, onde um substrato artificial, acetiltiocolina (ATCh), é utilizado para se medir a atividade enzimática. Nesse método, a formação do produto tiocolina da catálise, deve ser visualizado pela reação dessa com um outro reagente presente no meio, o DTNB (ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico)) (ELLMAN et al, 1961). O DTNB é um composto solúvel em água que consegue reagir com compostos que possuem um grupamento tiol, como a tiocolina. Dessa forma, o tiol da tiocolina consegue clivar a ligação dissulfeto do DTNB, gerando TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) ligado à tiocolina (Figura 6), e este produto pode ser medido por absorvância a 412 nm, onde possui um coeficiente de extinção molar de $14.150 \text{ (mol L}^{-1}\text{)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ELLMAN et al, 1961; RIENER; KADA; GRUBER, 2002).

Figura 6 – Esquema da reação com ATCh com DTNB



O DTNB é uma molécula com uma ligação dissulfeto capaz de reagir com grupamentos tíóis, gerando um produto que é capaz de absorver luz ultravioleta na faixa de 412 nm. (Fonte: Pohanka et al., 2011, p. 2637).

4.2 Calorimetria de titulação isotérmica

A calorimetria é uma das técnicas laboratoriais mais antigas ainda em vigor, e surgiu juntamente com a própria termodinâmica. Lavoisier, em 1783, apresenta o início da teoria da termodinâmica e de calor no seu livro *Memoire sur la Chaleur*, e foi o pesquisador que desenvolveu o primeiro calorímetro de gelo, utilizado para demonstrar a quantidade de

energia liberada na forma de calor proveniente do metabolismo de um porquinho-da-índia (LAVOISIER; LAPLACE, 1783; FREYER; LEWIS, 2008).

O método calorimétrico pode ser feito sob, pelo menos, três condições: por variação de temperatura, isotérmica ou por fluxo de calor. O método utilizado nesse trabalho é o de titulação isotérmica, ITC, onde uma fonte de energia é acoplada à cela de reação ou de amostra e compensa qualquer variação de temperatura que possa haver durante um experimento. Há, juntamente à fonte de energia, um cooler para resfriar passivamente a cela, onde um controlador mantém a temperatura constante durante todo o processo. Quando uma reação química ou física qualquer ocorre dentro da cela de reação, há a liberação ou absorção de calor pelo sistema isolado adiabaticamente. Isso provoca uma queda (reação exotérmica) ou aumento (reação endotérmica) na quantidade de energia fornecida pelos dispositivos elétricos em contato com a cela. Essa diferença de energia, na forma de energia potencial elétrica, fornecida à cela de reação é medida em função da energia fornecida à cela de referência, contendo água, de modo que a diferença de temperatura entre as celas seja zero, i.e., o processo é isotérmico. O termograma gerado apresenta a diferença de calor trocado por tempo (em $\mu\text{cal s}^{-1}$) aplicado pelo controlador para que a temperatura seja constante (Figura 7) (GOULART, 2012; FREYER; LEWIS, 2008).

Figura 7 – Demonstração básica do funcionamento de um microcalorímetro isotérmico

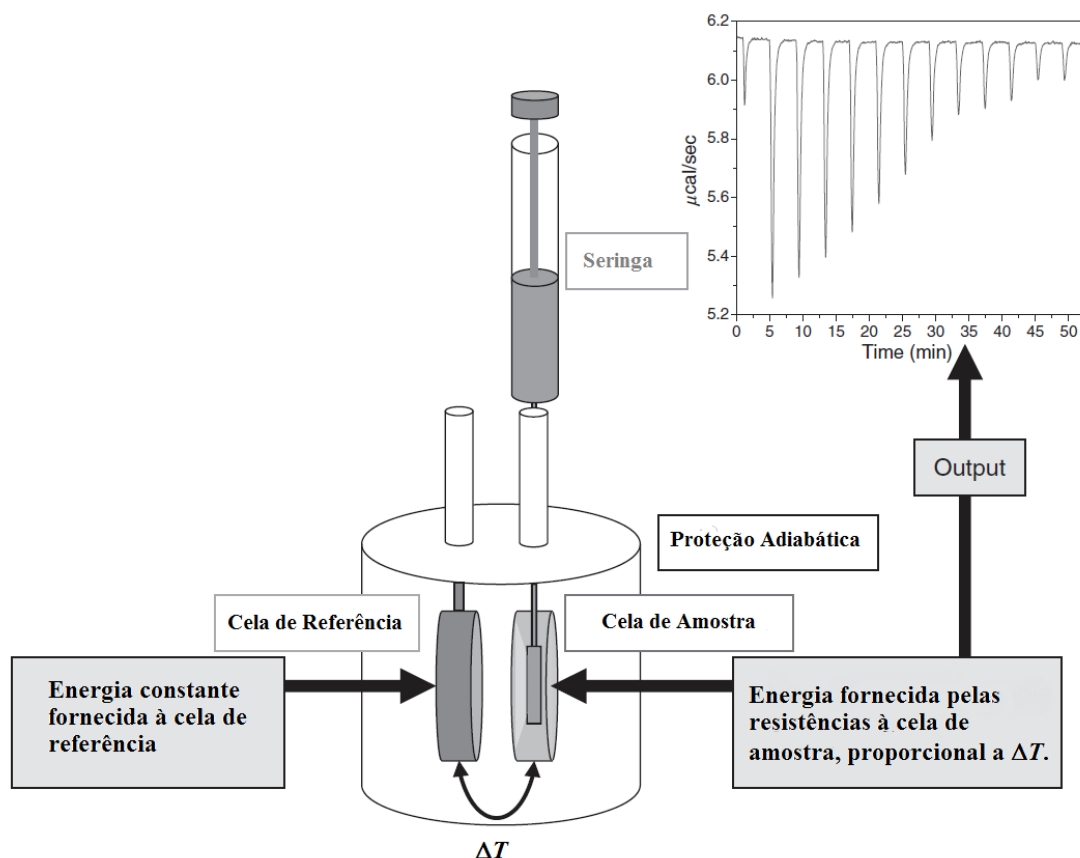


Diagrama representativo de um calorímetro isotérmico, ITC. Uma cela de amostra contém a reação a ser mensurada, que liberará ou absorverá calor, fornecida pelos dispositivos elétricos. A quantidade de calor fornecida é proporcional à diferença de temperatura entre a cela de amostra e a de referência. Essa diferença de energia fornecida ao sistema ao longo do tempo é registrada pelo computador. (Fonte: Modificado de Freyer e Lewis, 2008, p. 84).

4.2.1 Cinética enzimática em calorimetria

Uma cinética enzimática convencional requer a determinação de dois parâmetros fundamentais, K_m e k_{cat} . Várias são as maneiras para obter esses valores utilizando tanto a equação (24) quanto suas modificações, ao empregar métodos que precisam de várias reações em diferentes concentrações de substrato e usando reações acopladas, para conseguir visualizar a formação de produto. As técnicas mais comumente utilizadas são espectrofotométricas e potenciométricas. Acontece que alguns produtos não possuem propriedades que os caracterizem de alguma maneira por absorbância nem por medidas eletroquímicas. Como qualquer reação enzimática, na maioria dos casos, possuem alguma troca de calor, técnicas calorimétricas são muito úteis para mensurar a formação de produto por tempo e as suas taxas de formação (LADBURY e DOYLE, 2004; BIANCONI, 2007).

A técnica de ITC permite, entre outras coisas, calcular a constante de associação entre moléculas (FREYER & LEWIS, 2008), porém, essa técnica também permite a determinação de cinética enzimática por método direto do cálculo das taxas de formação do produto em função da concentração de substrato (FREYER & LEWIS, 2008). O princípio para obter esses parâmetros é relativamente simples, pois, como reações termodinamicamente favoráveis são guiadas pelo decréscimo de G quando se transforma em produto, o fator entálpico da reação (importante lembrar que isso a p constante) é observado como calor trocado pelo sistema. Assim, a troca de calor por tempo gerado na conversão de substrato em produto é proporcional à velocidade de conversão da enzima, logo:

$$P = \frac{dq}{dt} \quad (34)$$

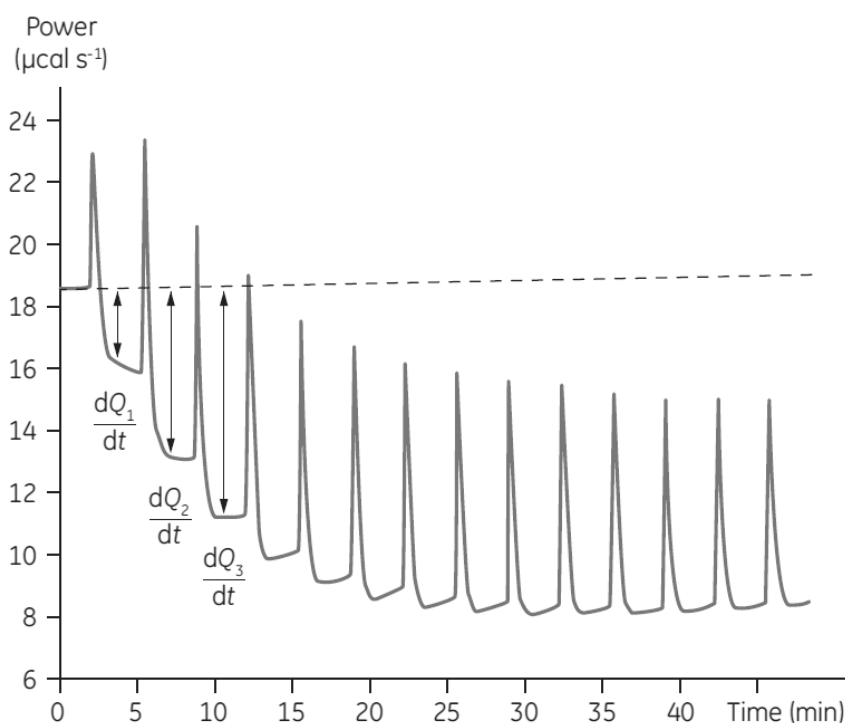
Onde P é a potência térmica, fornecida pelo aparelho no início do experimento às duas celas, na qual será baseada qualquer variação de energia fornecida pelo controlador de temperatura. Se $\Delta_r H^\ominus = q$, para certa quantidade de mols de produto gerado, ($n = [P] \times V$):

$$\frac{dq}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta_r H^{\ominus'} \quad (35)$$

Rearranjando a equação (35), pode-se verificar que a taxa da reação é proporcional à variação da energia fornecida pelo aparelho ao sistema, assim:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{\frac{dq}{dt}}{V \cdot \Delta_r H^{\ominus'}} \quad (36)$$

Essa equação pode ser mais bem visualizada pelo gráfico 3, onde é mostrada a variação da energia potencial térmica fornecida (P) para manter a temperatura constante após adição de substrato. No caso das equações (35) e (36), o que se mede não é $\Delta_r H^\ominus$ mas sim $\Delta_r H^{\ominus'}$, pois esse é o valor da entalpia da reação somado à entalpia de ionização.

Gráfico 3 – Mudança da energia fornecida ao sistema após adição de substrato

Representação esquemática da mudança de potência após sucessivas adições de substratos, em relação à linha base gerada antes das injeções. Observa-se que, imediatamente após a injeção, ocorre um fenômeno de diluição (os picos acentuados) e depois há uma manutenção do calor gerado pela reação por um tempo (paralelo à linha base), onde a enzima entra no estado estacionário (Fonte :*Calorimetry in fast Lane, GE spreadsheet*).

Após a injeção de substrato pela seringa, há uma distorção do calor fornecido causado pelo calor de diluição na cela de amostra, após isso, P retorna ao valor original. Se na cela de reação estiver a enzima, o substrato é convertido em produto, calor é liberado pela reação, e o evento de diluição é seguido por uma modificação na potência térmica fornecida, que se mantém constante pelo período anterior à injeção seguinte (TODD; GOMEZ, 2001; LADBURY; DOYLE, 2004; BIANCONI, 2007; FREYER; LEWIS, 2008; GOULART, 2012). Isso se deve à enzima alcançar o estado estacionário nos tempos iniciais, desse modo, a velocidade da reação se mantém constante e paralela à linha base, e isso é observado pelo fato de P não se modificar por certo tempo, até que ocorra a adição de mais substrato.

Uma deflexão negativa em P , (Gráfico 3), demonstra uma reação exotérmica, pois há uma diminuição de energia térmica fornecida ao sistema na cela de amostra. Pode-se observar que o evento de diluição é endotérmico, no caso mostrado, pois os picos são deflexões positivas de P (TODD; GOMEZ, 2001).

Como nos pressupostos da seção 3.2.2, a $[S]$ deve ser muito maior que $[E]$ nesse tipo de ensaio, de modo que a conversão realizada pela enzima não altera, de modo significativo, a $[S]$, assim, $[P]$ gerado é muito pequena. Desse modo, consegue-se que, após um pequeno intervalo entre uma injeção e outra, produto consiga se acumular ao longo do tempo e, quando as taxas de conversão para cada ponto são postas em função da concentração de substrato em cada injeção, é possível ajustar essa curva para a equação de Michaelis-Menten (TODD; GOMEZ, 2001).

Como visto nas equações (35) e (36), é necessário, nesse ensaio, saber qual é o valor de $\Delta_r H^{\ominus'}$ da reação enzimática. E isso pode ser determinado por um ensaio único, onde uma concentração maior de substrato é adicionado a uma concentração menor de enzima, esse fato pode ser utilizado para se calcular a cinética de outro modo, não citado na literatura, através da rQSSA, comentado na seção 3.2.6.

Para calcular $\Delta_r H^{\ominus'}$, usa-se o conhecimento que a área descrita pela curva de potência térmica fornecida, quando esse retorna à linha base após consumir todo o substrato, é igual ao calor total da reação:

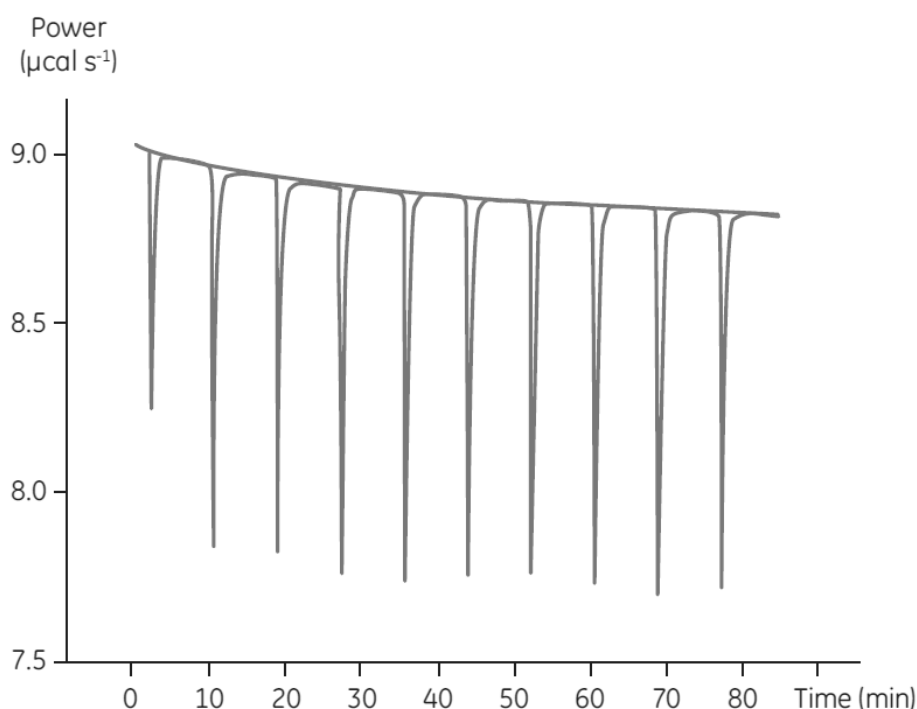
$$\Delta_r H^{\ominus'} = \frac{1}{V \cdot [S]_{total}} \cdot \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dq_t}{dt} \quad (37)$$

A área descrita pela curva deve ser ajustada para se eliminar o calor de diluição e o $\Delta_i H^{\ominus}$ (entalpia de ionização) resultante é obtido após correção (Gráfico 4), pois ele está, na verdade, em uma somatória de todos os calores trocados na reação, e isso incluem calor de ligação, dissociação, rearranjo conformacional e ionização, caso os produtos gerados possuam algum grupo ionizável.

