

**UM MODELO PARA REAÇÕES ENZIMÁTICAS;
TRATAMENTO POR MÉTODOS ASSINTÓTICOS.**

Luiz Alberto Díaz Rodrigues
ICEN-UNIJUÍ/RS

Wilson Castro Ferreira Júnior
IMECC-UNICAMP/SP

**UM MODELO PARA REAÇÕES ENZIMÁTICAS;
TRATAMENTO POR MÉTODOS ASSINTÓTICOS.**

Luiz Alberto Díaz Rodrigues

ICEN-UNIJUÍ/RS

Wilson Castro Ferreira Júnior

IMECC-UNICAMP/SP

RESUMO

Neste trabalho, tratamos as equações que descrevem o mecanismo básico de reações enzimáticas proposto por Michaelis-Menten e amplamente utilizado em Bioquímica. O modelo matemático da cinética de reação constitui-se de um sistema de duas equações diferenciais ordinárias não lineares. Nas diversas formas de adimensionalização deste sistema aparece um pequeno parâmetro multiplicando a derivada em uma das equações, o que caracteriza um problema clássico de Perturbação Singular. Analisamos as equações na formulação adimensional obtida por Segel (1988,1989) fazendo uso da teoria de Perturbação Singular desenvolvida por A. B. Vasil'eva. A expansão calculada até a primeira ordem produz uma excelente aproximação analítica da solução no intervalo $[0,T]$.

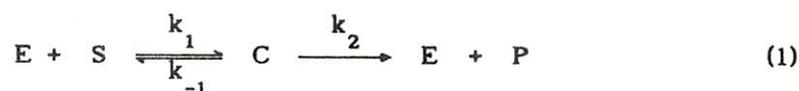
1. Introdução

Nos sistemas biológicos, as reações químicas quase sempre envolvem proteínas específicas chamadas enzimas, as quais atuam como eficientes catalisadores. As enzimas reagem seletivamente com certas substâncias chamadas substratos. Uma característica importante do catalisador é permanecer inalterado no final da reação, o que possibilita sua reutilização. Além disso, as enzimas apresentam excepcional eficiência, isto é, uma pequena quantidade de enzimas é suficiente para transformar grandes quantidades de substrato durante uma determinada reação. [Uma única molécula de enzima pode transformar de 10^3 a 10^6 moléculas de substrato por minuto].

A participação ativa das enzimas como reguladores em processos biológicos e sua crescente utilização industrial justificam um estudo cada vez mais aprimorado de suas propriedades. Para isto é fundamental a compreensão da cinética enzimática, a qual analisa principalmente a velocidade de reações e o comportamento temporal dos vários reagentes envolvidos.

2. Cinética enzimática: as equações de Michaelis-Menten

Neste trabalho, discutiremos um modelo simples do mecanismo que representa um grande número de reações enzimáticas, proposto por Michaelis-Menten em 1913. Consideremos então uma reação enzimática onde uma enzima (E) combina-se com um único substrato (S) para formar inicialmente o complexo enzima-substrato (C). Nesta forma intermediária o substrato modifica-se e o complexo decompõe-se em enzima livre e produto



Quando uma enzima é misturada com um considerável excesso de substrato, há um período inicial rápido conhecido como

pré-estado estacionário durante o qual a enzima é "carregada" com o substrato. Após este período, um estado quase-estacionário é estabelecido durante o qual a concentração do complexo modifica-se lentamente. Em uma primeira aproximação da cinética da reação os bioquímicos invariavelmente desprezam a fase inicial rápida. No entanto, o mecanismo de reação é efetivamente deflagrado nesta fase e qualquer controle do fenômeno deve ser exercido nela. Esta é a motivação básica para o estudo da fase transiente do ponto de vista bioquímico. [3]

