

## **Análisis Informático de Cinética Enzimática por medio de macros de MsExcel**

Carlos Ernesto<sup>1</sup> Maldonado L., José Fernando<sup>2</sup> Giraldo J., Nelson<sup>1</sup> Fernández P., Alfonso Quijano P<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Pamplona. Facultad de Ciencias Básicas Instituto de Investigaciones Biomédicas. Maestría de Biología Molecular y Biotecnología. alquiparra@unipamplona.edu.co

<sup>2</sup> Coordinador climatología del programa e-learning. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigación en Química.

### **ABSTRACT**

By means of the automation of a leaf of calculation of MsExcel administered through macros written in language VBA, you design a routine that allows, starting from rehearsals of reactions enzymatics, to evaluate the speed of the reaction at one time and to so much different concentrations of the substratum like of the inhibitor.

Initially the logarithmic tendency was evaluated from the data to the graphic the speed against the concentration of the substratum like an initial approach for the acceptance of the patter of the Michaelis-Menten.

When the data fulfilled this supposition you proceeded to their transformation, with the purpose of linear and graphic according to the models of Lineweaver- Burk, Eadie-Hofstee and the coordinates of Woolf.

### **KEY WORDS**

Enzymatic Kinetics , Michaelis-Menten , Lineweaver-Burk , Eadie-Hofstee, the Coordinates of Woolf, MsExcel.

### **RESUMEN**

Mediante la automatización de una hoja de cálculo de MsExcel administrada a través de macros escritos en lenguaje VBA, se diseño una rutina que permite, a partir de ensayos de reacciones fermentativas, evaluar la velocidad de la reacción en un tiempo y a diferentes concentraciones tanto del sustrato como del inhibidor. Inicialmente se evaluó la tendencia logarítmica de los datos al graficar la velocidad contra la concentración del sustrato como un criterio inicial para la aceptación del modelo de Michaelis-Menten. Cuando los datos cumplieron con este supuesto, se procedió a su transformación, con el fin de linealizarlos y graficarlos según los modelos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y las coordenadas de Woolf. Para todas las gráficas se aplico a cada serie correspondiente a una concentración del inhibidor, análisis de regresión lineal simple, y a partir del modelo matemático de cada caso, se obtuvieron los valores de pendiente, intercepto e intersección. Con estos valores se

calcularon los parámetros cinéticos de tasa limitante de la reacción ( $V_0$ ), velocidad máxima ( $V_{max}$ ), velocidades aparentes ( $V_p$ ), concentración del sustrato a la cual  $V_0$  es igual a la mitad de la  $V_{max}$  o constante de Michaelis ( $K_m$ ) y sus valores aparentes para las diferentes concentraciones de inhibidor ( $K_p$ ) y las constantes de inhibición ( $K_i$ ). Así, a partir de los resultados generados por el programa es posible determinar el tipo de inhibición que presenta la reacción evaluada, entre los que están comportamientos de inhibición competitiva, no competitiva, acompetitiva y mixto.

## PALABRAS CLAVES

Cinética Enzimática, Michaelis-Menten, Bioinformática, MsExcel.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas vivos dependen de las reacciones químicas que ocurren en ellos, tales reacciones por sí mismas pueden ocurrir a tasas muy bajas. Las enzimas son herramientas moleculares, de alta especificidad, que determinan los patrones de las transformaciones químicas, reduciendo la energía de activación requerida para que ocurran las reacciones, y haciendo que ellas ocurran a niveles útiles para la célula. (Berg *et al.*, 2002).

Dentro del estudio de las enzimas, la cinética de reacciones fermentativas o cinética enzimática es la rama que estudia los factores que afectan la velocidad de este tipo de reacciones. Dentro de los factores de mayor importancia dentro de la cinética enzimática se encuentran la concentración de las enzimas, sustratos, productos, inhibidores y activadores, además del pH, la fuerza iónica y la temperatura en la que se lleve la reacción. El análisis de estos factores permite conocer datos sobre la reacción catalizada enzimáticamente.

Mediante la variación de las concentraciones del sustrato y del producto es posible deducir el mecanismo cinético y las concentraciones intracelulares de estos compuestos al igual que la dirección fisiológica de la reacción, indicando además la forma en que la enzima se regula *in vivo*. Por medio del análisis cinético es posible obtener modelos que expliquen la reacción catalizada enzimáticamente, además de la determinación de las ecuaciones de velocidad del modelo idóneo que pueda ser probado experimentalmente. (Segel, 1982).

Partiendo de los datos de concentración inicial del sustrato junto con la velocidad inicial de la reacción, puede analizarse los datos siguiendo el modelo de Michaelis-Menten. Al incluir la variable concentración de inhibidor el comportamiento cinético puede ser analizado siguiendo los modelos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y coordenadas de Wolf, los cuales aplican transformación de los datos para su linealización, siendo posible entonces por medio de análisis gráfico y matemático calcular los parámetros

cinéticos de la reacción. (Segel, 1982; Berg *et al.*, 2002; Kart, 1998; Schulz, 1994).