Para uma boa aproximação, a ligação e dissociação do substrato à enzima são iguais com sinais opostos, e, como a enzima age em ciclo, o rearranjo conformacional também é anulado. No entanto, isso só pode ser aceito porque esses valores são muito baixos, pois em uma cinética enzimática a $[E]$ é muito pequena, e nos ensaios de *binding* realizados com o mesmo equipamento, as concentrações de proteína são algumas ordens de vezes maiores (ANDÚJAR-SÁNCHEZ; JARA-PÉREZ; CÁMARA-ARTIGAS, 2007; LADBURY; DOYLE, 2004). Ao contrário disso, o calor de ionização não é algo desprezível, e deve, sim, ser obtido de alguma outra maneira. A mais comumente utilizada, é realizar um ensaio com os produtos gerados, em separado, e titulá-los em concentrações conhecidas e de maneira a

dissociar quando titulados (TODD; GOMEZ, 2001; GOLDBERG; KISHORE; LENNEN, 2002; LADBURY; DOYLE, 2004; BIANCONI, 2007).

Gráfico 4 – Obtenção do valor de $\Delta_r H^\ominus$



A área formada pela curva de P é a quantidade de calor total trocada na reação enzimática, cada pico representa a adição de substrato até seu completo consumo (Fonte: *Calorimetry in fast Lane, GE spreadsheet*).

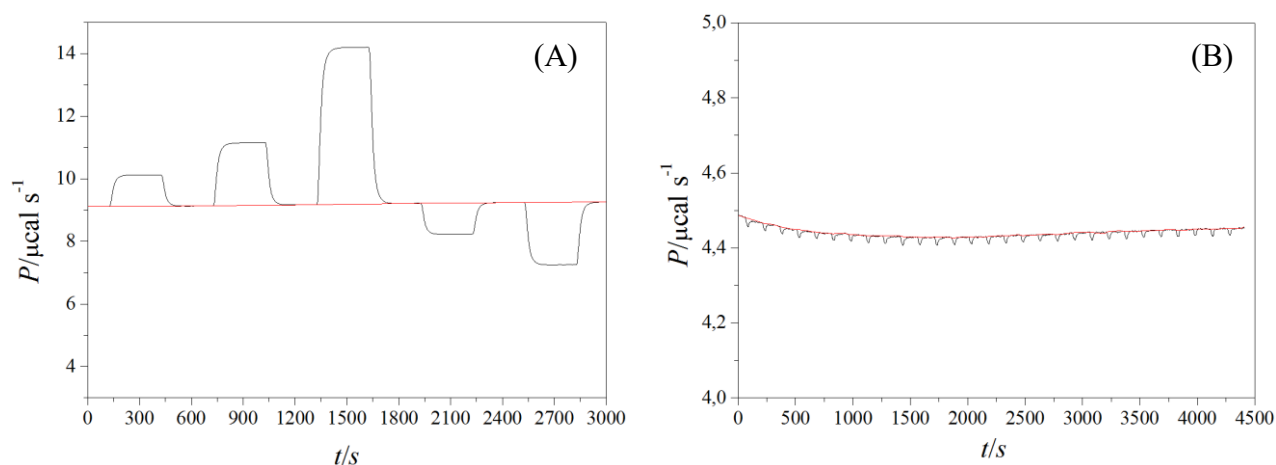
4.3 Materiais

A enzima alvo do estudo é a acetilcolinesterase, AChE (EC. 3.1.1.7), extraída de peixe-elétrico (*Electrophorus electricus*), liofilizada, da Sigma-Aldrich® (nº de catálogo C2888). A concentração da solução estoque de enzima foi determinada por absorvância em 280 nm, e obteve-se o valor de $[E] = 3,0 \mu\text{mol L}^{-1} (\pm 0,50)$. A concentração de uso, $30,0 \text{ pmol L}^{-1}$, igual para todos os experimentos, foi obtida por diluição a partir desse estoque. Todos os ensaios foram realizados em solução tampão de tris-HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, com a força iônica de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, com a adição de NaCl e MgCl_2 , este último em concentração final de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Em todos os ensaios, o tampão com a enzima continha $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de albumina bovina ultrapura (sigma-Aldrich A9418). Os experimentos foram executados em pH 7,4, inclusive os que foram realizados em temperaturas diferentes de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (310,15 K).

Os substratos da enzima utilizados foram o cloreto de acetilcolina (A6625) e o cloreto de acetiltiocolina (A5626), ambos obtidos da Sigma-Aldrich®. Os substratos foram acondicionados e diluídos nas concentrações para uso em tampão tris-HCl 0,05 mol L⁻¹. O inibidor da AChE utilizado foi o carbaryl padrão analítico (Sevin® Brand 99,6%), armazenado na concentração de 10 mol L⁻¹ para estoque em solução de metanol 12,38 mol L⁻¹ em água deionizada. As soluções com as concentrações de uso foram feitas de modo que o total de metanol presente fosse de 100 μmol L⁻¹, e todos os ensaios padrões foram feitos com a presença de metanol com o intuito que a concentração do álcool fosse semelhante em todos os ensaios.

Os ensaios foram realizados no microcalorímetro de titulação isotérmica VP-ITC da MicroCal® GE®. Todos os experimentos foram realizados a 310,5 K, exceto os quais a temperatura precisava variar. A medida da calibração do aparelho foi realizada pelo autor e pela equipe do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, do ICB/UFMG. Para tanto, as metodologias padrões foram empregadas, entre elas a medida do erro do eixo-y e a variação da linha base em experimento água-água (Gráfico 5) e retorno de valores de entalpia de diluição aparente, $\Delta_{dil}H^{\ominus}$, bem conhecidos na literatura (Tabela 1). Todos os procedimentos são descritos no manual do próprio equipamento fornecido pela GE® e os valores padrões descritos na literatura (WADSÖ; GOLDBERG, 2001).

Gráfico 5 – Resultados obtidos dos testes de calibração do eixo-y e de diluição de água em água



Gráficos com os dados dos testes de calibração, em (A) os dados obtidos de pulsos de diferentes valores de P dados em tempos iguais, a fim de se obter os valores da energia potencial térmica fornecida pelo aparelho e a diferença da resposta obtida pelo mesmo. Em (B) o calor de diluição da água em água, para comprovar a repetição dos valores obtidos em cada injeção.

Tabela 1 – Alguns dados obtidos dos ensaios de teste de calibração, relativos à titulação de propan-1-ol em água, testado em um microcalorímetro de titulação isotérmica

$\Delta_{dil}H^{\ominus'}/ \text{kJ mol}^{-1}$ – Tabelado*	$\Delta_{dil}H^{\ominus'}/ \text{kJ mol}^{-1}$ – Experimental
-171,20	-169,94
-168,95	-169,12
-167,10	-167,67
-164,89	-165,58
-162,59	-163,14

* (WADSÖ; GOLDBERG, 2001), Dados obtidos com o ensaio de $\Delta_{dil}H^{\ominus'}$ em $T = 298,15 \text{ K}$, em sucessivas injeções de volumes iguais

Os erros apresentados pelo experimento da calibração do eixo-y mostram-se menores que 0,4%, em média, para os picos, e são aceitáveis erros menores que 1% de acordo com o manual do equipamento (MICROCAL). Os erros para o experimento de diluição de água em água servem para demonstrar a utilidade e limpeza da cela de reação, vista pela semelhança entre os picos de diluição exotérmicos. O teste de propanol tem o propósito de mostrar o retorno de valores experimentais de uma reação padronizada, e sua linearidade em função da diluição. O coeficiente de correlação dos valores obtidos foi de 0,9977 e o R^2 0,9953, sendo o aparelho considerado em excelentes condições de uso.

Os dados de calorimetria deste e dos experimentos adiante foram analisados, primeiramente no Origin[®] 9.0, depois em gráficos gerados no SigmaPlot[®] 11.0 e GraphPad Prism[®] 6.01 e ainda no Microsoft[®] Office Excel 2013.

Os experimentos foram feitos em triplicata ou duplicata, com exceção dos testes padrões utilizando apenas enzima, onde um número maior de ensaios foi realizado. Para cada resultado, uma análise estatística com pesos foi utilizada, levando em consideração os erros associados a cada uma das variáveis. O teste- F com algoritmo de Akaike (AIC) foi utilizado para verificar a semelhança entre as regressões que foram analisadas em conjunto. Regressões lineares tiveram o peso $1/y^2$ ou $1/x^2$ ajustados para cada análise. Os dados são expressos em média (\pm desvio padrão).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação dos parâmetros cinéticos de hidrólise dos substratos pela acetilcolinesterase

Como foram utilizados dois substratos para estudo da cinética catalisada pela acetilcolinesterase, os resultados são apresentados em pares, onde há uma comparação dos dados obtidos para a acetilcolina e para a acetiltiocolina. Os parâmetros de ativação puderam ser obtidos para ambos os substratos, assim como os cinéticos. Desse modo, pôde-se comparar a hidrólise de ACh executada pela AChE com a hidrólise de ATCh pela mesma enzima, com o objetivo de visualizar a proximidade ou não dos fatores obtidos.

5.1.1 Ensaios para determinação das entalpias das reações

A literatura mostra o valor da variação de entalpia padrão da reação, $\Delta_r H^\ominus$ da hidrólise de ACh em vários tampões e tipos diferentes de enzima, onde, para AChE de peixe-elétrico em tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ e pH 8,0, o valor encontrado foi entre -33,4 e -26,7 kJ mol⁻¹ (DAS; BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985). Como os parâmetros de ensaio são significativamente distintos dos apresentados na literatura, ensaios para determinar $\Delta_r H^\ominus$ foram necessários.

O ensaio para determinar $\Delta_r H^\ominus$ da acetilcolina foi realizado com uma $[S] = 4,0$ mmol L⁻¹ e o Nota-se um valor alto para a ionização do tris nessas condições experimentais. Em experimentos calorimétricos com uso de outros tampões e enzimas, ensaios apresentam valores de $\Delta_i H^\ominus$ menores, e, teoricamente, o mesmo aconteceria se esse mesmo experimento fosse realizado em outro tampão, tal como o fosfato (DAS, BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985; TODD; GOMEZ, 2001). Na situação onde um tampão com menor calor de ionização fosse utilizado, o valor de $\Delta_r H^\ominus$ seria menor, porém os valores da variação da potência térmica também seriam, e os dados cinéticos obtidos pela técnica permaneceriam iguais aos obtidos neste trabalho.

Gráfico 6A mostra que $\Delta_r H^\ominus = -29,76 \pm 2,19$ kJ mol⁻¹. Faz-se importante ressaltar que o valor da variação de entalpia de ionização, $\Delta_i H^\ominus$, para o tampão tris é maior que outros tampões comumente usados, como o tampão fosfato (GOLDBERG; KISHORE; LENNEN, 2002).

O valor de $\Delta_i H^\ominus$ foi adquirido com dados disponíveis na literatura e por ensaios de titulação, (DAS; BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985; FUKADA; TAKAHASHI, 1998; GOLDBERG; KISHORE; LENNEN, 2002), onde o calor total obtido da titulação de ácido etanoico no tampão de uso foi analisado em função da quantidade de prótons absorvido ou liberado pelo tampão na temperatura de estudo (TODD; GOMEZ, 2001; BIANCONI, 2007; HAYNES, 2012-2013). Assim, a entalpia aparente da reação, $\Delta_r H^\ominus$, é uma somatória da entalpia da reação e da entalpia de ionização para um determinado número de mols, n :

$$\Delta_r H^\ominus = \Delta_r H^\ominus + n\Delta_i H^\ominus \quad (38)$$

Com isso, o valor de $\Delta_i H^\ominus = -12,00 (\pm 0,66)$ kJ mol⁻¹ (Nota-se um valor alto para a ionização do tris nessas condições experimentais. Em experimentos calorimétricos com uso de outros tampões e enzimas, ensaios apresentam valores de $\Delta_i H^\ominus$ menores, e, teoricamente, o mesmo aconteceria se esse mesmo experimento fosse realizado em outro tampão, tal como o fosfato (DAS, BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985; TODD; GOMEZ, 2001). Na situação onde um tampão com menor calor de ionização fosse utilizado, o valor de $\Delta_r H^\ominus$ seria menor, porém os valores da variação da potência térmica também seriam, e os dados cinéticos obtidos pela técnica permaneceriam iguais aos obtidos neste trabalho.

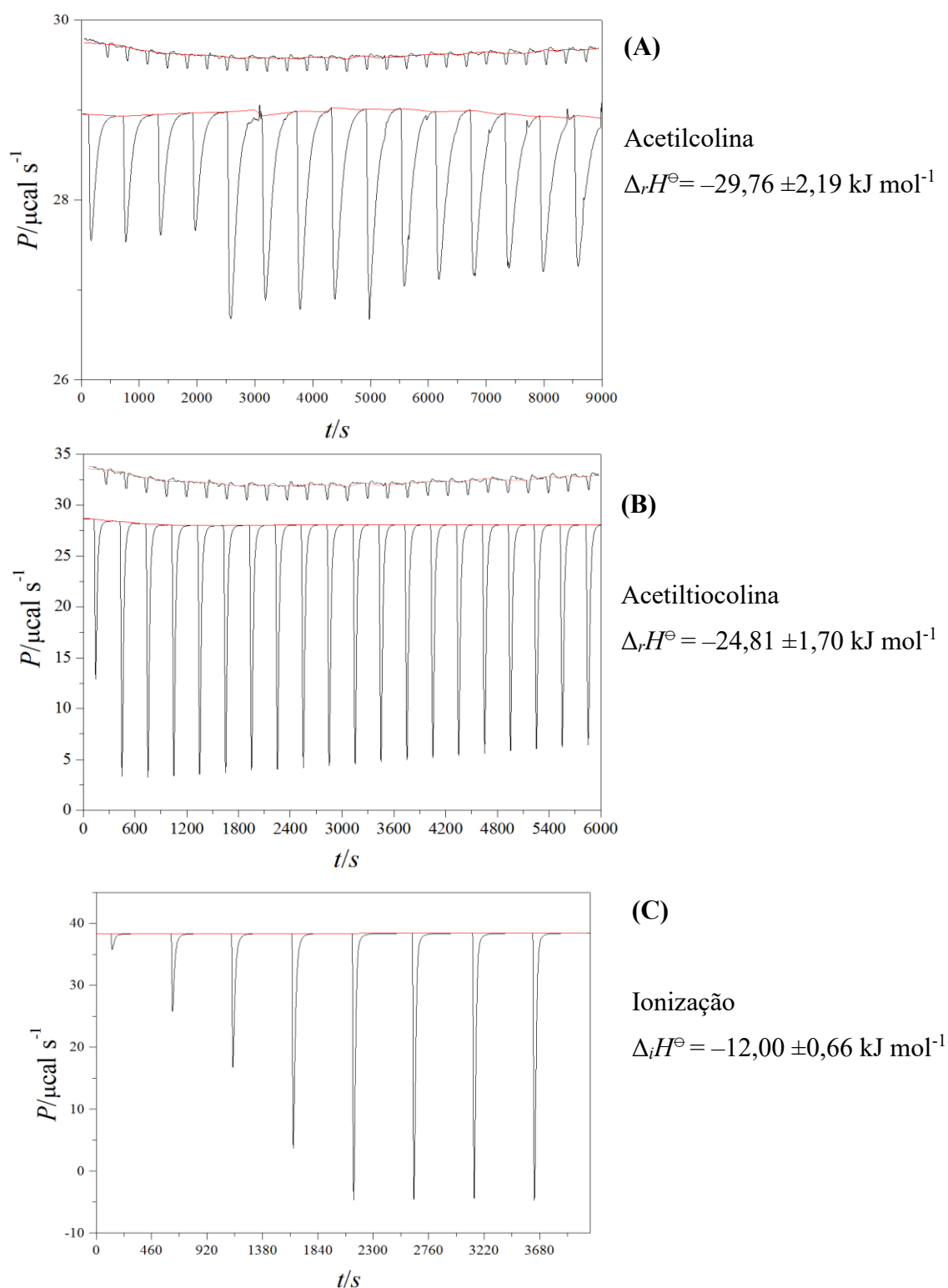
Gráfico 6C).

Resultados semelhantes foram obtidos para a hidrólise de acetilcolina, ACh, no mesmo tampão, a $[S]$ era de 40,0 mmol L⁻¹. O valor de $\Delta_r H^\ominus = -24,81 \pm 1,70$ kJ mol⁻¹ obtido foi pouco menor que comparado com o valor de ACh (Nota-se um valor alto para a ionização do tris nessas condições experimentais. Em experimentos calorimétricos com uso de outros tampões e enzimas, ensaios apresentam valores de $\Delta_i H^\ominus$ menores, e, teoricamente, o mesmo aconteceria se esse mesmo experimento fosse realizado em outro tampão, tal como o fosfato (DAS, BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985; TODD; GOMEZ, 2001). Na situação onde um tampão com menor calor de ionização fosse utilizado, o valor de $\Delta_r H^\ominus$ seria menor, porém os valores da variação da potência térmica também seriam, e os dados cinéticos obtidos pela técnica permaneceriam iguais aos obtidos neste trabalho.