A reação enzimática (1) é modelada matematicamente por equações diferenciais ordinárias como um processo químico homogêneo de mistura perfeita. Estas equações apresentam uma estrutura de perturbação singular, que representa um fenômeno de camada limite (que corresponde à fase transiente inicial rápida), estudado recentemente por métodos assintóticos. Heineken et al. (1967) usaram métodos de perturbação singular com relação ao pequeno parâmetro $\epsilon = E_0/S_0$ que aparece na formulação adimensional do sistema para obter uma aproximação analítica da solução (E_0 e S_0 representam as concentrações iniciais de enzima e substrato, respectivamente). Trabalhos recentes de Segel (1988) e Segel-Slemrod (1989) propõem uma nova adimensionalização que produz um parâmetro de perturbação modificado $\mu = E_0/[S_0 + k^{-1}(k_{-1} + k_2)]$. Este parâmetro permite uma aplicação mais geral da hipótese de estado quase estacionário, pois $\mu < \epsilon$ e há casos, "in vivo" por exemplo, em que $\epsilon \sim 1$ enquanto $\mu \ll 1$.

Vamos considerar aqui as equações adimensionais obtidas por Segel,

$$\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= (K + 1) \left[-(\sigma + 1)s + \sigma sc + \frac{K}{K + 1} c \right] \\ \mu \frac{dc}{dt} &= (K + 1) \left[\frac{s}{\sigma + 1} - \sigma sc - c \right] \end{aligned} \quad (2)$$

juntamente com as condições iniciais adimensionalizadas $s(0) = 1$, $c(0) = 0$.

O sistema de equações (2) não possui uma solução

analítica exata em termos de funções elementares. O fato de $0 < \mu \ll 1$ (tipicamente, $10^{-7} \leq \mu \leq 10^{-2}$) multiplicar dc/dt na segunda equação, caracteriza um problema de perturbação singular e sugere um método de aproximação assintótica. Segel e Slemrod (1989) usaram o método heurístico de construção de uma aproximação assintótica denominado "matching". Neste trabalho utilizaremos a Teoria de Perturbação Singular desenvolvida por Vasil'eva [10], Hoppensteadt [5], O'Malley [7] e outros para analisar o problema (2). É importante observar ainda que, do ponto de vista numérico, o problema é fortemente rígido ("stiff"), e portanto, não trivial; uma situação freqüente em modelos matemáticos de cinética química, que vêm sendo tratados intensivamente nos últimos anos. [1], [2].

3. Método de Vasil'eva-Hoppensteadt-O'Malley

3.1 Descrição do Método

Consideremos o sistema de equações diferenciais (2). Fazendo $\mu = 0$ obtemos um sistema não perturbado ou sistema degenerado, como é conhecido na teoria de perturbação singular. Assim, temos

$$\frac{d\bar{s}}{dt} = (K + 1) \left[-(\sigma + 1)\bar{s} + \sigma\bar{s}\bar{c} + \frac{K}{K + 1}\bar{c} \right] \quad (3)$$

$$0 = (K + 1) \left[(\sigma + 1)\bar{s} - \sigma\bar{s}\bar{c} - \bar{c} \right]$$

Para resolver este sistema, devemos inicialmente solucionar a segunda equação a qual é uma equação algébrica em relação a \bar{c} que é algébrica e tem uma única solução:

$$\bar{c}(t) = \frac{(\sigma + 1)\bar{s}}{\sigma\bar{s} + 1} \quad (4)$$

Substituindo na primeira equação de (3) obtemos

$$\frac{d\bar{s}}{dt} = \frac{-(\sigma + 1)\bar{s}}{\sigma\bar{s} + 1} \quad (5)$$

Para determinar $\bar{s}(t)$ de forma única devemos considerar a condição inicial relacionada a $s(t)$. Desta maneira obtemos uma expressão implícita para $\bar{s}(t)$ dada por

$$\sigma\bar{s} + \ln \bar{s} = -(\sigma + 1)t + \sigma \quad (6)$$

Em seu trabalho, A.B. Vasil'eva mostra que um problema do tipo (2) tem solução em $[0, T]$ e que

$$\lim_{\mu \rightarrow 0} s(t, \mu) = \bar{s}(t) \text{ para } 0 \leq t \leq T \quad (7)$$

$$\lim_{\mu \rightarrow 0} c(t, \mu) = \bar{c}(t) \text{ para } 0 < t \leq T \quad (8)$$

onde $\bar{s}(t)$ é a solução do problema degenerado (3).