A partir de esta información se diseñó una rutina mediante la automatización de una hoja de cálculo de MsExcel administrada a través de macros escritos en lenguaje VBA. Aunque existen en el mercado actual algunos programas para el análisis de cinética enzimática como el Enzyme Kinetics!Pro (ChemSW, Inc.; <http://www.chemistry-software.com>) o el Curvefit (GraphPad Software, Inc.), la rutina diseñada es una alternativa ágil y sencilla, adecuada a las necesidades actuales de investigadores, docentes y alumnos que puede ser utilizada en análisis de reacciones fermentativas en laboratorios de Bioquímica. Cabe destacar que su continuará por el grupo de Bioinformática de nuestra Universidad de Pamplona.

## ASPECTOS METODOLÓGICOS

La rutina está diseñada para correr como macro de MsExcel bajo plataforma Windows (© Microsoft Corporation), administrada a través de macros escritos en lenguaje VBA. Aprovechando la amplia distribución del software y que gran cantidad de usuarios se encuentran ya familiarizados con su entorno.

Para la descripción del programa utilizaremos como ejemplo los resultados de pruebas de la hidrólisis de la butirilcolina, catalizada por la colinesterasa utilizando cuatro concentraciones del inhibidor benzoato 1,2,5-trimetilpiperidol-4 (Isomero Beta). El experimento utilizó buffer fosfato (0,001 M) y la  $[E_0] = 2,16 \times 10^{-6}$  M. (Quijano, 2004. comunicación personal).

## DESCRIPCIÓN DE LA RUTINA

El ingreso de los datos se hace sobre la hoja de cálculo iniciando en la posición A3 con la concentración de inhibidor utilizada, ubicando en la columna B la concentración del sustrato y la velocidad obtenida (Figura 1).

El evento click sobre la barra de botones ubicados en la fila uno entre las columnas A a la H, generará las transformaciones requeridas para cada uno de los modelos, que podrán ser aplicados siempre y cuando el comportamiento de la reacción se ajuste al modelo de Michaelis-Menten, teniendo como criterio inicial la grafica, el modelo logarítmico y el ajuste de los datos al modelo dado por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) generados después del evento click sobre el botón Michaelis-Menten. Los resultados aparecen tanto en la grafica como en las celdas E3:G3. (Figura 1).



Figura 1. Pantalla de Ingreso de datos.

Las series de datos pueden analizarse por tres modelos, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Coordenadas de Woolf. Para cada uno se generan los datos por medio de regresión lineal simple y se obtienen los valores de pendiente, intercepto e interfecto, indicando exactamente los puntos de corte sobre los ejes de cada recta generada. Con estos valores se calcularon los parámetros cinéticos de tasa limitante de la reacción ( $V_o$ ), velocidad máxima

( $V_{max}$ ), velocidades aparentes ( $V_p$ ), concentración del sustrato a la cual  $V_o$  es igual a la mitad de la  $V_{max}$  o constante de Michaelis ( $K_m$ ) y sus valores aparentes para las diferentes concentraciones de inhibidor ( $K_p$ ) y las constantes de inhibición ( $K_i$ ). Los parámetros de Michaelis corresponden a la operación de los datos cuando la concentración del inhibidor es igual a cero.

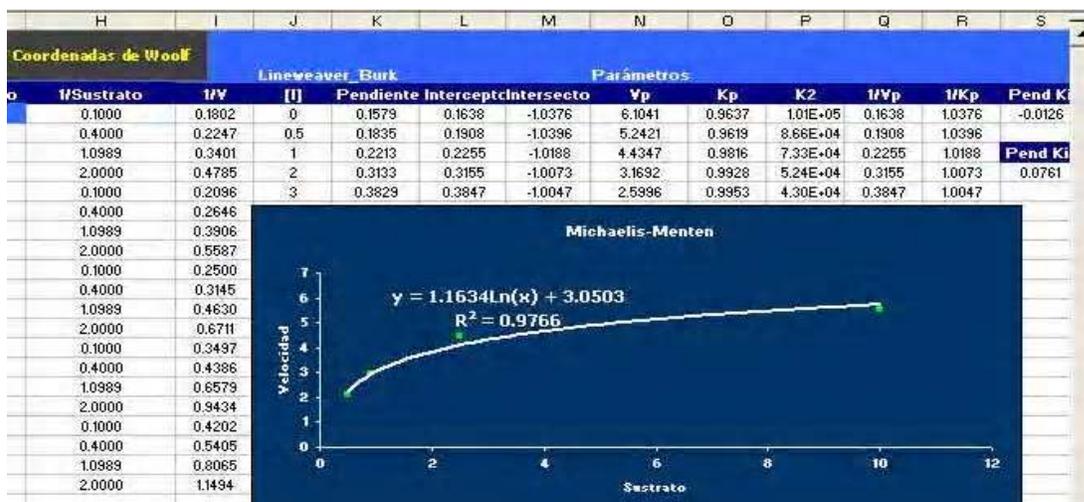


Figura 2. Salida numérica de los resultados para la transformación por Lineweaver-Burk y grafica para la tendencia logarítmica de Michaelis-Menten.