Gráfico 6B). Como a variação de entalpia padrão de formação de tióis é menos exotérmica que a formação de álcoois, sendo até mesmo, em alguns casos, endotérmica, não é difícil perceber que a formação de tiocolina da hidrólise de ACh seria mesmo pouco menor que o $\Delta_r H^\ominus$ de ACh (SANDERSON, 1982; BERKOWITZ; ELLISON; GUTMAN, 1994; GRANT; DIXON, 2009).

Nota-se um valor alto para a ionização do tris nessas condições experimentais. Em experimentos calorimétricos com uso de outros tampões e enzimas, ensaios apresentam valores de $\Delta_i H^{\ominus}$ menores, e, teoricamente, o mesmo aconteceria se esse mesmo experimento fosse realizado em outro tampão, tal como o fosfato (DAS, BROWN; CHATTOPADHYAY, 1985; TODD; GOMEZ, 2001). Na situação onde um tampão com menor calor de ionização fosse utilizado, o valor de $\Delta_r H^{\ominus}$ seria menor, porém os valores da variação da potência térmica também seriam, e os dados cinéticos obtidos pela técnica permaneceriam iguais aos obtidos neste trabalho.

Gráfico 6 – Hidrólise da acetilcolina e acetiltiocolina, com o resultado das $\Delta_r H^\ominus$ na temperatura de 310,15 K e determinação do calor de ionização do ácido etanoico nas mesmas condições experimentais



Ensaio microcalorimétrico da entalpia total, onde o substrato foi totalmente consumido antes da injeção de substrato seguinte. Em (A), é mostrado a hidrólise total de ACh com diferentes injeções sequenciais e, na mesma escala, o experimento controle na parte superior do gráfico, com a adição de substrato sem enzima (calor de diluição). Em (B), a hidrólise completa de ATCh e seu experimento controle na parte superior. Em (C) o ensaio de calor de ionização do ácido etanoico, onde os picos têm volumes injetados distintos.

5.1.2 Determinação dos parâmetros termodinâmicos da reação de hidrólise da acetilcolina gerando seus produtos, ácido etanoico e colina

Em estudo anterior, foi determinada a constante de equilíbrio aparente, K_{eq} , da hidrólise da acetilcolina, ACh, em condições fisiológicas (PIEKLIK e GUYNN, 1975), com isso é possível descobrir qual o valor da variação da energia de Gibbs padrão da reação, $\Delta_r G^\ominus$, de catálise da acetilcolina pela AChE nos parâmetros escolhidos para esse trabalho. As condições que foram utilizadas para se determinar K_{eq} no trabalho de Pieklik e Guynn (1975) foram a 311,15 K, pH 7,2 e força iônica $I = 0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Para obter tal parâmetro, utiliza-se a relação entre $\Delta_r G^\ominus$ e K_{eq} de acordo com a equação (9). Assim, o K_{eq} obtido da ACh foi de $8,21 \times 10^4$, o que torna possível calcular o valor de $\Delta_r G^\ominus$, e o resultado foi $-29,26 \text{ kJ mol}^{-1}$. Isso está de acordo com dados obtidos para a hidrólise de outros ésteres (MAVROVOUNIOTIS, 1991).

Para se calcular as constantes de $\Delta_r G^\ominus$ e $\Delta_r S^\ominus$ em outras temperaturas, a equação de Gibbs-Helmholtz (10) foi utilizada, partindo do conhecimento de entalpia obtido nos ensaios anteriores. Com esses dados, é possível calcular os valores de $\Delta_r G^\ominus$ para as várias temperaturas utilizadas nesse trabalho (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.**).

Tabela 2 – Valores de $\Delta_r G^\ominus$ para as várias temperaturas calculados pela equação de Gibbs-Helmholtz

T	309,15	309,65	310,15	310,65	311,15
$\Delta_r G^\ominus/\text{kJ mol}^{-1}$	-29,41	-29,37	-29,33	-29,29	-29,26
$\Delta_r H^\ominus/\text{kJ mol}^{-1}$	-29,76 ($\pm 2,19$)				
$T\Delta_r S^\ominus/\text{kJ mol}^{-1}$	-0,49	-0,49	-0,49	-0,49	-0,50

Dados obtidos com o ensaio de $\Delta_r H^\ominus$ em $T = 310,15 \text{ K}$

Como não foi encontrada uma constante de equilíbrio ou o valor de $\Delta_r G^\ominus$ para a acetiltiocolina, pelo menos em condições satisfatoriamente parecidas, não foi possível, pelo menos nesse momento, obter esses parâmetros para tal substrato. Serão necessários experimentos para obter esse valor, não só para ATCh, como também para ACh, uma vez que os valores obtidos nessa análise foram originalmente obtidos em outro trabalho (PIEKLIK; GUYNN, 1975).

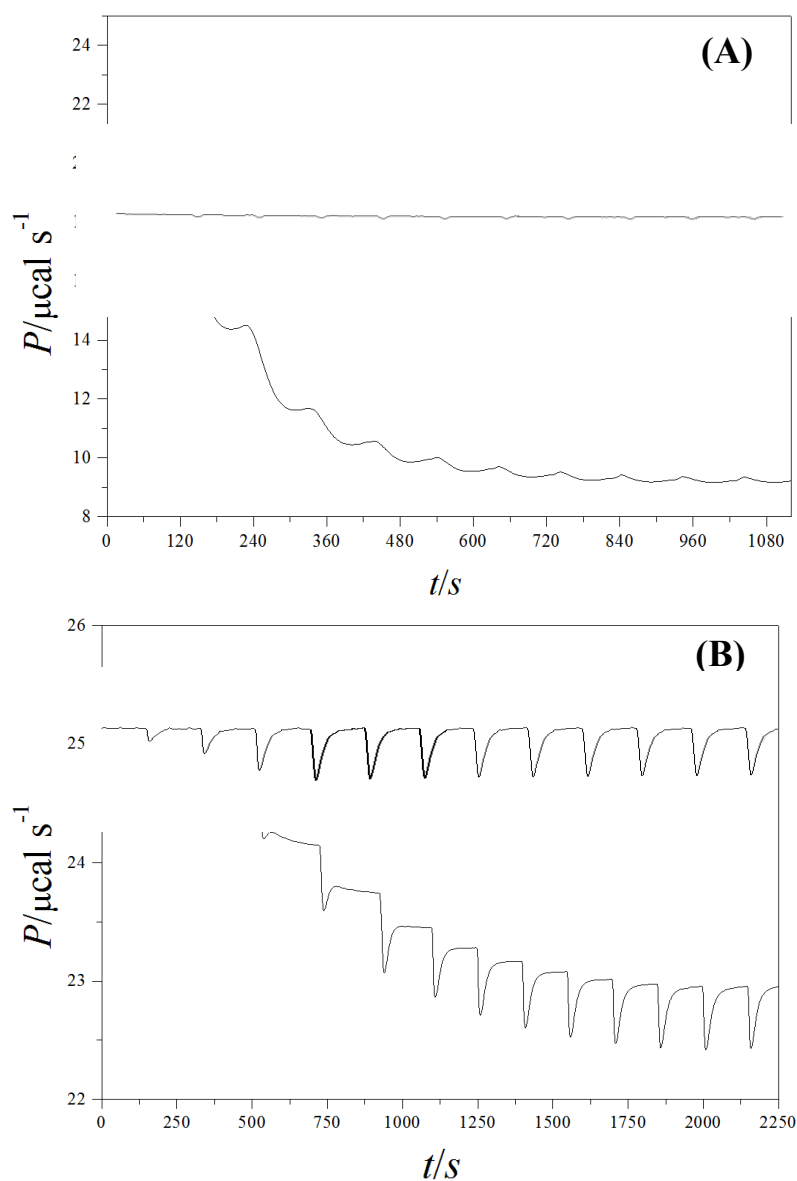
5.1.3 *Determinação das constantes cinéticas da catálise enzimática*

Os valores das constantes cinéticas variam, e muito, na literatura, apenas um fator parece concordar entre as publicações, a AChE é uma das enzimas com maior velocidade de catálise que existe. O fato de esses parâmetros variarem se deve às condições experimentais distintas entre cada um dos grupos de pesquisa (WILSON; HARRISON, 1961; O'BRIEN; HILTON; GILMOUR, 1966; LINDGREN et al, 1985; QUINN, 1987; KOMERS; ČEGAN; LINK, 2002; COHEN et al, 2006; POHANKA et al, 2011).

Uma observação pertinente a este trabalho é a limitação de parâmetros experimentais diversificados, proporcionando a visão de apenas uma face termodinâmica desse fascinante processo. Assim, em acordo com os objetivos, uma comparação deve ser mostrada entre a cinética observada da acetilcolina e o substrato sintético mais comumente utilizado no meio científico, a acetiltiocolina.

Assim, obtido uma curva de cinética em calorimetria (Gráfico 7), os passos a serem dados incluem determinar o deslocamento da linha de potência térmica fornecida, P , após cada injeção, que será proporcional à velocidade da reação, e a concentração de substrato em cada injeção. Um fato observado e que entra em acordo com os parâmetros descritos em 3.2.2, é a pouca mudança da concentração de substrato acumulado após cada injeção. A cada injeção, mais substrato é adicionado à cela de reação e este vai se acumulando ao longo do tempo, e isso só é possível porque a quantidade de produto formado por tempo é muito menor que a concentração de substrato em qualquer momento do ensaio, um dos pressupostos essenciais de sQSSA. Nos ensaios após a padronização das injeções e com a adição de metanol, o calor de diluição torna-se maior, porém, com o efeito da padronização, o efeito visualizado do estado estacionário é mais bem definido (150 s entre as injeções, em volumes crescente de 1, 2, 4, 6 e, no restante, 8 μL).

Gráfico 7 – Medidas realizadas em calorimetria, antes e depois da adição de metanol à reação e de sua padronização



Os gráficos mostram os resultados brutos obtidos em análise em microcalorimetria de titulação isotérmica, antes (A) e depois (B) da padronização das injeções. Observa-se um aumento no calor de diluição, mas uma melhor visualização da queda de P e o estado estacionário da enzima. Em cada gráfico é mostrado a linha base, contínua à região de platô pré-injeção, onde em (A), a entalpia de diluição é mínima, e o mesmo não se pode dizer em (B) caracterizado pelos pico de inflexão negativa da potência térmica fornecida devido a diluição do metanol no tampão.

Como proposto pelos autores Todd e Gómez (2001) e definido na seção 4.2.1, a variação da potência térmica, P , fornecida pelo controlador de temperatura varia proporcionalmente à velocidade da reação. Para se confirmar essa afirmação, uma análise comparativa entre o método proposto e um alternativo foi realizada. No método alternativo, como em cada momento após as injeções a enzima entra no estado estacionário (observado pela variação contínua de calor por tempo), é possível calcular a quantidade de produto

formado nesses períodos de tempo e a resultante do acúmulo deste, sabendo a entalpia de formação dos produtos. Assim, como a reação ocorre em períodos curtos, é possível saber as velocidades iniciais para cada $[S]$, do mesmo modo que um ensaio comumente realizado por outras técnicas, como a espectrofotométrica. Por esse caminho, é necessário determinar a área dada pelas curvas a cada ponto medido pelo aparelho, depois converter isso em quantidade de produto e acertar para o volume após cada injeção. Isso demanda mais cálculos maçantes, mas importantes para averiguar se o método é realmente válido para as condições testadas.

Os resultados de algumas das análises feitas comparando-se o método descrito por Todd e Gomez (2001) com o alternativo, utilizando ACh mostram valores semelhantes (Tabela 3) para ambos, demonstrando, mais uma vez, a robustez do método descrito na literatura.

Tabela 3 – Dados referentes a diferentes metodologias para obtenção dos resultados em uma cinética em calorimetria com o substrato ACh, comparando um método descrito com um alternativo

Ensaio	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$		$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$	
	<i>Método 1*</i>	<i>Método 2</i>	<i>Método 1*</i>	<i>Método 2</i>
$T\ 309,65\ \text{K}$	17,53	17,92	218,1	231,6
$T\ 310,15\ \text{K}$	19,59	19,92	191,2	208,1
$T\ 311,15\ \text{K}$	23,82	23,53	219,2	253,1
25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de carbaryl	21,66	21,10	428,4	445,6

*Dados referentes aos descritos na metodologia de Todd e Gómez (2001).

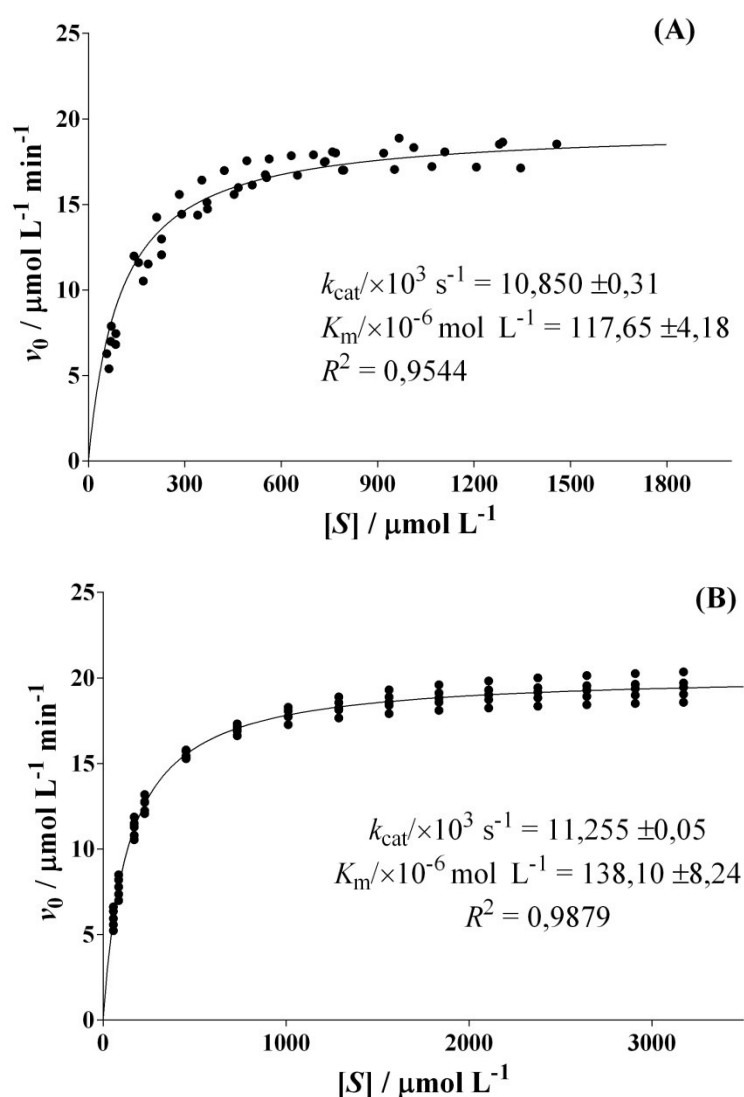
Como ambas as análises retornaram resultados semelhantes, ou bem próximos (erros percentuais menores que 2% para V_{\max} e 10% para K_m), o método de Todd e Gomes (2001) foi preferido por ser mais simples de ser trabalhado. Porém, para as análises com a integral de Michaelis-Menten, foi necessário utilizar os dados obtidos pela metodologia alternativa.

Como mostrado na seção 0, alguns métodos de regressão foram escolhidos pela praticidade e frequência com que são utilizados para analisar os parâmetros cinéticos nas condições já explicitadas.

Os resultados obtidos nos experimentos de calorimetria foram ajustados, em primeiro momento, à equação (24) por regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados, fornecidos pelos programas GraphPad Prism[®] 6.01 e Sigma Plot[®] 11.0. Ambos os programas

retornaram valores idênticos. O Gráfico 8, mostra os valores de dispersão de vários experimentos calorimétricos, a 310,15 K, sem o uso de inibidor, antes e depois da padronização do método de injeção. Com injeções contendo a mesma concentração de substrato, adicionando volumes iguais e em tempos semelhantes, é possível realizar uma caracterização melhor dos dados disponíveis.

Gráfico 8 – Análise de regressão não-linear dos dados brutos obtidos de 4 ensaios de ITC com ACh sem inibidor a 310,15 K antes e depois da padronização do método de injeção



Os gráficos mostram os resultados das velocidades em função da concentração de substrato da AChE com ACh, de experimentos distintos onde, em (A), estão experimentos onde a concentração de substrato na agulha injetora difere de um experimento para outro, todos os valores foram ajustados para as concentrações efetivas de cada ensaio. Em (B), as concentrações e todo protocolo experimental é delineado para que, em todos os ensaios, as concentrações injetadas sejam de igual valor, a $[S]$ inicial na agulha sempre é de 20 mmol L⁻¹. O ajuste apresenta um coeficiente de determinação (R^2) relativamente alto para ambos, mas um pouco melhor para os ensaios delineados. Os parâmetros obtidos em (B) foram utilizados como valores iniciais em outras análises à frente.