É importante observar que o limite em (8) é pontual em $[0, T]$. Em uma vizinhança de $t=0$ existe uma região na qual a solução $c(t, \mu)$ do problema (2) difere drasticamente da solução do problema degenerado $\bar{c}(t)$ pois a condição inicial de (2) $c(0, \mu) = 0$ não é satisfeita por $\bar{c}(t)$, a saber $\bar{c}(0) = 1$. Esta região é conhecida como camada limite.

A fim de examinar este fato consideremos agora uma vizinhança do ponto $t=0$. Introduzindo a mudança de variável $\tau = t/\mu$ e fazendo as transformações $S(\tau, \mu) = s(t, \mu)$ e $C(\tau, \mu) = c(t, \mu)$ as equações em (2) tornam-se

$$\begin{aligned} \frac{dS}{d\tau} &= \mu(K + 1) \left[-(\sigma + 1)S + \sigma SC + \frac{K}{K + 1} C \right] \\ \frac{dC}{d\tau} &= (K + 1) \left[(\sigma + 1)S - \sigma SC + C \right] \end{aligned} \quad (9)$$

com as condições iniciais $S(0) = 1$, $C(0) = 0$.

Em um intervalo finito de τ , este sistema pode ser interpretado como um sistema com perturbação regular. O sistema

não perturbado associado ou seja, a equação para termos de ordem zero da expansão de $(S(\tau, \mu), C(\tau, \mu))$ em potências de μ , é da forma

$$\begin{aligned} \frac{dS_0}{d\tau} &= 0 \\ \frac{dC_0}{d\tau} &= (K + 1) \left[(\sigma + 1)S_0 - \sigma S_0 C_0 - C_0 \right] \end{aligned} \quad (10)$$

Portanto, $S_0(\tau) = 1$, enquanto que

$$\frac{dC_0}{d\tau} = (K + 1)(\sigma + 1) [1 - C_0], \quad C_0(0) = 0. \quad (11)$$

A teoria de perturbação regular nos garante então o seguinte limite uniforme em relação a τ em um intervalo fechado

$$\begin{aligned} \lim_{\mu \rightarrow 0} S(\tau, \mu) &= 1 \\ \lim_{\mu \rightarrow 0} C(\tau, \mu) &= C_0(\tau) \end{aligned} \quad (12)$$

3.2 Expansão Assintótica da Solução do Problema

Com base nas considerações acima, escrevemos a solução de (2) na forma:

$$s(t, \mu) = \bar{s}(t) + r_1(t, \mu)$$

$$c(t, \mu) = \bar{c}(t) + r_2(t, \mu)$$

Por (8) sabemos que o resto $r_2(t, \mu)$ não é $O(\mu)$ uniformemente em $[0, T]$. Se adicionarmos a diferença $C_0(\tau) - \bar{c}(0)$ a $\bar{c}(t)$ obteremos

$$c(t, \mu) = \bar{c}(t) + C_0(\tau) - \bar{c}(0) + r_3(t, \mu)$$

onde $r_3(t, \mu) \rightarrow 0$ uniformemente em $[0, T]$ para $\mu \rightarrow 0$.

A diferença $C_0(\tau) - \bar{c}(0)$ desempenha o papel de correção da condição inicial que não é satisfeita por $\bar{c}(t)$. A expressão $\bar{c}(t) + C_0(\tau) - \bar{c}(0)$ satisfaz a condição inicial para $t=0$. Ainda mais, pode-se mostrar que

$$r_1(t, \mu) = O(\mu) \quad \text{e} \quad r_3(t, \mu) = O(\mu), \text{ uniformemente em } [0, T].$$

Na verdade, é possível construir uma representação assintótica para a solução de (2) com erro uniforme em $t \in [0, T]$ de $O(\mu^{n+1})$. Nesta representação, além dos termos de potência de μ (próprios de uma expansão regular) aparecem certas funções (termos de correção) nas quais μ aparece de maneira não-polinomial. Os termos de correção são significativos dentro da camada limite (vizinhança de $t=0$) e decrescem rapidamente com o crescimento de t . A diferença $C_0(\tau) - \bar{c}(0)$ é um termo de correção na aproximação assintótica com resto de $O(\mu)$.