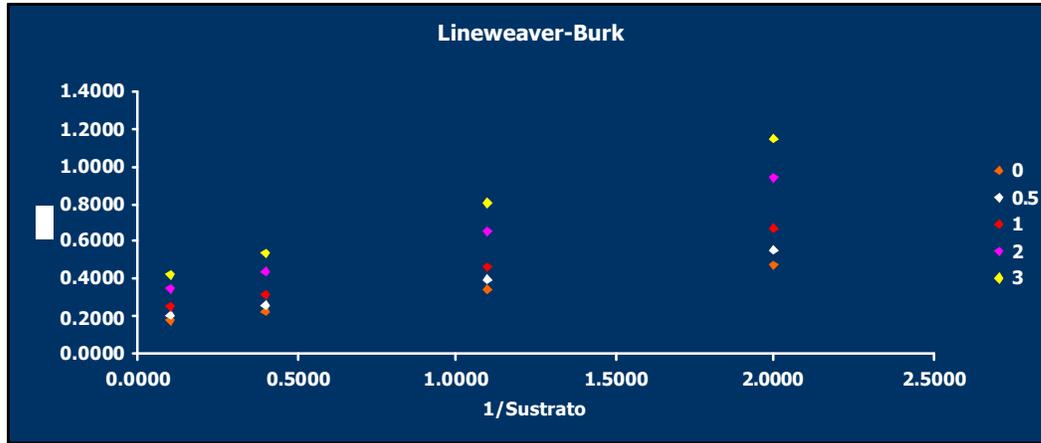


Figura 3. Salida grafica de los resultados para la transformación por Lineweaver-Burk.

Se generan también tres graficas para cada modelo, la primera donde los datos linealizados, con tantas series como concentraciones de inhibidor se tengan, al igual que las graficas de las constantes de inhibición  $K_i$  y  $K_i'$ , útiles en la determinación de inhibición mixta.

Para la introducción de otras series de datos, los valores presentes en la hoja de cálculo simplemente se reemplazan por los nuevos en las tres columnas iniciales, de la forma y orden que se indicó anteriormente.

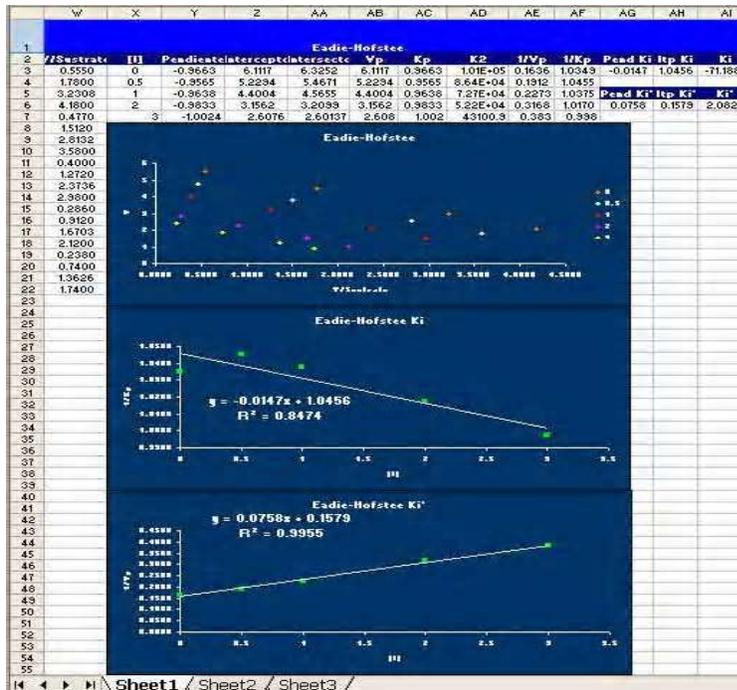


Figura 4. Salida numérica y grafica de los resultados para la transformación por Eadie-Hofstee.

Debido a la compatibilidad de MsExcel con otros programas del paquete informático MsOffice, los datos pueden ser trasladados fácilmente en formato de tabla y gráficos a procesadores de texto como MsWord o presentaciones de MsPowerPoint, entre otros programas que corren sobre Windows.

El desarrollo de esta rutina permite entonces el procesamiento inicial de datos de evaluación cinética de reacciones fermentativas de forma rápida y fácil, como herramienta para su análisis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. (Eds.). 2002. Biochemistry 5<sup>th</sup> Edition. W.H. Freeman and Company. New York. p. 189-229.
2. KART, G. Biología Celular y Molecular. Utilización de la Información genética: de la transcripción a la traducción. McGraw Hill-Interamericana. 1998. pp. 179-201.
3. QUIJANO P., A. 2004. Análisis de reacciones fermentativas. Notas de clase, Maestría en biología Molecular y Biotecnología. Universidad de Pamplona. Pamplona, marzo de 2004.
4. SCHULZ, A. R. 1994. Enzyme kinetics. Cambridge University Press. Cambridge. 256 p.
5. SEGEL, I.H. 1982. Cálculos de bioquímica 2a edición. Editorial Acribia. Isla de Mallorca. p. 275-413.