5.1.3.1 Cálculo de $\Delta^\ddagger G^\ominus$, $\Delta^\ddagger H^\ominus$, $\Delta^\ddagger S^\ominus$ por obtenção de k_{cat} em diferentes temperaturas

Com o método já padronizado, foi possível executar o experimento de cinética em outras temperaturas, sob as mesmas condições. Com isso, é possível observar um aumento razoável do valor de k_{cat} com o incremento da temperatura (Gráfico 9).

Os valores termodinâmicos de ativação podem ser calculados com base nas equações de Arrhenius e Eyring, como já descrito na seção 3.1.2. A análise linear dos mínimos quadrados foi obtida com peso de ajuste $1/y^2$, para diminuir a soma dos quadrados dos erros, uma vez que os eixos- y , $\ln(k_{\text{cat}})$ e $\ln(k_{\text{cat}} T^{-1})$, carregam maior erro experimental que o eixo- x , T^{-1} .

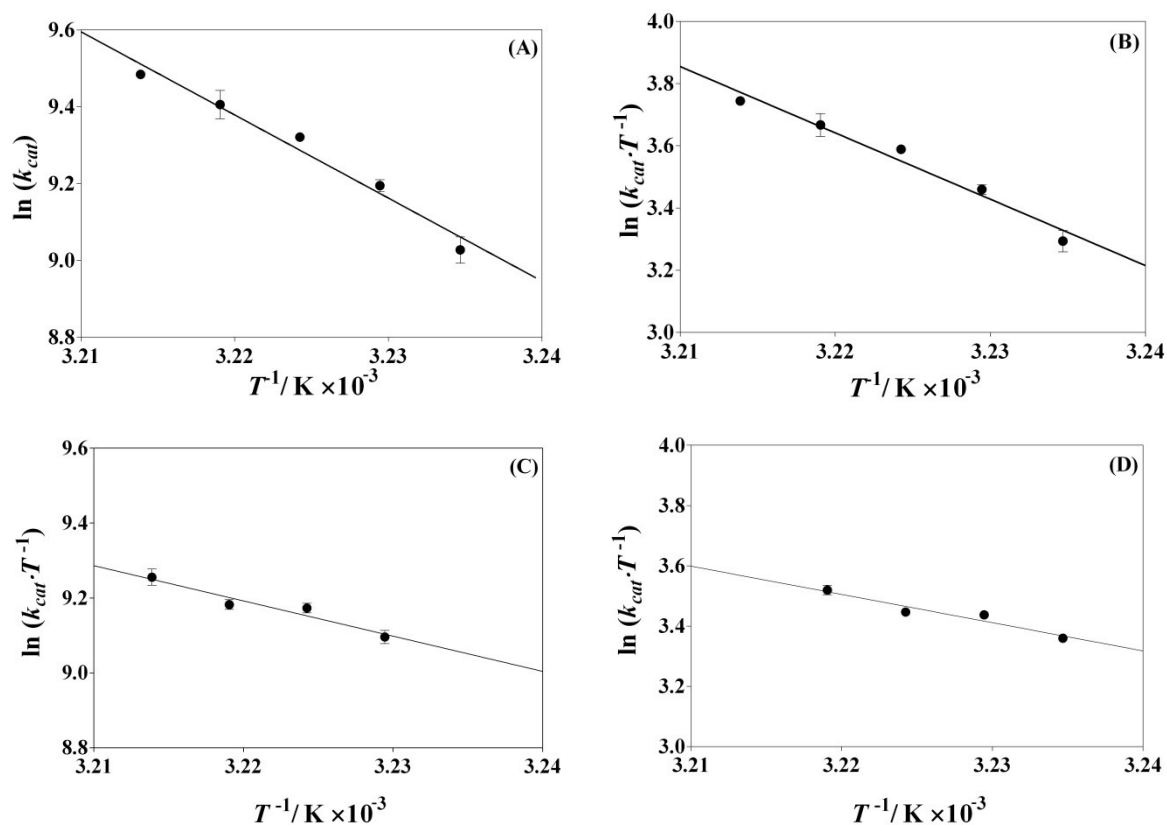
Como os valores obtidos por ambas as análises apresentaram os mesmos valores, distinguindo entre uma e outra por $0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, já dentro do erro de cada ensaio, os dados mostrados são dos resultados obtidos pelo método de Arrhenius (Tabela 4).

A análise por Eyring torna os valores da variação da entalpia e entropia e energia de Gibbs padrões de ativação constantes, o que é uma aproximação válida dentro dos parâmetros geralmente adotados, sendo visível na pequena variação destes nos resultados obtidos.

Ademais, os erros encontrados ao ajuste com Arrhenius são efetivamente menores que os encontrados com Eyring, em comparação, a variação da energia de Gibbs padrão de ativação, $\Delta^\ddagger G^\ominus$, a $310,15 \text{ K}$ da ACh obtido pelo método de Arrhenius foi o valor de $52,02 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0,56$, e por Eyring, o valor obtido foi $51,75 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 1,98$.

Convém notar que as análises lineares tanto de Arrhenius quanto de Eyring, possuem poucos pontos e estes são próximos um dos outros, ainda que os dados apresentem elevada taxa de correlação, tanto para Arrhenius ($\rho = -0,985$ para ACh e $\rho = -0,965$ para ATCh) quanto para Eyring ($\rho = -0,985$ para ACh e $\rho = -0,965$ para ATCh). Deve-se ter em mente que isso é apenas um indício de causalidade, uma vez que análises com maior espectro de temperatura são necessárias.

Gráfico 9 – Constantes catalíticas, k_{cat} , obtidas em diferentes temperaturas, através de análise não-linear, e dados termodinâmicos de ativação obtidos por análises lineares de Arrhenius e Eyring utilizando o substrato ACh e ATCh



Gráficos de regressão linear com os dados obtidos das cinéticas realizadas em cinco temperaturas para ACh e quatro para ATCh, observa-se que há uma atenuada diminuição do valor da constante com o decréscimo da temperatura. Os gráficos (A) e (B) são as regressões lineares para a ACh, onde Arrhenius (A) possui $\rho = -0,985$, e Eyring (B) com $\rho = -0,9848$, onde é possível determinar $\Delta^\ddagger H^\ominus$ no primeiro caso, ou $\Delta^\ddagger H^\ominus$ e $\Delta^\ddagger S^\ominus$ no segundo. Os gráficos (C) e (D) são para a ATCh, onde (C) é o ajuste para a equação de Arrhenius, com $\rho = -0,9654$ e (D) para a equação de Eyring, com $\rho = -0,9654$

Tabela 4 – Valores de k_{cat} e parâmetros termodinâmicos de ativação obtidos na cinética de catálise de acetilcolina em diferentes temperaturas

ACETILCOLINA				
T	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta^\ddagger G^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta^\ddagger H^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta^\ddagger S^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$
309,15	8.330,6 ($\pm 286,8$)	52,61 ($\pm 4,65$)	149,04 ($\pm 3,99$)	95,38 ($\pm 8,65$)
309,65	9.847,2 ($\pm 153,2$)	52,27 ($\pm 2,09$)	149,04 ($\pm 3,99$)	95,97 ($\pm 6,88$)
310,15	11.255,2 ($\pm 47,1$)	52,02 ($\pm 0,56$)	149,03 ($\pm 3,99$)	96,02 ($\pm 4,56$)
310,65	12.477,8 ($\pm 447,8$)	51,90 ($\pm 4,94$)	149,03 ($\pm 4,00$)	96,04 ($\pm 8,94$)
311,15	13.072,2 ($\pm 113,9$)	51,78 ($\pm 1,16$)	149,03 ($\pm 4,00$)	96,16 ($\pm 5,17$)
ACETILTIOCOLINA				
T	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta^\ddagger G^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta^\ddagger H^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta^\ddagger S^\ominus / \text{kJ mol}^{-1}$
309,65	8.917,4 ($\pm 155,0$)	52,61 ($\pm 2,36$)	75,65 ($\pm 3,90$)	23,03 ($\pm 6,26$)
310,15	9.633,8 ($\pm 125,9$)	52,41 ($\pm 1,77$)	75,65 ($\pm 3,91$)	23,23 ($\pm 5,67$)
310,65	9.724,3 ($\pm 123,8$)	52,54 ($\pm 1,73$)	75,64 ($\pm 3,91$)	23,09 ($\pm 5,64$)
311,15	10.461,2 ($\pm 227,8$)	52,50 ($\pm 2,96$)	75,64 ($\pm 3,92$)	23,14 ($\pm 6,87$)

Dados obtidos pela aproximação de Arrhenius.

Nota-se que, a despeito da proximidade entre os valores de T^{-1} , os dados obtidos neste trabalho apresentam valores da variação de entalpia padrão de ativação, $\Delta^\ddagger H^\ominus$, próximos de outros trabalhos com a mesma enzima, onde a faixa de temperatura foi mais abrangente. O valor da variação da entalpia de ativação padrão no trabalho de Wilson e Cabib (1956) foi entre 140-190 kJ mol^{-1} , porém, determinaram que a E_a se altera com a temperatura. Como mostrado, a entropia de ativação é alta, o que mostra uma elevada desorganização entre enzima e substrato no estado de transição, possível passo para a enzima aumentar a velocidade da reação (WILSON; CABIB, 1956). Porém, o fator entrópico também é muito alto, o que levaria, em um primeiro momento, a crer que a reação é muito lenta.

Pelos dados obtidos, os valores de $\Delta^\ddagger G^\ominus$ para ACh e ATCh são muito semelhantes para ambos ($p = 0,8426$), o que é válido, uma vez que os dois possuem uma semelhança estrutural muito grande, portanto, também teriam as mesmas etapas químicas para alcançarem o estado de transição. Porém, a substituição de um oxigênio por um enxofre na ATCh reflete

na diferença do fator entálpico de ativação de um substrato para outro ($p = 0,0001$), sendo $\Delta^\ddagger H^\ominus$ da ACh praticamente o dobro do observado para ATCh. Isso pode ser devido a uma maior especificidade da enzima pelo estado de transição com o substrato original do que pelo modificado. Embora o valor da entropia aumente em ambos os casos, comentários sobre essa variação devem ser cautelosos, pois, ainda que em uma catálise geral básica, como ocorrida na desacilação da enzima, possua um estado de transição com muita liberdade espacial, a variação da entropia no estado ativado depende não só dos fatores intrínsecos à reação, como também do ambiente em que essa se encontra (LOW; BADA; SOMERO, 1973). Os principais fatores que modificam uma reação química qualquer são força iônica do tampão, pH e temperatura, determinantes para modificação do perfil das interações inter- e intramoleculares, afetando, por exemplo, o pK_a de uma cadeia lateral de qualquer resíduo componente da enzima, o que pode alterar a catálise enzimática (FERSHT; 1977). Assim, com uma inferência rápida, pode-se concluir que a formação da acil-enzima permite ao substrato menor grau de liberdade de movimento, diminuindo sua entropia translacional e rotacional, mas a formação do grupo tetraédrico e o ataque nucleofílico da histidina levam a um aumento da desorganização do sistema. Essa somatória pode ser visualizada pelos valores de $\Delta^\ddagger S^\ominus$ e $\Delta^\ddagger H^\ominus$, ambos positivos. Esses dados são comparáveis com outros encontrados na literatura, mas em condições um pouco diferentes (WILSON; CABIB, 1956).

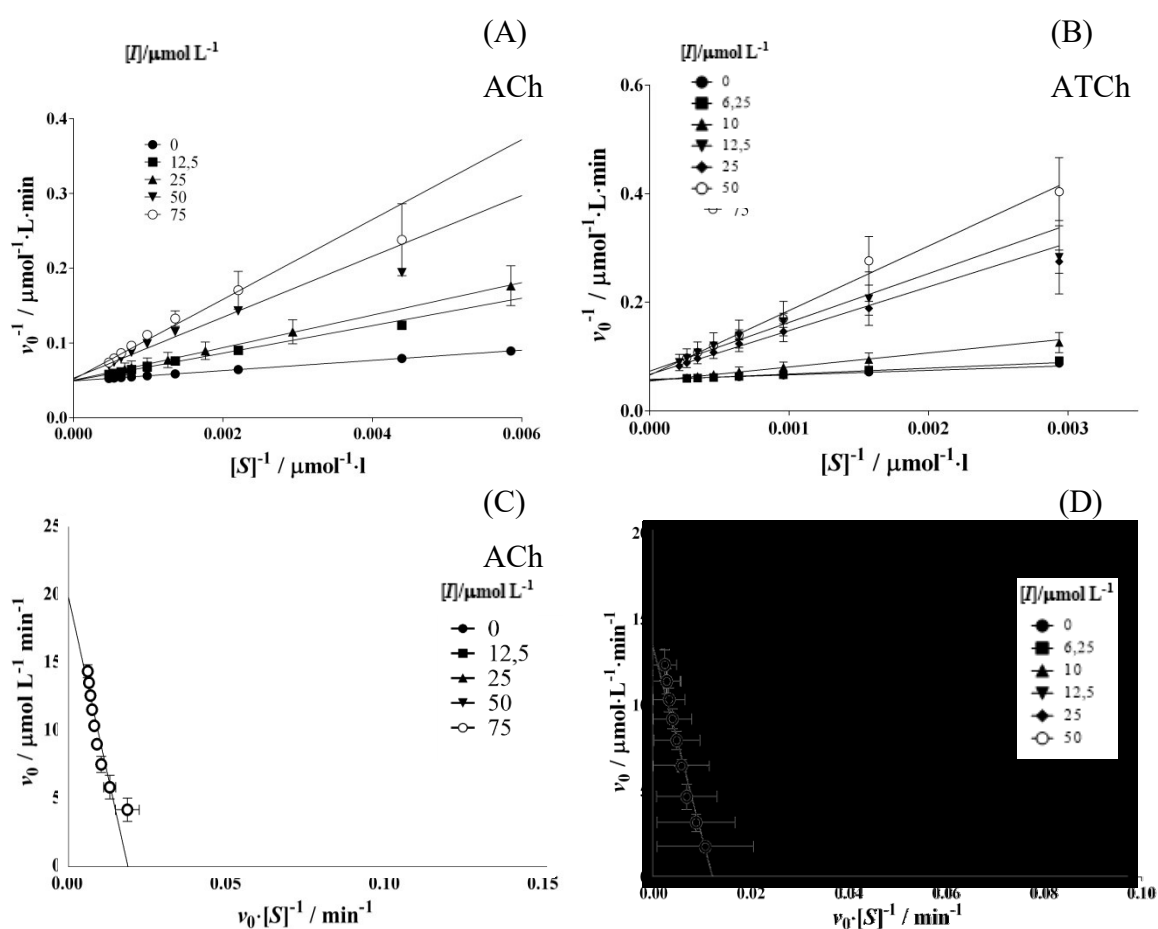
5.1.3.2 Obtenção dos dados de V_{\max} e K_m por análises lineares

Além desses dados, os ensaios referentes à inibição foram realizados para se comparar a efetividade dos resultados de um inibidor com os substratos acetilcolina e acetiltiocolina. Como já descrito, o carbaryl teve que ser diluído em metanol, por conta de suas propriedades físicas. Isso não impactou nas análises, uma vez que os dados obtidos da cinética com e sem metanol se mostraram sem distinções relevantes, sendo o k_{cat} na ausência de metanol = $11,322 \pm 1,147 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$, enquanto que o $K_m = 126,30 \pm 14,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e os valores na presença de metanol foram $k_{\text{cat}} = 11,255 \pm 0,047 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ e o $K_m = 138,10 \pm 8,24 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, (Gráfico 8B). Utilizando o teste F no GraphPad Prism® 6.01, com o uso de AIC, mostrou que há 76,02% de chances de ser verdadeira a hipótese que uma mesma curva pode ser ajustada para ambos os conjuntos de dados ($p = 0,1668$), isso indica que as curvas na presença e ausência de metanol possuem alta possibilidade de serem iguais. As diluições utilizadas de carbaryl nos ensaios com acetilcolina foram de 12,5, 25,0, 50,0 e 75,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para os ensaios com acetiltiocolina, as concentrações de carbaryl foram 6,25, 12,5, 10,0 25,0 e

50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em todas as análises, a concentração de metanol foi de 0,3 mol L^{-1} , a fim de se manter a mesma proporção em todos os ensaios.

Métodos lineares mais comumente encontrados na literatura foram utilizados para fim de comparação, os métodos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee (Gráfico 10), foram usados para se obter os valores V_{max} e K_m , (Tabela 5), que serão, depois, utilizados para obtenção de K_i .