Teorema.

Consideremos o problema de Cauchy

$$\frac{dx}{dt} = f(x, y), \quad x(0, \mu) = x_0,$$

$$\frac{dy}{dt} = g(x, y), \quad y(0, \mu) = y_0,$$

sob as seguintes condições:

1. Existe uma solução contínua $(\bar{x}(t), \bar{y}(t))$ do problema degenerado (que se obtém fazendo-se formalmente $\mu = 0$ no sistema acima) no intervalo $[0, T]$.
2. As funções f e g têm todas as derivadas contínuas em uma vizinhança de $(\bar{x}(t), \bar{y}(t))$, $0 \leq t \leq T$.
3. $\frac{\partial g}{\partial y}(\bar{x}(t), \bar{y}(t)) < -\delta < 0$ para $t \in [0, T]$.

4. $\frac{\partial g}{\partial y}(\bar{x}, \lambda) < -\delta < 0$ para todo λ entre \bar{y} e $\bar{y}(0)$.

Então existe $\mu_0 > 0$ e uma única solução $(x^{(u)}(t, \mu), y^{(u)}(t, \mu))$ do problema para $0 < \mu \leq \mu_0$, $t \in [0, T]$ que pode ser escrita como soma de uma solução exterior $(x(t, \mu), y(t, \mu))$ e uma solução interior $(X(\tau, \mu), Y(\tau, \mu))$ ($\tau = t/\mu$)

$$\begin{aligned}x^{(u)}(t, \mu) &= x(t, \mu) + X(\tau, \mu) \\y^{(u)}(t, \mu) &= y(t, \mu) + Y(\tau, \mu)\end{aligned}$$

e as soluções exterior e interior podem ser expressas como

$$x(t, \mu) = \sum_{k=0}^R \mu^k x_k(t) + O(\mu^{R+1})$$

$$y(t, \mu) = \sum_{k=0}^R \mu^k y_k(t) + O(\mu^{R+1})$$

e

$$X(\tau, \mu) = \sum_{k=0}^R \mu^k x^{(k)}(\tau) + O(\mu^{R+1})$$

$$Y(\tau, \mu) = \sum_{k=0}^R \mu^k y^{(k)}(\tau) + O(\mu^{R+1})$$

uniformemente em $0 \leq t \leq T$.

Passemos então à construção de uma expansão formal em séries para a solução de (2). A solução exterior deve ter uma expansão da forma

$$\begin{aligned}s(t, \mu) &= s_0(t) + s_1(t) \mu + O(\mu^2) \\c(t, \mu) &= c_0(t) + c_1(t) \mu + O(\mu^2)\end{aligned}\tag{13}$$

Substituindo estas expressões em (2) obtemos, por

diferenciação sucessiva com respeito a μ , as equações para os coeficientes em (13). Para ilustrar o método vamos calcular os coeficientes até a primeira ordem. Então,

$$\frac{ds_0}{dt} = (K + 1) \left[-(\sigma + 1)s_0 + \sigma s_0 c_0 + \frac{K}{K + 1} c_0 \right] \quad (14)$$

$$0 = (K + 1) \left[(\sigma + 1)s_0 - \sigma s_0 c_0 - c_0 \right]$$

$$\frac{ds_1}{dt} = (K + 1) \left[-(\sigma + 1)s_1 + \sigma s_0 c_1 + \frac{K}{K + 1} c_1 + \sigma s_1 c_0 \right] \quad (15)$$

$$\frac{dc_0}{dt} = (K + 1) \left[(\sigma + 1)s_1 - \sigma s_0 c_1 - c_1 - \sigma s_1 c_0 \right]$$

Até aqui não fica claro que condições iniciais devem ser associadas com (14) e (15) pois estamos considerando as equações exteriores, ou seja, fora da camada limite.