Gráfico 10 - Gráficos de análises lineares de Eadie-Hofstee e Lineweaver-Burk com todos os ensaios contendo ou não inibidor



Gráficos de regressão linear com os dados obtidos das cinéticas realizadas na mesma temperatura de 310,15 K, na presença ou ausência de inibidor. As legendas inseridas nos gráficos mostram a quantidade de inibidor em $\mu\text{mol L}^{-1}$, na mesma ordem de grandeza dos outros parâmetros. Os gráficos foram feitos usando-se os resultados obtidos da análise variacional do deslocamento de Power no experimento calorimétrico. Em (A) e (B) estão os gráficos de Lineweaver-Burk para ACh (A) e ATCh (B) com pesos de $1/x^2$, em (C) e (D) estão os gráficos de Eadie-Hofstee para ACh (C) e ATCh (D) com pesos $1/x^2$.

Como descrito em 0, a inclinação da curva dada por Lineweaver-Burk é igual à razão K_m/V_{max} e o intercepto de y quando $x = 0$ é o valor inverso de V_{max} , assim a inclinação dividida por V_{max} é K_m . Já para Eadie-Hofstee, o valor de da inclinação é $-K_m$ e o intercepto- y é o valor de V_{max} .

Tabela 5 – Dados referentes às regressões lineares de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee das cinéticas obtidas em microcalorimetria utilizando os dois substratos e em diferentes concentrações do inibidor

ACETILCOLINA				
[Inibidor]	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$		$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$	
	<i>LB</i>	<i>EH</i>	<i>LB</i>	<i>EH</i>
[I] 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20,26 ($\pm 0,01$)	20,26 ($\pm 0,01$)	138,24 ($\pm 0,25$)	138,36 ($\pm 0,26$)
[I] 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,90 ($\pm 0,26$)	20,02 ($\pm 0,22$)	345,07 ($\pm 16,78$)	351,13 ($\pm 19,03$)
[I] 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,86 ($\pm 0,14$)	19,86 ($\pm 0,14$)	428,77 ($\pm 16,88$)	428,47 ($\pm 8,847$)
[I] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	18,92 ($\pm 1,10$)	20,37 ($\pm 0,91$)	771,24 ($\pm 93,56$)	954,56 ($\pm 103,6$)
[I] 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,46 ($\pm 1,44$)	19,83 ($\pm 1,34$)	1.039,88 ($\pm 123,92$)	1.062,5 ($\pm 165,0$)
ACETILTIOCOLINA				
[Inibidor]	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$		$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$	
	<i>LB</i>	<i>EH</i>	<i>LB</i>	<i>EH</i>
[I] 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,20 ($\pm 0,11$)	16,01 ($\pm 0,16$)	143,80 ($\pm 16,80$)	168,61 ($\pm 24,30$)
[I] 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,53 ($\pm 0,11$)	15,35 ($\pm 0,19$)	191,99 ($\pm 14,75$)	189,65 ($\pm 31,07$)
[I] 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	18,21 ($\pm 0,17$)	16,11 ($\pm 0,50$)	472,76 ($\pm 25,11$)	515,47 ($\pm 77,12$)
[I] 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	14,68 ($\pm 0,57$)	16,40 ($\pm 0,93$)	1.320,37 ($\pm 158,40$)	834,15 ($\pm 177,12$)
[I] 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,11 ($\pm 0,40$)	15,86 ($\pm 0,49$)	1.218,60 ($\pm 97,90$)	1.066,5 ($\pm 102,6$)
[I] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,18 ($\pm 0,63$)	15,52 ($\pm 0,53$)	1.805,34 ($\pm 168,62$)	1.424,6 ($\pm 98,1$)

Dados obtidos de LB – Lineweaver-Burk (pesos $1/x^2$) EH – Eadie-Hofstee (pesos $1/x^2$)

É bem claro uma variação grande entre os valores de V_{\max} e K_m entre as concentrações de inibidor e entre as duas análises, isso se deve aos erros grandes observados tanto em Lineweaver-Burk e, maiores ainda, em Eadie-Hofstee. Interessante notar que Dowd e Riggs (1964) compararam várias análises lineares para obtenção dos parâmetros descritos e concluíram que Lineweaver-Burk era o método mais fraco existente, quando se trabalha com dados onde os pesos são considerados iguais, dessa forma, pontos com as velocidades pequenas, i.e., em concentrações de substrato pequenas, teria um peso significativo maior, isso poderia retornar valores irrealis, até negativos, de V_{\max} e K_m (DOWD; RIGGS, 1964). Porém, valores mais próximos do que poderia ser considerado real, são obtidos quando um peso estatístico é dado aos dados, de maneira que os pontos mais afastados do quadrante da origem

do gráfico tenham pesos menores (LEATHERBARROW, 1990). Ainda que dados obtidos por calorimetria sejam muito precisos e sofram pouco com erros do método automatizado, a manipulação dos reagentes ocasiona tais variações observáveis, e.g., concentrações de enzima e de substrato, por mais controladas que as variações possam tentar ser.

A análise de Eadie-Hofstee já era considerada como muito influenciável pelos erros associados, por seu método de análises (ver seção 0), sendo visível pela variação observada com os dados obtidos pelo outro método linear e pelos altos desvios acompanhados.

A despeito disso, os valores de V_{\max} da ACh e ATCh obtidos para cada concentração de inibidor, quando na análise no GraphPad Prism[®] 6.01 entre Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee, retornam valores próximos entre si, sem diferença estatística, ao se utilizar o teste 2way-ANOVA com pós-teste de Tukey e $p < 0,05$. O mesmo acontece quando se compara os valores de V_{\max} obtidos para cada concentração de inibidor tanto para ACh quanto para ATCh (2way-ANOVA pós-teste de Sidak e $p < 0,05$).

Ao se analisar os valores de K_m entre Lineweaver-Burk comparado com Eadie-Hofstee para ACh, esses não possuem diferença significativa entre si (2way-ANOVA pós-teste de Sidak e $p < 0,05$), ainda que o valor de p para a concentração de inibidor $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ seja menor que os demais. Para a mesma análise para ATCh, os valores também se mantiveram sem diferença estatística, exceto para as concentrações de inibidor $12,5$ e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Como esses ensaios apresentam menores variações absolutas, os valores obtidos pelas análises lineares sofrem pouco com a distorção dos erros. Porém, quando o inibidor é adicionado, ocorre um aumento do valor de K_m , assim, velocidades próximas de K_m sofrem mais com os erros não constantes do método analítico. Esse erro pode ser considerado como, além dos erros não determinados (manipulação de reagentes), a própria variação inerente a uma técnica, o chamado ruído. Como mais são os valores de velocidade que estão abaixo de K_m , mais são os pontos que sofrem proporcionalmente com esses erros. As análises lineares tendem a aumentar esse erro, e a retornar valores que são imprecisos (RITCHIE; PRVAN, 1996), e isso é bastante claro no valor de K_m para as concentrações maiores de inibidor. Na seção seguinte, os dados obtidos mostram uma diferença em relação aos erros já mostrados, mostrando, o que já era conhecido, que as análises lineares mais utilizadas para obtenção dessas estimativas enzimáticas falham ao retornar valores confiáveis.

5.1.3.3 Obtenção dos dados de V_{\max} e K_m por análises não-lineares

A análise de regressão não-linear simultânea (SNLR), onde todas as curvas são analisadas em conjunto, e o resultado dos parâmetros cinético de inibição são vistos no Gráfico 11. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para os valores de k_{cat} e K_m , na presença de diferentes concentrações de inibidor, como carbaryl é um inibidor competitivo clássico, percebe-se claramente uma variação em K_m , mas não em V_{\max} , ou seja, k_{cat} .

Gráfico 11 – Análise de regressão não-linear com os dados das cinéticas na presença e ausência de inibidor para os substratos acetilcolina e acetiltiocolina

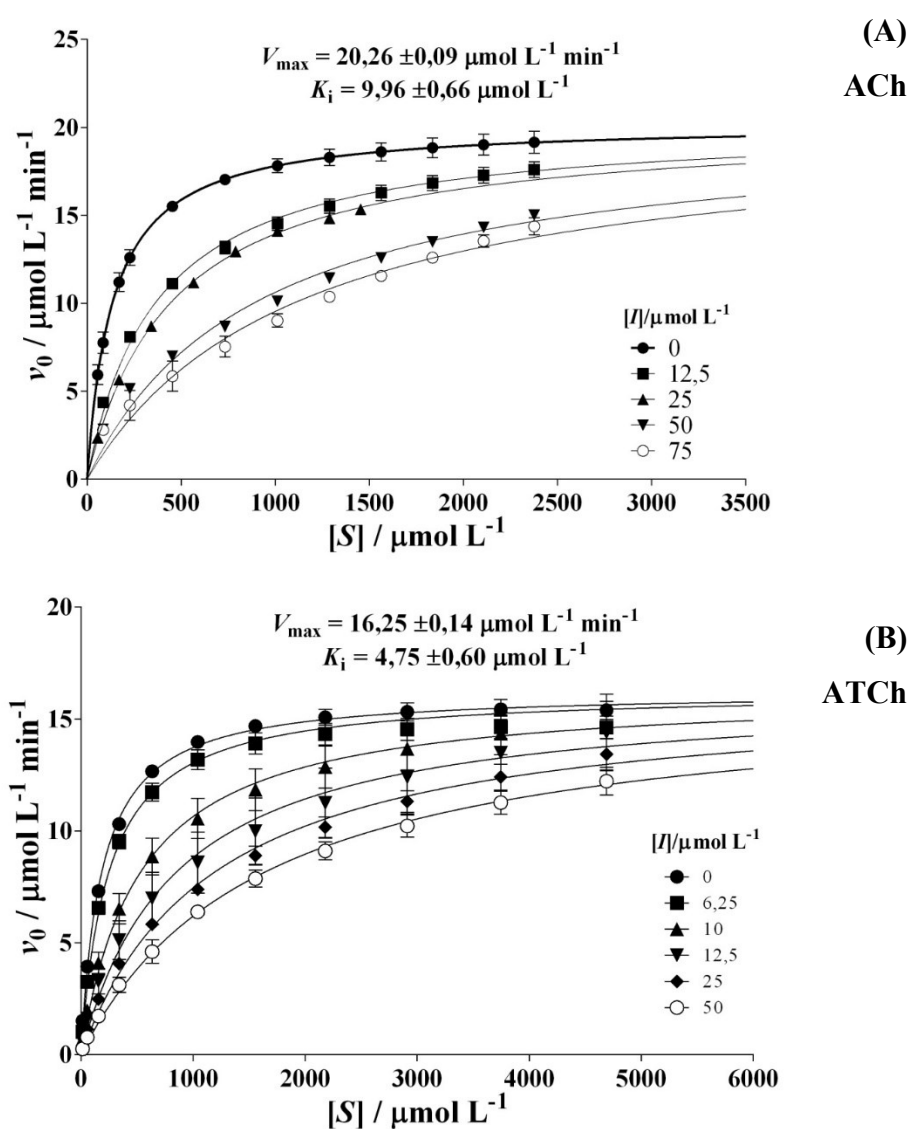


Gráfico de regressão não-linear, em 310,15 K, na presença ou ausência de inibidor. Em (A), estão os ajustes utilizando como substrato acetilcolina e em (B) para acetiltiocolina. A concentração de inibidor é em $\mu\text{mol L}^{-1}$, na mesma ordem de grandeza dos outros parâmetros. Os gráficos foram feitos usando-se os resultados obtidos da análise variacional do deslocamento de P no experimento calorimétrico. A análise de SNLR foi feita concomitantemente, resultando no valor de K_i , mostrado em cada gráfico.

Tabela 6 – Dados referentes à regressão não-linear ajustados à equação de Michaelis-Menten, com e sem inibidor

ACETILCOLINA		
[Inibidor]	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$
[I] 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20,26 ($\pm 0,09$)	138,08 ($\pm 0,15$)
[I] 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,91 ($\pm 0,25$)	370,16 ($\pm 8,89$)
[I] 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,96 ($\pm 0,16$)	452,68 ($\pm 4,08$)
[I] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	19,39 ($\pm 1,17$)	906,25 ($\pm 40,66$)
[I] 75 $\mu\text{mol L}^{-1}$	20,74 ($\pm 1,47$)	1.122,99 ($\pm 53,25$)
ACETILTIOCOLINA		
[Inibidor]	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$
[I] 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,25 ($\pm 0,14$)	184,61 ($\pm 5,85$)
[I] 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,59 ($\pm 0,18$)	247,11 ($\pm 12,04$)
[I] 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,86 ($\pm 0,60$)	527,85 ($\pm 34,52$)
[I] 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,18 ($\pm 1,16$)	844,74 ($\pm 85,87$)
[I] 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,08 ($\pm 0,57$)	1.182,82 ($\pm 45,14$)
[I] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,89 ($\pm 0,69$)	1.1627,10 ($\pm 50,87$)

Dados obtidos por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados

Ao se comparar as análises lineares com as não-lineares, vê-se uma nítida diferença dos desvios padrões dos valores das constantes cinéticas, sendo os erros das lineares maiores que os observados na regressão não-linear. Esse erro nos dados obtidos pelas regressões lineares são proporcionalmente maiores que os erros encontrados na não-linear, justamente pelo fato da distorção ocasionada pela manipulação dos valores numéricos dos dados. Mesmo com o peso estatístico dado em Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee, os erros crescem de maneira não linear com os erros da regressão não-linear.

Os valores de V_{\max} para ambas as análises se mostraram estatisticamente iguais, quando feito teste- F com critério de informação de Akaike, onde para ACh, todos tiveram probabilidade $>88,21\%$ para serem iguais e, para ATCh, todos tiveram probabilidade $>.61,77\%$ de serem iguais.

Percebe-se um valor menor da velocidade da enzima utilizando ATCh quando comparado com ACh, isso em todas as análises. Isso ocorre pelo fato da enzima possuir uma maior interação com o estado de transição do seu substrato natural do que com o substrato sintético da enzima. Isso só pode ser analisado quando os ensaios utilizam a mesma quantidade de enzima, logo, o que se mede na realidade é o k_{cat} (Tabela 7). Como já dito na seção 3.2.2.1, a eficiência catalítica de uma enzima seria dada por k_{cat}/K_m , que é o valor cuja constante de segunda-ordem k_1 assumiria se a etapa limitante da reação fosse a frequência colisional entre substrato e enzima. Isso apenas ao assumir que o valor de k_{cat} é grande o suficiente para não ser considerado como a etapa limitante, e a aproximação dada para situações onde $[S]$ é muito pequena, a constante de segunda-ordem para a dissociação do complexo $[ES]$ para $[E]$ e $[S]$, k_{-1} , é desprezível.

Tabela 7 – Valores de k_{cat} e K_m obtidos pelas análises lineares e não-lineares através do método de microcalorimetria

ACETILCOLINA		
Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Não-linear
k_{cat}/s^{-1}		
11.257,46 ($\pm 25,71$)	11.255,56 ($\pm 21,42$)	11.255,56 (+36,79)
$k_{cat} K_m^{-1} / \times 10^7 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$		
8,14 ($\pm 0,002$)	8,13 ($\pm 0,002$)	8,15 (+0,003)
ACETILTIOLCOLINA		
Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Não-linear
k_{cat}/s^{-1}		
8.444,38 ($\pm 62,89$)	8.921,11 ($\pm 84,58$)	9.027,78 ($\pm 76,66$)
$k_{cat} K_m^{-1} / \times 10^7 (\text{mol L}^{-1})^{-1} \text{s}^{-1}$		
5,06 ($\pm 0,044$)	5,87 ($\pm 0,048$)	4,89 (+0,042)
Dados referentes aos ensaios a 310,15 K na ausência de inibidor		

Com base na tabela acima descrita, os valores do número de renovação ou k_{cat} , são maiores para a ACh que para ATCh, o que já era de se esperar, uma vez que acetilcolina é o

substrato da enzima que encontramos na natureza. Também observa-se que o valor absoluto da constante é muito elevado, entre os maiores valores encontrados na literatura, e comparável com outros autores que chegaram a números próximos, porém utilizando outras metodologias (WILSON e HARRISON, 1961; FERSHT, 1977; FORSBERG e PUU, 1984; PRYOR et al, 1992; XU, SHENGJUN et al, 2008; POHANKA et al, 2011). Sendo assim, como o valor de K_m também é relativamente baixo, a razão entre esses parâmetros se mostra bastante elevada, mostrando ser razoável supor que o limitante para a reação de quebra da acetilcolina e da acetiltiocolina é justamente a enzima conseguir encontrar o substrato. E quando o substrato entra no sítio ativo, ele é quase que imediatamente convertido em produto.

5.1.4 Determinação de K_i

Por meio dos dados obtidos de V_{max} e K_m , das análises tanto lineares e não-lineares, os valores de K_i puderam ser calculados por uso do método não-linear simultâneo (SNLR) e pelo método de $K_{m,app}$. Os valores catalíticos foram divididos entre os obtidos em análises lineares (Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee) e os obtidos pela não-linear (Gráfico 11). O K_i por SNLR já foi mostrado no Gráfico 11, e os dados são exibidos na Tabela 8 juntamente com os dados de K_i obtidos com o método linear. Os Gráfico 12 e 13 mostram os resultados obtidos pelo método linear de todos os valores das velocidades máximas, V_{max} , e K_m obtidos das três análises de regressão.

Tabela 8 – Dados de K_i obtidos pelos métodos de SNLR e de $K_{m,app}$, utilizando os valores de V_{max} e K_m alcançados pelas análises de regressão não-linear e lineares de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee

ACETILCOLINA			
$K_i/\mu\text{mol L}^{-1}$			
Método	<i>Não-linear</i>	<i>LB</i>	<i>EH</i>
SNLR	9,96 ($\pm 0,66$)	—	—
$K_{m,app}$	10,29 ($\pm 0,91$)	10,88 ($\pm 0,86$)	10,87 ($\pm 1,70$)
ACETILTIOCOLINA			
$K_i/\mu\text{mol L}^{-1}$			
Método	<i>Não-linear</i>	<i>LB</i>	<i>EH</i>
SNLR	4,75 ($\pm 0,66$)	—	—
$K_{m,app}$	4,99 ($\pm 2,27$)	3,12 ($\pm 2,09$)	6,65 ($\pm 1,74$)
SNLR (análise não-linear simultânea), Lineweaver-Burk (LB) e Eadie-Hofstee (EH)			

Observa-se uma variação maior com os dados obtidos pela análise de Eadie-Hofstee. Como essa já possui um erro maior associado à distorção dado pelo uso da variável dependente em ambos os eixos da regressão, o valor de correlação obtido da análise de $K_{m,app}$ é menor (0,9807) para ele quando comparado com as outras análises (0,9969 para a regressão de $K_{m,app}$ usando dados obtidos pela regressão não-linear e 0,9959 para a regressão usando Lineweaver-Burk). Outra vez, esses valores apenas indicam um desvio da dependência linear de uma variável pela outra, isso para a acetilcolina, quando comparando com a acetiltiocolina, os valores de correlação (0,9863 não-linear, 0,9123 Lineweaver-Burk e 0,9896 para Eadie-Hofstee).

Gráfico 12 – Análises de regressão linear para determinação de K_i pelo método de $K_{m,app}$ utilizando os dados de V_{max} e K_m obtidos por três análises diferentes para o substrato ACh

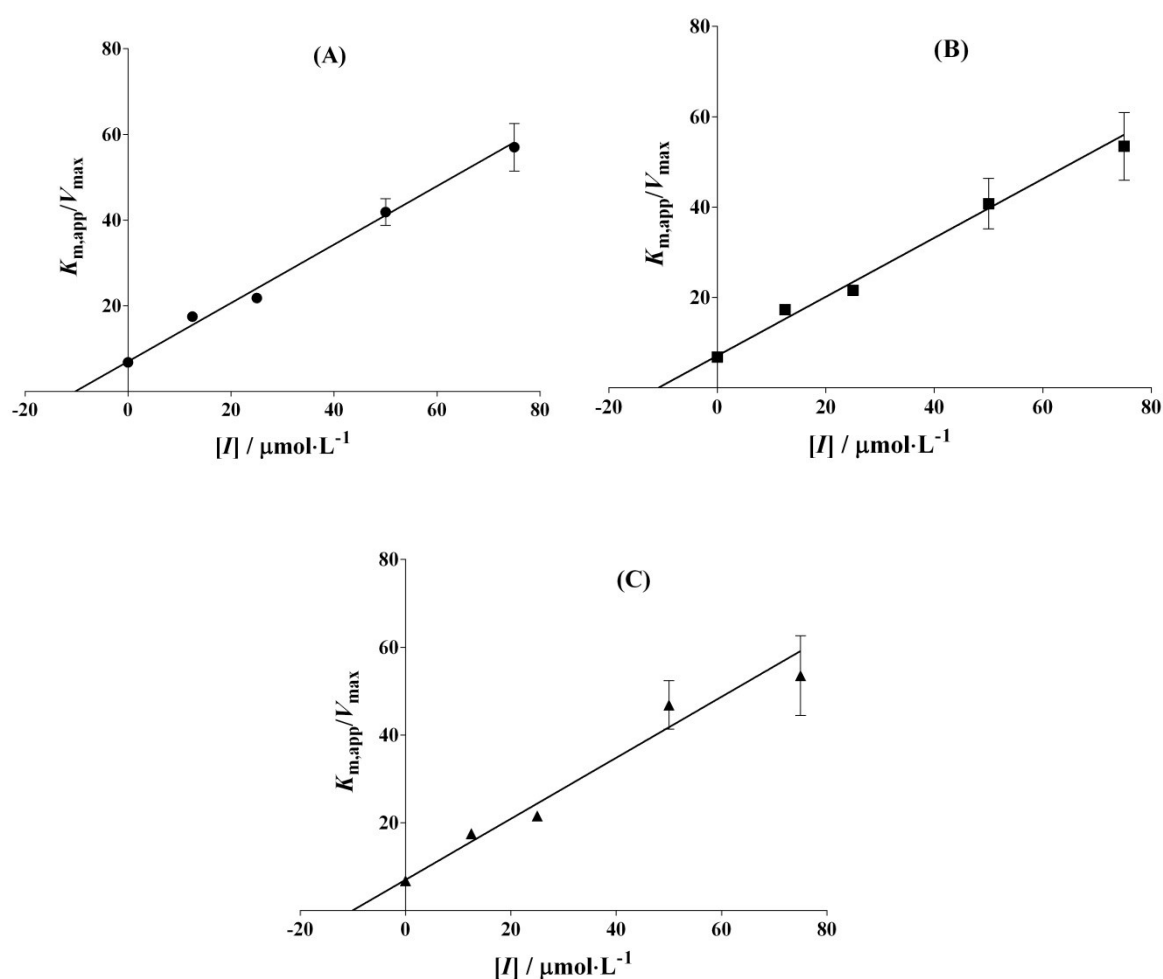


Gráfico de regressão linear com os dados obtidos das cinéticas de inibição com acetilcolina e carbaryl utilizando os valores de v_0 , e K_m obtidos pelas análises de regressão não-linear, (A), e das regressões lineares de Lineweaver-Burk (B) e Eadie-Hofstee (C). Todas essas análises foram ajustadas com o peso de $= 1/y^2$.

Gráfico 13 – Análises de regressão linear pelo método de $K_{m,app}$ para determinação de K_i utilizando os dados de V_{max} e K_m obtidos por três análises diferentes para o substrato ATCh

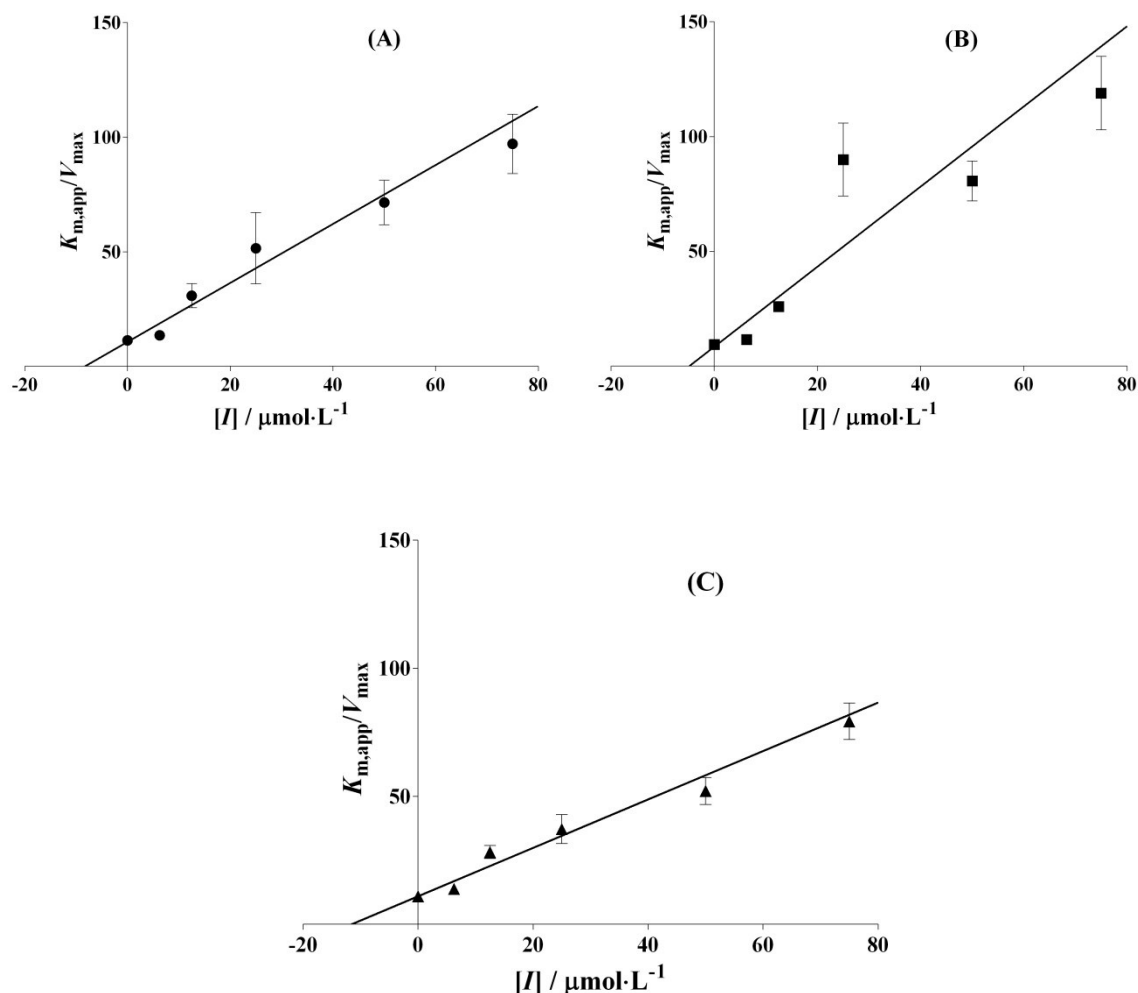


Gráfico de regressão linear com os dados obtidos das cinéticas de inibição com acetilcolina e carbaryl utilizando os valores de v_0 , e K_m obtidos pelas análises de regressão não-linear (A), e das regressões lineares de Lineweaver-Burk (B) e Eadie-Hofstee (C). Todas essas análises foram ajustadas com o peso de $= 1/y^2$.

Percebe-se, mais uma vez, que o ajuste linear, por mais que se tome cuidado com pesos estatísticos, mostrou-se mais propensa a aumentar os erros. Como se fosse uma alavanca, pontos mais afastados da origem teriam um peso maior na distribuição da reta, assim, um peso diferenciado é dado a eles para que não influencie na inclinação. Porém, mesmo com esses cuidados, esse tipo de análise tem uma maior propagação dos erros encontrados em V_{max} e K_m , ambos no eixo-x. Comparando ACh com ATCh, percebe-se que no ensaios desse último, vários são os pontos que desviam mais perceptivelmente do ajuste. Analisando em conjunto com a Tabela 6 e o Gráfico 11, percebe-se que um ponto em (B) do

Gráfico 13, onde os dados foram obtidos pela análise de Lineweaver-Burk, desvia-se, e muito, da reta dada pelo ajuste. E é justamente o ponto de concentração de inibidor que mais possui variação de K_m e isso afeta o resultado obtido por essa aproximação. Curiosamente, é justamente o valor de K_i obtido por $K_{m,app}$ com os dados de Lineweaver-Burk que mais se aproximam do valor resultante da análise não-linear simultânea. Isso poderia ser pelo fato do ponto muito fora da reta influenciar no ajuste, pois todas as outras análises lineares para K_i mostraram superestimar o valor dessa constante. Se os dados obtidos por um método, seja o calorimétrico ou outro qualquer, possuir uma variação entre suas replicatas um pouco maior, esses desvios serão valorizados em análises lineares, podendo gerar valores que não correspondem à realidade. Ainda que seja parcimonioso não afirmar com toda a certeza que o valor obtido por SNLR seja o mais próximo do real, ele é, sem dúvidas, o mais confiável entre todas as análises, tanto para ACh com desvios menores, quanto para ATCh, onde os desvios são maiores.

De qualquer maneira, os valores obtidos em todas as análises permitem dizer que a constante de inibição do carbaryl é baixa, em ambos os substratos e semelhantes para os dois. Isso pode ser reflexo do modo como o carbaryl age como inibidor, entrando no sítio ativo da enzima, interagindo com os aminoácidos aromáticos do sítio aniônico da enzima, e bloqueando a entrada do substrato na garganta da enzima. Os valores de inibição para ACh são próximos em todas as análises, como discutido, resultado da pouca variação nos dados, porém são maiores que o K_i para o substrato ATCh. Se o valor de K_i pode ser pensado como a quantidade de inibidor necessária para diminuir a reação, quanto menor esse valor, mais eficaz seria o inibidor. Desse modo, como a especificidade da ACh e AChE é muito alta, valores maiores de inibidor são necessários para deslocar ACh do sítio ativo, porém, com a ATCh, ocorre o inverso, uma concentração menor de inibidor já consegue realizar a inibição. Como os valores não são muitas ordens de vezes maiores, pode-se dizer que são equiparáveis. Um ensaio que pretenda indicar o valor de inibição para um carbamato qualquer, classe química com propriedades químicas semelhantes, utilizando acetiltiocolina, é aceitável extrapolar esse valor para a acetilcolina.

5.1.5 Método de Ellman

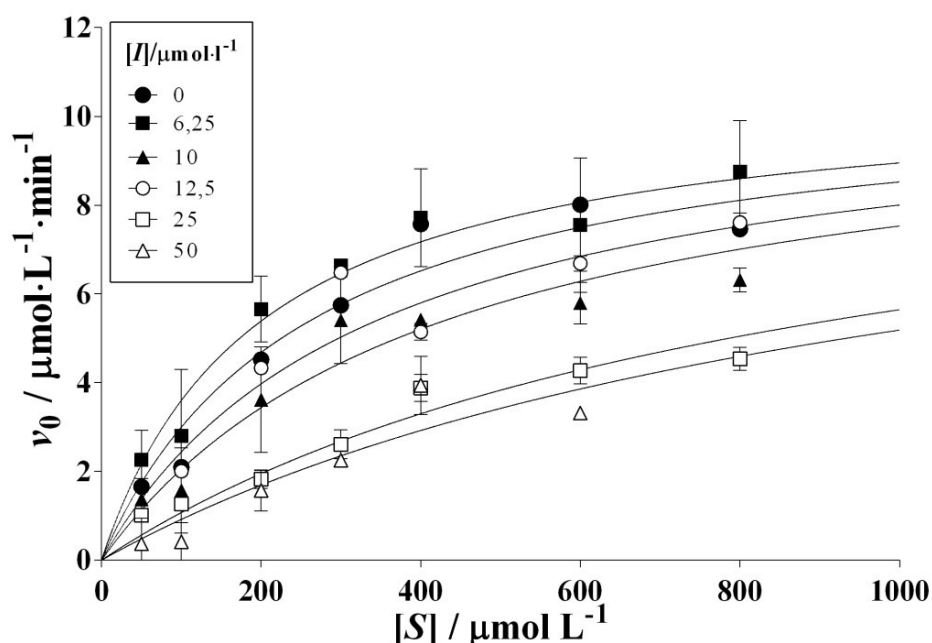
Apenas para fim comparativo, o método clássico descrito por Ellman e colaboradores em 1961, foi utilizado. Nesse método, além da enzima, a acetiltiocolina e os tampões já

citados, nas mesmas concentrações, um outro composto tem que ser adicionado à reação, o DTNB. No caso, o DTNB funciona como um cromóforo o qual será medido por absorvância (ELLMAN et al., 1961). Neste método indireto, um aparelho de espectrofotometria, Varioskan[®] da ThermoScientific[®], foi calibrado com uso de soluções padrões para averiguação da intensidade da lâmpada de xenônio e a exatidão dos valores de comprimento de onda. Após a verificação, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde as soluções de tampão acrescidas de metanol, substrato, inibidor (substituído por tampão nos ensaios controle) e DTNB foram adicionados previamente. O próprio aparelho é capaz de pipetar a solução contendo a enzima em todos os poços onde ocorrem as reações.