A seguir, consideraremos a variável de "variação rápida" $\tau = t/\mu$ e introduzimos uma modificação na expansão (13) de modo a levar em conta a mudança inicial rápida na solução. Procuraremos expansões para a solução de (2) na forma

$$\begin{aligned} s^{(u)}(t, \mu) &= [s_0(t) + s^{(0)}(\tau)] + [s_1(t) + s^{(1)}(\tau)] \mu + O(\mu^2) \\ c^{(u)}(t, \mu) &= [c_0(t) + c^{(0)}(\tau)] + [c_1(t) + c^{(1)}(\tau)] \mu + O(\mu^2) \end{aligned} \quad (16)$$

Os coeficientes satisfazem

$$s_0^{(0)}(0) + s^{(0)}(0) = 1, \quad s_n^{(0)}(0) + s^{(n)}(0) = 0 \quad (n = 1, 2, \dots), \quad (17)$$

$$c_n^{(0)}(0) + c^{(n)}(0) = 0 \quad (n = 0, 1, 2, \dots)$$

e

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} s^{(n)}(\tau) = 0, \quad \lim_{\tau \rightarrow \infty} c^{(n)}(\tau) = 0 \quad (18)$$

para $n = 0, 1, 2, \dots$

Com a mudança de variável $\tau = t/\mu$, (2) torna-se

$$\frac{ds}{d\tau} = \mu (K + 1) \left[-(\sigma + 1)s + \sigma sc + \frac{K}{K + 1} c \right] \quad (19)$$

$$\frac{dc}{d\tau} = (K + 1) \left[(\sigma + 1)s - \sigma sc - c \right]$$

$$s(0) = 1, \quad c(0) = 0$$

Agora, substituindo as expansões (16) em (19) com $t = \mu\tau$, obtemos as seguintes equações para os coeficientes:

$$\frac{ds^{(0)}}{d\tau} = 0 \quad (20)$$

$$\begin{aligned} \frac{dc^{(0)}}{d\tau} = (K + 1) [& (\sigma + 1)(s_0^{(0)} + s^{(0)}) - \\ & - \sigma(s_0^{(0)} + s^{(0)}) c_0^{(0)} - (c_0^{(0)} + c^{(0)})] \end{aligned}$$

$$\frac{ds^{(1)}}{d\tau} = -\frac{ds_0(0)}{dt} + (K+1)[-(\sigma+1)(s_0(0) + s^{(0)}) + \sigma(s_0(0) + s^{(0)})(c_0(0) + c^{(0)}) + \frac{K}{K+1}(c_0(0) + c^{(0)})] \quad (21)$$

$$\frac{dc^{(1)}}{d\tau} = -\frac{dc_0(0)}{dt} + (K+1)[(\sigma+1)(s_1(0) + s^{(1)}) - [\sigma(s_0(0) + s^{(0)}) + 1](c_1(0) + c^{(1)}) - \sigma(s_1(0) + s^{(1)})(c_0(0) + c^{(0)})]$$

Por (17) e (18) obtemos $s^{(0)}(\tau) = 0$ e, conseqüentemente, $s_0(0) = 1$, que é a condição necessária para resolver o sistema (14). A saber, encontramos diretamente de (14)

$$c_0(t) = \frac{(\sigma+1)s_0}{\sigma s_0 + 1} e^{\sigma s_0 + \ln s_0 - (\sigma+1)t + \sigma} \quad (22)$$

$$\sigma s_0 + \ln s_0 = -(\sigma+1)t + \sigma$$

as quais estão de acordo com (4) e (6), respectivamente. Para completar a aproximação de ordem zero, resolvemos a segunda equação de (20), com a condição inicial $c^{(0)}(0) = -1$ obtida de (17). Assim,

$$c^{(0)}(\tau) = -\exp [-(K+1)(\sigma+1)\tau] \quad (23)$$

Resta agora resolver as equações do sistema (21). A primeira equação de (21), após as substituições torna-se

$$\frac{ds^{(1)}}{d\tau} = -[\sigma(K+1) + K] \exp [-(K+1)(\sigma+1)\tau] \quad (24)$$