Os produtos da reação, como já citado, são a tiocolina e o ácido etanoico. A tiocolina, que possui um grupo tiol em sua cadeia, fará um ataque nucleofílico à ligação dissulfeto do DTNB, gerando um subproduto que tem absorvância máxima na faixa de comprimento de onda de 409 nm. As leituras dessas absorvâncias a cada 30 s antes da adição da enzima por um período de 5 min dão as taxas de clivagem espontânea da ligação dissulfeto do DTNB, e isso deve ser excluído dos valores gerados na cinética enzimática.

No ensaio já com a enzima, leituras a cada 30 s foram realizadas por um período de 10 min, e a inclinação da reta dada pela variação da concentração de produto por tempo é igual à velocidade da enzima. Essas velocidades em função da concentração inicial de substrato adicionados em cada poço podem ser ajustadas à equação de Michaelis-Menten. O volume de cada reação é pequeno, o que aumenta a propensão de erros não determinados serem percebidos na avaliação dos dados. As concentrações de inibidor utilizadas para esse experimento foram de 6,25, 10,0, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e a concentração de enzima utilizada foi a mesma de todos os ensaios deste trabalho, 30 pmol L^{-1} . O resultado pode ser visualizado no Gráfico 14 e na Tabela 9.

Gráfico 14 – Dados dos ensaios de cinética com ATCh na presença e ausência do inibidor carbaryl realizado pelo método de Ellman



Análise de regressão não-linear com os dados obtidos pelo método de Ellman, já identificando, em análise única, os valores de V_{\max} e K_m para todos os ensaios com e sem inibidor

Tabela 9 – Dados referentes ao ensaio de cinética com ATCh realizado pelo método de Ellman

Ensaio	$V_{\max}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	$K_m/\mu\text{mol L}^{-1}$	$K_i/\mu\text{mol L}^{-1}$
[I] 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	11,34 ($\pm 1,08$)	258,1 ($\pm 38,00$)	10,53 ($\pm 2,20$)
[I] 6,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	11,01 ($\pm 1,04$)	198,1 ($\pm 29,22$)	
[I] 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	8,80 ($\pm 1,01$)	424,2 ($\pm 52,05$)	
[I] 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	11,38 ($\pm 1,66$)	340,1 ($\pm 43,66$)	
[I] 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	10,73 ($\pm 1,52$)	900,2 ($\pm 104,3$)	
[I] 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	9,58 ($\pm 5,25$)	1.068,1 ($\pm 137,8$)	

Dados obtidos por regressão não-linear pelo método dos mínimos quadrados, e K_i por SNLR

São visíveis, nos resultados obtidos, os desvios experimentais grandes, referentes aos pontos tanto com inibidor quanto sem. Esses erros maiores podem ser devido à manipulação de quantidades menores de reagentes, necessitando de grande precisão para executar a transferência desses para a placa onde ocorrerá a reação. Outro motivo que pode ser apontado é a variabilidade decorrente das reações envolvendo o DTNB, uma vez que é o produto

proveniente dessa quebra que será avaliado em função do tempo. O equilíbrio da reação de formação de tiocolina com o ácido tionitrobenzoico pode ser afetado por qualquer um dos reagentes presentes na solução, inclusive o próprio carbaryl. Ademais, como a reação é medida indiretamente, sempre haverá a dúvida de se observar a reação real. Com a calorimetria, é possível enxergar o mais próximo o possível da reação em si, com a possibilidade de distinguir tipos de interação através do calor trocado em cada processo.

5.1.6 Integral de Michaelis-Menten

Outro método possível de ser realizado é com a forma integrada de Michaelis-Menten, onde várias curvas de concentração de produto formado por tempo são analisadas diretamente pela concentração de substrato inicial, após cada injeção. Essa análise também é pelo método dos mínimos quadrados, já retornando os valores de k_{cat} e K_m . Para isso, uma tabela é feita em um programa simples, como no Office Excel[®], de modo que os todos os valores de tempo t , concentração de substrato inicial $[S]_0$, produtos formados por tempo $[P]_t$, e concentração de enzima $[E]$, fiquem alinhados em colunas lado a lado. Com o uso da ferramenta Solver, dentro do programa, é possível realizar a análise utilizando a equação (32) alterada em função da concentração de produto. Assim, reorganizando a equação, tem-se:

$$t = \frac{K_m \ln \left(\frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]_t} \right) + [P]_t}{[E] \times k_{cat}} \quad (39)$$

Com uma única análise em função do tempo, é possível calcular as constantes catalíticas da reação enzimática. Desse modo os resultados obtidos das análises das cinéticas em diferentes temperaturas e nas análises de inibição mostraram os resultados semelhantes com os exibidos pelas análises utilizando Michaelis-Menten clássica. Como foi possível determinar as constantes k_{cat} para diferentes temperaturas, também foi possível, através da equação Arrhenius, obter os valores das constantes de ativação (Tabela 10 e 11).

Tabela 10 – Dados de parâmetros cinéticos e de ativação com valores obtidos da análise de cinética enzimática utilizando a integral e Michaelis-Menten para o substrato ACh

Ensaio	k_{cat}/s^{-1}	$\Delta^\ddagger G^\circ/kJ\ mol^{-1}$	$\Delta^\ddagger H^\circ/kJ\ mol^{-1}$	$T\Delta^\ddagger S^\circ/kJ\ mol^{-1}$
309,15 K	8.549,60	52,54	144,68	92,14
309,65 K	10.134,00	52,20	144,68	92,48
310,15 K	11.099,10	52,04	144,67	92,62
310,65 K	11.570,80	52,02	144,66	92,64
311,15 K	12.637,90	51,88	144,66	92,78

	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/\mu mol\ L^{-1}$	$\frac{k_{cat}\ K_m^{-1}}{\times 10^7\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}}$	$K_i/\mu mol\ L^{-1}$
[I] 0 $\mu mol\ L^{-1}$	11.315,2	138,3	8,18	9,72
[I] 12,5 $\mu mol\ L^{-1}$	11.137,5	216,4	5,15	
[I] 25 $\mu mol\ L^{-1}$	11.101,5	663,8	1,67	
[I] 50 $\mu mol\ L^{-1}$	11.220,8	914,9	1,23	
[I] 75 $\mu mol\ L^{-1}$	11.180,1	1037,9	1,08	

Dados obtidos pelo método dos mínimos quadrados utilizando a ferramenta Solver do Office Excel®

Tabela 11 – Dados de parâmetros cinéticos e de ativação com valores obtidos da análise de cinética enzimática utilizando a integral e Michaelis-Menten para o substrato ATCh

Ensaio	k_{cat}/s^{-1}	$\Delta^\ddagger G^\circ/kJ\ mol^{-1}$	$\Delta^\ddagger H^\circ/kJ\ mol^{-1}$	$T\Delta^\ddagger S^\circ/kJ\ mol^{-1}$
309,65 K	8.463,76	52,65	104,97	52,31
310,15 K	9.150,12	52,54	104,96	52,42
310,65 K	9.823,32	52,45	104,96	52,51
311,15 K	10.338,24	52,24	104,95	52,55

	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/\mu mol\ L^{-1}$	$\frac{k_{cat}\ K_m^{-1}}{\times 10^7\ L\ mol^{-1}\ s^{-1}}$	$K_i/\mu mol\ L^{-1}$
[I] 0 $\mu mol\ L^{-1}$	9.050,2	148,2	6,11	5,86
[I] 6,25 $\mu mol\ L^{-1}$	8.661,1	205,9	4,21	
[I] 10 $\mu mol\ L^{-1}$	8.908,2	222,15	4,01	
[I] 12,5 $\mu mol\ L^{-1}$	9.024,0	475,1	1,90	
[I] 25 $\mu mol\ L^{-1}$	9.088,3	916,5	0,99	
[I] 50 $\mu mol\ L^{-1}$	9.007,8	1.087,00	0,83	

Dados obtidos pelo método dos mínimos quadrados utilizando a ferramenta Solver do Office Excel®

Nas Tabela 10 e 11, o valor de K_i foi obtido com a equação (34), desse modo, uma análise comparativa pode ser feita.

Nota-se que esses valores são bastante parecidos com os obtidos pela análise de regressão não-linear para ambos os substratos. Porém, como foram avaliados apenas uma curva em cada ensaio, o desvio que seria observado pela flutuação experimental não pode ser levado em consideração.

Em uma análise de todos os resultados, pode ser verificada uma similaridade com os valores de K_m com ambos os substratos na ausência de inibidor, motivado pela semelhança das afinidades dos substratos pela enzima. Como K_m é uma medida aparente da razão entre a formação do complexo enzima-substrato e a catálise do substrato em produto, um valor baixo de K_m significaria que uma concentração menor de substrato seria necessária para se alcançar a velocidade máxima da cinética. Valores semelhantes de K_m dizem afinidades semelhantes, porém somente parte do problema é resolvida nessa interpretação (FERSHT, 1977; EISENTHAL; DANSON; HOUGH, 2007).

Se for considerada a razão entre a constante catalítica k_{cat} e K_m , isso significa comparar a taxa com que o substrato é sequestrado pela enzima para formar um complexo produtivo, isto é, que irá ser convertido em produto, desconsiderando a quebra do complexo em substrato e enzima novamente. Visto por esse lado, valores maiores dessa razão surgem em enzimas que tiveram uma evolução para maximizar o processo catalítico, sendo responsivas a qualquer quantidade de substrato presente em sua volta. Algumas enzimas com baixo K_m podem apresentar, também, baixo k_{cat} , mantendo uma alta razão k_{cat}/K_m , ou seja, o importante em sua função fisiológica é manter a enzima com o substrato, não importando se o substrato será convertido em produto em um processo muito veloz. Esse seria o exemplo de enzimas que oferecem resistência a antibióticos em bactérias, na qual a função principal é evitar a difusão do fármaco pelo periplasma bacteriano, dando à enzima o tempo que ela necessitar para catalisar a quebra do composto químico (NORTHROP, 1998). Visto por esse lado, os valores obtidos, mostram que, no caso da AChE, a evolução a selecionou para ser uma enzima que tenha capacidade de clivar o substrato assim que ele estiver disponível, sendo a própria difusão desse pelo meio o fator que limita sua biodisponibilidade.

Esses resultados devem ser levados em consideração, também, por mostrarem a capacidade que a enzima possui de processar o substrato artificial, ATCh, com semelhante eficiência ao substrato natural, ACh, ainda que não totalmente igual. Desse modo, é fato afirmar que a utilização da ATCh para se determinar atividade de inibição de um fármaco ou

qualquer outro ensaio no qual a utilização da enzima não pode ser feita por técnicas mais complexas, é bem próximo se fosse utilizado o substrato natural da enzima.

Entretanto, cuidados devem ser tomados para uma boa comparação entre metodologias. Já é fato recorrente na literatura que análises lineares da atividade enzimática, ainda muito citada por bioquímicos que se fixam a livros-texto, são mais fracas em relação às análises não-lineares (DOWD; RIGGS, 1964; RITCHIE; PRVAN, 1996; KAKKAR; BOXAMBAUM; MAYERSOHN, 1999; FUKUSHIMA; USHIMARU; TAKAHARA, 2002; DAVIS; DAVIS, 2003; DUGGLEBY, 2009; CARILLO; CECARRELI; ROVERI, 2010). Então, há a necessidade de uma cautela maior ao utilizar dados obtidos por aproximações lineares, elas apenas indicam um caminho, mas são imprecisas ao falar de valores.

Assim, mesmo em análises não-lineares, dados ruins geram resultados ruins. Não há como obter valores precisos se os dados obtidos apresentam uma grande variação entre um experimento replicado e outro. A técnica de Ellman por absorbância é bem consolidada na literatura, porém, ainda assim, não é livre de erros, e nenhuma técnica o é. Porém estes podem ser minimizados ao se tentar estudar o evento o mais próximo possível.

A técnica de calorimetria consegue resolver esse problema ao analisar diretamente o calor trocado em um processo de quebra de uma ligação covalente, no caso, a hidrólise de um éster, sem a necessidade de qualquer outra reação acoplada (BIANCONI, 2007). Tomando o cuidado de conseguir delimitar o máximo possível quaisquer variáveis que possam interferir no resultado, a técnica de calorimetria é um importante auxílio na determinação e comparação mais sensível de uma reação enzimática e de outros processos onde a entalpia é fator importante da reação.

Nos campos mais recentes da enzimologia, surge a forma integrada da clássica equação de Michaelis-Menten, onde a solução para as constantes catalíticas pode ser alcançada diretamente pela concentração de produto formado em função do tempo (GOLIČNIK, 2013). Porém a forma encontrada pela integração direta da equação é implícita, onde o processo matemático para obtê-la é mais exaustivo. O método utilizado nesse trabalho se apoia em outro trabalho (BEZERRA; FRAGA; DIAS, 2013), onde a concentração de produto formado nos tempos próximos de zero são medidas em função do tempo, sem a necessidade de utilizar diferenciais para a determinação das velocidades. Nessa metodologia, a informação é igual à necessária para se realizar um ensaio mais clássico, porém em uma única análise é possível determinar as constantes catalíticas e, variando a concentração de inibidor, também a constante de inibição.

Mais estudos aprofundados sobre a utilização da equação integrada de Michaelis-Menten em microcalorimetria são necessários, porém uma ideia fundamental já foi lançada, onde uma técnica com grande precisão e sensibilidade vem em proveito de uma metodologia mais acurada (BEZERRA; DIAS, 2007; GOLIČNIK, 2012).

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível obter os valores das constantes catalíticas tanto para acetilcolina quanto para acetiltiocolina. Os valores obtidos mostram uma proximidade relativa entre si, levando em consideração que enzimas diferentes podem variar grandemente seu número de renovação, k_{cat} , chegando até a $40.000.000\text{ s}^{-1}$, no caso da catalase. Como diferentes análises matemáticas retornaram números próximos, ao se comparar os dois substratos, é esperado que ambos realmente possuam uma catálise semelhante, ainda que a diferença em sua estrutura, conseqüentemente as suas interações com a enzima, alterem levemente os valores das constantes. Isso também é evidenciado nos valores distintos de K_i , ainda que muito próximos, os valores para ACh são maiores, mostrando ser necessário mais inibidor para deslocar o substrato natural do sítio ativo da enzima. Uma análise alternativa que pode poupar tempo e retornar valores um pouco mais precisos é a forma integrada de Michaelis-Menten, ainda que nesse trabalho, a forma implícita tenha sido utilizada, necessitando de cálculos computacionais mais robustos. Os valores obtidos por essa análise são equiparáveis com os obtidos pelas análises clássicas da forma explícita aberta da equação. O método espectrofotométrico, nesse trabalho, se mostrou o mais propenso a erros. Qualquer análise matemática com esses dados está sujeito a erros na estimativa dos parâmetros cinéticos. É observável que, no caso dos resultados não necessitarem de grande exatidão, a análise pelo método espectrofotométrico retorna valores comparáveis aos obtidos por calorimetria. Ao se comparar os valores da cinética utilizando o substrato natural da enzima e o substrato artificial, foi possível determinar que ambos são próximos, ainda que não idênticos, e qualquer aproximação dos valores, ainda que acompanhada de um erro, não é equivocada.

Com isso, a robustez do método calorimétrico para análises enzimáticas mostrou-se, mais uma vez, muito mais eficaz, determinando a sua precisão no retorno dos valores de parâmetros cinéticos e termodinâmicos de uma reação.

7 PERSPECTIVAS

Para análises futuras, é importante determinar com maior clareza os valores da energia de ativação de ambas as reações, tanto com acetilcolina quanto com acetiltiocolina. Como os valores de temperatura foram muito próximos, será necessário trabalhar com pontos mais distantes entre si. Com a determinação de K_i mais preciso de um carbamato, outros pesticidas e inibidores da enzima podem ser mais bem estudados, inclusive com o propósito de se desenvolver um biossensor, capaz de reconhecer a inibição enzimática. Uma técnica analítica padrão dentro da clínica pode ser pensada, uma vez que o padrão-ouro no estudo da cinética enzimática pode ser a calorimetria, onde valores mais precisos de inibição ou ativação podem ser obtidos.

REFERÊNCIAS

- ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; JARA-PÉREZ, V.; CÁMARA-ARTIGAS, A. Thermodynamic determination of the binding constants of angiotensin-converting enzyme inhibitors by a displacement method. **Fed Eur Biochem Soc**, v. 581, p. 3449-3454, 2007.
- ANVISA. **Audiência pública para discutir o uso de agrotóxicos na agricultura e seus efeitos sobre trabalhadores rurais e consumidores de produtos agropecuários**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 2014.
- ASCENZI, P.; ASCENZI, M. G.; AMICONI, G. Enzyme competitive inhibition. Graphical determination of K_i and presentation of data in comparative studies. **Biochem Edu**, v. 15, n. 3, p. 134-135, 1987.
- ATKINS, G. L.; NIMMO, I. A. A comparison of seven methods for fitting Michaelis-Menten equation. **Biochem J**, v. 149, p. 775-777, 1975.
- ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-Química**. 9ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, 2012.
- AUGUSTO, L. G. S. Agrottoxins: new and old challenges for collective health [Editorial]. **Salud Coll**, Buenos Aires, v. 8, n. 1, p. 5-8, Apr 2012.
- BERKOWITZ, J.; ELLISON, G. B.; GUTMAN, D. Three methods to measure RH bond energies. **J Phys Chem**, v. 98, p. 2744-2765, 1994.
- BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equation to determine kinetic constants. **Biochem Mol Biol Edu**, v. 35, n. 2, p. 145-150, 2007.
- BEZERRA, R. M. F.; FRAGA, I.; DIAS, A. A. Utilization of integrated Michaelis-Menten equations for enzyme inhibition diagnosis and determination of kinetic constants using Solver supplement of Microsoft Office Excel. **Comp Meth Prog Biomed**, v. 109, p. 26-31, 2013.
- BIANCONI, M. L. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. **Biophys Chem**, v. 126, p. 59-64, 2007.
- BON, S.; COUSSEN, F.; MASSOULIÉ, J. BON, Suzanne; COUSSEN, Françoise; MASSOULIÉ, Jean. Quaternary associations of acetylcholinesterase II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. **J Biol Chem**, v. 272, n. 5, p. 3016-3021, 1997.
- BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Acta Iguazu**, Cascavel, v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.
- BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Biochem J**, v. 19, n. 2, p. 228-229, 1925.
- BROUGHTON, E. The Bhopal disaster and its aftermath: a review. **Environ Health**, v. 4, n. 1, p. 6, 2005.

BUTTERWORTH, P. J. The use of Dixon plots to study enzyme inhibition. **Biochem Biophys Acta**, v. 289, p. 251-253, 1972.

CARILLO, N.; CECARRELI, E. A.; ROVERI, O. A. Usefulness of kinetic enzyme parameters in biotechnological practice. **Biotech Gen Eng Rev**, v. 27, p. 367-382, 2010.

CHA, S. Tight-binding inhibitors—I: Kinetic behavior. **Biochem Pharmacol**, v. 24, n. 23, p. 2177-2185, Dec 1975.

CHENG, Y. C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibitory constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochem Pharmacol**, v. 22, p. 3099-3108, Apr 1973.

COHEN, O. et al. Comparison of polyethylene glycol-conjugated recombinant human acetylcholinesterase and serum human butyrylcholinesterase as bioscavengers of organophosphate compounds. **Ame Soc Pharmacol Exp Ther**, v. 70, p. 1121-1131, 2006.

CORNISH-BOWDEN, A.; CÁRDENAS, M. L. Specificity of non-Michaelis-Menten Enzymes: Necessary information for analyzing metabolic pathways. **J Phys Chem**, v. 114, p. 16209-16213, 2010.

DART, R. C. **Medical toxicology**. 1^a. ed. Phila: Williams & Wilkins, 2003.

DAS, Y. T.; BROWN, H. D.; CHATTOPADHYAY, S. K. Enthalpy of acetylcholine hydrolysis by acetylcholinesterase. **Biophys Chem**, v. 23, p. 105-114, 1985.

DAVIS, M. E.; DAVIS, R. J. **Fundamentals of chemical reaction engineering**. 1st. ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. **J Braz Chem Soc**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 407-428, 2009.

DOWD, J. E.; RIGGS, D. S. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. **J Biol Chem**, v. 240, n. 2, p. 863-869, Aug 1964.

DUDAI, Y.; HERZBERG, M.; SILMAN, I. Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. **Proc Natl Acad Sci**, v. 70, n. 9, p. 2473-2476, Sep 1973.

DUGGLEBY, R. G. Analysis of enzyme progress curves by nonlinear regression. In: PURICH, D. L. **Contemporary enzyme kinetics and mechanism, 3rd Edition: Reliable lab solutions (Selected methods in enzymology)**. 3rd. ed. New York: Academic Press, 2009. Cap. 5, p. 95-122.

DVIR, H. et al. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **Chem Biol Inter**, v. 187, p. 10-22, 2010.

EISENTHAL, R.; DANSON, M. J.; HOUGH, D. W. Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator? **Trends Biotech**, v. 25, n. 6, p. 247-249, 2007.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EL-SHANAWY, N. S. Oxidative Stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environ Toxicol Pharm**, New York, v. 28, p. 379-385, 2009.

FAO. **FAO Specifications and Evaluations for Carbaryl**. Food and Agriculture Organization of the United Nations. New York, p. 1-23. 2007.

FERSHT, A. **Enzyme Structure and Mechanism**. 2nd. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1977.

FIOCRUZ. **Brasil consome 14 agrotóxicos proibidos no mundo**. Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2012.

FORSBERG, A.; PUU, G. Kinetics for the inhibition of acetylcholinesterase from the electric eel by some organosphosphates and carbamates. **Eur J Biochem**, v. 140, p. 153-156, 1984.

FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal titration calorimetry: Experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. In: CORREIA, J. J.; DIETRICH III, W. **Methods in Cell Biology - Biophysical tools for biologists, Volume I: In vitro techniques**. 1st. ed. [S.l.]: Elsevier Inc, v. 84, 2008. Cap. 4, p. 972.

FUHRMANN, G. F.; VÖLKER, B. Misuse of graphical analysis in nonlinear sugar transport kinetics by Eadie-Hofstee plots. **Biochem Biophys Acta**, v. 1145, p. 180-182, Nov 1993.

FUKADA, H.; TAKAHASHI, K. Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. **Proteins**, v. 33, p. 159-166, 1998.

FUKUSHIMA, Y.; USHIMARU, M.; TAKAHARA, S. On the error of the Dixon plot for estimating the inhibition constant between enzyme and inhibitor. **Biochem Mol Biol Edu**, v. 30, n. 2, p. 90-92, 2002.

GALGANI, F.; BOCQUENE, G. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and Carbamates. **Bull Environ Contarn Toxicol**, v. 45, p. 243-249, 1990.

GALZI, J. L. et al. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. **Annu Rev Pharmacol**, v. 31, p. 37-72, 1991.

GOLDBERG, R. N.; KISHORE, N.; LENNEN, R. M. Thermodynamic quantities for the ionization reations of buffers. **J Phys Chem**, v. 31, n. 2, p. 232-370, 2002.

GOLIČNIK, M. Exact and approximate solutions for the decades-old Michaelis-Menten equation: Progress-curve analysis through integrated rate equations. **Biochem Mol Biol Edu**, v. 39, n. 2, p. 117-125, 2011.

GOLIČNIK, M. Estimation of kinetic parameters for enzyme-inhibition reaction models using direct time-dependent equations for reactant concentrations. **Acta Chim Slov**, v. 59, p. 207-211, 2012.

GOLIČNIK, M. The integrated Michaelis-Menten rate equation: déjà vu ou vu jàdé? **J Enz Inhib Med Chem**, v. 28, n. 4, p. 879-883, Apr 2013.

GOUDAR, C. T.; SONNAD, J. R.; DUGGLEBY, R. G. Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. **Biochem Biophys Acta**, v. 1429, p. 377-383, 1999.

GOULART, R. R. **Otimização do flavonoide tilirosídeo como inibidor da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 161. 2012.

GRANT, D. J.; DIXON, D. A. Heats of formation and bond energies of the H(3-n)BX_n compounds for (X = F, Cl, Br, I, NH₂, OH, and SH). **J Phys Chem**, v. 113, p. 777-787, 2009.

HASTINGS, F. L. et al. Carbaryl: a review of its use against bark beetles in coniferous forests in North America. **Environ Entomol**, v. 30, n. 5, p. 803-810, 2001.

HAYNES, W. M. (Ed.). **CRC Handbook of chemistry and physics**. 93rd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012-2013.

HEUCKEROTH, R. O.; GLASER, L.; GORDON, J. I. Heteroatom-substituted fatty acid analogs as substrates for N-myristoyltransferase: An approach for studying both the enzymology and function of protein acylation. **Proc Natl Acad Sci**, v. 85, p. 8795-8799, Dec 1988.

HOMMES, F. A. The integrated Michaelis-Menten equation. **Arch Biochem Biophys**, v. 96, p. 28-31, 1962.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology - The Gold Book**. 2nd. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

IUPAC. **Glossary of terms relating to pesticides**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 2014. 2123 p.

KAKKAR, T.; BOXAMBAUM, H.; MAYERSOHN, M. Estimation of K_i in a competitive enzyme-inhibition model: Comparisons among three methods of data analysis, v. 27, n. 6, p. 756-762, Mar 1999.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emerg Med Clin N AM**, v. 33, p. 133-151, 2015.

KOMERS, K.; ČEGAN, A.; LINK, M. Kinetics and mechanism of hydrolysis of acetylcholine by butyrylcholine esterase. **Z Naturforsch C**, v. 57, n. 11-12, p. 1072-1077, 2002.

KUZMIĆ, P. Application of the Van Slyke–Cullen irreversible mechanism in the analysis of enzymatic progress curves. **Anal Biochem**, v. 394, p. 287-289, 2009.

LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. **Biocalorimetry 2 – Applications of calorimetry in biological sciences**. 1st. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2004.

LAVOISIER, A. L.; LAPLACE, P. S. **Memoire sur la Chaleur**. [S.l.]: [s.n.], 1783. 355 p.

LEATHERBARROW, R. Using linear and non-linear regression to fit biochemical data. **Trends Biochem Sci**, v. 15, n. 12, p. 455-458, 1990.

LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Biophys Meth**, v. 11, p. 560-566, 2001.

LESKOVAC, V. **Comprehensive enzyme kinetics**. [S.l.]: Springer Science & Business, 2003.

LEVINE, R. D. **Molecular Reaction Dynamics**". 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

LINDGREN, B. et al. Acetylcholinesterase inhibition by sulphur and selenium heterosubstituted isomers of N,N-diethylcarbamyl choline and carbaryl. **J Enzyme Inhibition**, v. 1, p. 1-11, 1985.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constant. **J Am Chem Soc**, v. 56, p. 658-666, Mar 1934.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: AS-PTA, 2011. 190 p.

LONHIENNE, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. **Biochim Biophys Acta**, v. 1543, p. 1-10, Sep 2000.

LOW, P. S.; BADA, J. L.; SOMERO, G. N. Temperature adaptation of enzymes: Roles of the free energy, the enthalpy, and the entropy of activation. **Proc Nat Acad Sci**, v. 70, n. 2, p. 430-432, Feb 1973.

MAVROVOUNIOTIS, M. L. Estimation of standard Gibbs energy changes of biotransformations. **J Biol Chem**, v. 266, n. 22, p. 144440-14445, August 1991.

MELO, M. I. A. **Avaliação da genotoxicidade do herbicida nicosulfuron em células da linhagem U-937**. 2012. 58f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Feral de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2012.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochem Z**, v. 49, p. 333-369, 1913.

MICROCAL. **VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual**. MAU130030 Rev. E. [S.l.]: [s.n.]. p. 95.

MIYAZAWA, A.; FUJIYOSHI, Y.; UNWIN, N. Structure and gating mechanism of the nicotinic receptor pore. **Nature**, v. 423, p. 949-955, Jun 2003.

MURPHY, S.; LAWVERYS, R.; CHEERER, K. Comparative anticholinesterase action of organophosphates insecticides in vertebrates. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 12, p. 22-35, 1968.

NIMMO, I. A.; ATKINS, G. L. A comparison of two methods for fitting the integrated Michaelis-Menten equation. **Biochem J**, v. 141, p. 913-914, 1974.

NORTHROP, D. B. On the meaning of K_m and V/K in enzyme kinetics. **J Chem Ed**, v. 75, n. 9, p. 1153-1157, 1998.

O'BRIEN, R. D.; HILTON, B. D.; GILMOUR, L. The reaction of carbamates with cholinesterase. **Mol Pharmacol**, v. 2, p. 593-606, 1966.

PEDLOWSKI, M. A. et al. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protec**, v. 31, n. 1, p. 113-118, Jan 2012.

PERRIER, A. L.; MASSOULIÉ, J.; KREJCI, E. PRiMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v. 33, p. 275-285, 2002.

PETERS, J. et al. Activity and molecular dynamics relationship within the family of human cholinesterases. **Phys Chem Chem Phys**, v. 14, p. 6764-6770, 2012.

PIEKLIK, J. R.; GUYNN, R. W. Equilibrium Constants of the Reactions of Choline Acetyltransferase, Carnitine Acetyltransferase, and Acetylcholinesterase under Physiological Conditions. **J Biol Chem**, v. 250, n. 12, p. 4445-4450, 25 Jun 1975.

POHANKA, M. et al. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. **Mol Sci**, v. 12, p. 2631-2640, 2011.

PRYOR, A. N. et al. Simple general acid-base catalysis of physiological acetylcholinesterase reactions. **J Am Chem Soc**, v. 114, p. 3896-3900, 1992.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chem Rev**, Michigan, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.

RAND, J. Acetylcholine. **WormBook**: The online review of *C. elegans* biology, 2007. Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.html>. Acesso em: 19 Janeiro 2014.

RENDINA, G. **Experimental Methods in Modern Biochemistry**. 1^a. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1976.

RIENER, C. K.; KADA, G.; GRUBER, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-ditiopiridina. **Anal Bioanal Chem**, v. 373, p. 266-276, 2002.

RITCHIE, R. J.; PRVAN, T. Current statistical methods for estimating K_m and V_{max} of Michaelis-Menten kinetics. **Biochem Edu**, v. 24, n. 4, p. 196-206, 1996.

ROSENBERRY, T. L.; NEUMANN, E. Interaction of ligands with acetylcholinesterase use of temperature-jump relaxation kinetics in the binding of specific fluo-fluorescent ligand. **Biochem**, v. 16, p. 3870-3877, 1977.

ROTUNDO, R. L. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. **J Neurocytol**, v. 32, p. 743-766, 2003.

SANDERSON, R. T. Radical reorganization and bond energies in organic molecules. **J Org Chem**, v. 47, p. 3835-3539, 1982.

SCHNELL, S.; MAINI, P. K. Enzyme Kinetics at High Enzyme Concentration. **Bull Math Biol**, v. 62, p. 483-499, 2000.

SCHNELL, S.; MENDOZA, C. Closed form solution for time-dependent enzyme kinetics. **J theor Biol**, v. 187, p. 207-212, 1997.

SEGEL, I. H. **Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme system**. 2^a. ed. New York: John Wiley & sons, 1993.

SEGEL, L. A. On the validity of the kinetic steady state assumption of enzyme reactions. **Bull Math Biol**, v. 50, n. 6, p. 579-593, 1988.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma-Aldrich**, 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em: 19 Janeiro 2015.

SOLOMONS, T. W. G.; FEYHLE, C. G. **Química Orgânica**. 10^a. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. I, 2012.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nature**, v. 2, p. 294-302, Apr 2001.

TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme kinetics? **Anal Biochem**, v. 296, p. 179-181, 2001.

TSENG, S.; HSU, J. P. A comparison of the parameter estimating procedures for the Michaelis-Menten model. **J Theor Biol**, v. 145, p. 457-464, Mar 1990.

WADSÖ, I.; GOLDBERG, R. N. Standards in isothermal calorimetry: IUPAC Technical Report. **Pure Appl Chem**, v. 73, n. 10, p. 1625-1639, 2001.

WIGGERS, H. J. **Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria**. Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 86. 2007.

WILSON, I. B.; CABIB, E. Acetylcholinesterase: enthalpies and entropies of activation. **J Am Chem Soc**, v. 78, n. 1, p. 202-207, 1956.

WILSON, I. B.; HARRISON, M. A. Turnover number of acetylcholinesterase. **J Biol Chem**, v. 236, n. 8, p. 2292-2295, 1961.

WOLFENDEN, R. Transition state analog inhibitors and enzyme catalysis. **Annu Rev Biophys Bioeng**, v. 5, n. 1, p. 271-306, 1976.

WOLFENDEN, R.; YUAN, Y. The “neutral” hydrolysis of simple carboxylic esters in water and the rate enhancements produced by acetylcholinesterase and other carboxylic acid esterases. **J Am Chem Soc**, v. 133, p. 13821-13823, Jul 2011.

XU, Z. et al. Monitoring enzyme reaction and screening of inhibitors of acetylcholinesterase by quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform Mass Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom**, v. 19, p. 1849-1855, 2008.

ZIMMERMANN, H.; DENSTON, C. R. REcycling of synaptic vesicles in the cholinergic synapses of the Torpedo electric organ during induced transmitter release. **Neurosci**, v. 2, p. 695-714, 1977.