Resolvendo, temos

$$s^{(1)}(\tau) = s^{(1)}(0) + \int_0^\tau -[\sigma(K+1) + K] \exp[-(K+1)(\sigma+1)\xi] d\xi \quad (25)$$

Para garantir que a condição (18) seja satisfeita, escolhemos

$$s^{(1)}(0) = - \left[\int_0^\infty -[\sigma(K+1) + K] \exp[-(K+1)(\sigma+1)\xi] d\xi \right] \quad (26)$$

isto é,

$$s^{(1)}(0) = \frac{\sigma(K+1) + K}{(K+1)(\sigma+1)} \quad (27)$$

Portanto,

$$s^{(1)}(\tau) = \frac{\sigma(K+1) + K}{(K+1)(\sigma+1)} \exp[-(K+1)(\sigma+1)\tau] \quad (28)$$

Completamos nossa aproximação assintótica determinando a expressão para $c^{(1)}(\tau)$, a partir da segunda equação de (21).

O teorema mostra que as expressões acima são aproximações assintóticas uniformes em $[0, T]$ para a solução exata $s(t, \mu)$, $c(t, \mu)$:

$$\left| s(t, \mu) - s_1^{(u)}(t, \mu) \right| < a \mu^2 \text{ quando } 0 \leq t \leq T$$

$$\left| c(t, \mu) - c_1^{(u)}(t, \mu) \right| < b \mu^2 \text{ quando } 0 \leq t \leq T$$

para $0 < \mu \ll 1$. As constantes a e b independem de μ e t mas podem depender de T .

O modelo de cinética química abordado acima embora muito utilizado não é realista no sentido em que os reagentes são tratados como misturas homogêneas. Entretanto, um detalhado conhecimento deste caso é uma etapa indispensável para o estudo de

modelos em que a difusão desempenha um papel essencial. Os estudos em andamento sobre estes problemas, especialmente relacionados a reatores industriais com enzimas imobilizadas, serão publicados em trabalhos futuros.

4. Referências Bibliográficas

- [1] AIKEN,R.C.: Stiff Computation. Oxford University Press,1985.
- [2] DAHLQUIST,G. et alli.: Are the Numerical Methods and Software Satisfactory for Chemical Kinetics? Numerical Integration of Differential Equations. Berlin, Springer-Verlag, 1980.
- [3] FERSTH,A.: Enzyme Structure and Mechanism. New York, W.F. Freeman, 1985.
- [4] HEINEKEN,F.,TSUCHIYA,H. and ARIS,R.: On the Mathematical Status of the Pseudo-Steady State Hypothesis of Biochemical Kinetics. Math. Biosci. 1, 95-113, 1967.
- [5] HOPPENSTEADT,F.: Properties of Solutions of Ordinary Differential Equations with Small Parameters. Comm. on Pure and Applied Mathematics, XXIV, 807-840, 1971.
- [6] LIN,C.C.,SEGEL,L.A.: Mathematics Applied to Deterministic Problems in the Natural Sciencies. New York, Macmillam,1974.
- [7] O'MALLEY,R.E.: Introduction to Singular Perturbations. New York, Academic Press, 1974.
- [8] SEGEL,L.A.: On the Validity of the Steady State Assumption of Enzyme Kinetics. Bulletin of Mathematical Biology, 50(6), 576-593, 1988.
- [9] SEGEL,L.A.,SLEMROD,M.: The Quasi-Steady State Assumption: a Case Study in Perturbation. SIAM Review 31(3), 446-477, 1989.
- [10] VASIL'EVA,A.B.: Asymptotic Behavior of Solutions of Certain Problems for Ordinary Nonlinear Differential Equations with a Small Parameter Multiplying the Highest Derivatives. Russian Math. Surveys 18, 15-86, 1963.

