



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE LAS MICROCONSTANTES DE VELOCIDAD PARA LA HIDRÓLISIS DE L-LISINA-*p*-NITROANILIDA CATALIZADA POR TRIPSINA DE *Bos taurus*, MEDIANTE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA**

PRESENTA

**ITZEL CONDADO MORALES**



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Miguel Antonio Costas Basín  
**VOCAL:** Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas  
**SECRETARIO:** Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
**1er SUPLENTE:** Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba  
**2do SUPLENTE:** Q. F. B. Emma González Chimeo

La presente Tesis fue realizada en el laboratorio 102 del edificio B de la  
Facultad de Química de la UNAM

Itzel Condado Morales

**SUSTENTANTE**

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

**ASESOR DEL TEMA**

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Química de la UNAM

Al Dr. Miguel Antonio Costas Basín, por su asesoría, consejos y aportaciones durante el desarrollo de esta tesis.

A mis sinodales

Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas y Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por su disposición para la revisión de esta tesis

Al M. en C. César Aguirre Martínez por sus aportaciones y sugerencias.

A los proyectos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN104210 e IN112813, con cuyos recursos se financió esta tesis.

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” de la Facultad de Química, por el otorgamiento de la beca para realizar esta tesis, correspondiente al periodo 2012-2013.

*Le dedico esta tesis a mis padres, mi familia, amigos, profesores y todas las personas que me han apoyado todo este tiempo.*

*Mamá, gracias por confiar siempre en mí, por todo el amor, paciencia, por los sacrificios que has tenido que hacer para hacer todo esto posible. Gracias por cuidarme siempre, por ser un gran ejemplo para mí. Seguramente sino tuviera la fortuna de ser tu hija no hubiera llegado tan lejos, te dedico todo lo que soy.*

*Papá, gracias por estar conmigo en las buenas y las malas, por estar siempre pendiente de mí, por esperar siempre mucho de mí, pero sobretodo por tu cariño y confianza. Espero que te sientas orgulloso de tu “Jimmy”.*

*A mi hermano, por tu compañía, cariño, por los ratos de diversión juntos, por tu apoyo en todo momento, te quiero mucho y estoy orgullosa de ti.*

*A mi abuelita Rica, no tengo palabras para agradecerte todo el cariño que me has brindado durante estos 23 años, eres como una segunda mamá para mí. Tu forma de ser ha sido y será siempre mi ejemplo a seguir. Te adoro abue.*

*A Jorge, porque nunca has dudado de mí desde que te conocí. Gracias por tus consejos, por el poder que tienes de tranquilizarme en momentos difíciles, por todo lo que hemos vivido juntos, por todos los detalles pero sobretodo por tu cariño.*

*Al Dr. Miguel Costas por sus enseñanzas dentro del aula y en el laboratorio, gracias por guiarme en este proyecto y por inspirarme con sus clases el amor a la termodinámica.*

*A César, por compartir tus conocimientos conmigo, por tu paciencia y tus buenos consejos. Gracias por ser mi sensei.*

*Al Dr. Luis Olgún, por sus consejos, comentarios y sugerencias en el desarrollo de este proyecto.*

*A mis tíos Lety y Raúl, porque me han querido como a su hija.*

*A Nelly, por estar siempre a mi lado desde la secundaria y porque nunca me has dejado sola. Gracias por ser una gran amiga.*

*A Xiao, por compartir tantos bellos momentos conmigo, salvarme en n-número de veces, pero sobretodo por ser una amiga en quien sé que puedo confiar.*

*A toche, por ser tan lindo conmigo, por haber hecho de la Olimpiada y la licenciatura algo tan divertido, pero sobre todo por ser un gran amigo y saber que cuento contigo. “Desde que te fuiste no hay nada que hacer, regresa...”*

*A Christian, por tus observaciones sobre este trabajo, por ser un gran maestro en la Olimpiada, pero más que nada por ser mi amigo y estar ahí siempre que te necesito.*

*A la maestra Edith, por el trabajo que ha hecho con la OVQ, pero más que nada por el cariño y apoyo que me ha brindado todos estos años. Gracias por haber formado una gran familia de olímpicos.*

*A mis amigos y compañeros de la carrera, David, Nora, Uzi, Luis Ángel y Juan Alberto, por todo lo que compartimos en las aulas y fuera de ellas. Los quiero mucho.*

*A mi gran y muy querida familia de ex-olímpicos veracruzanos, Ed, Gabo, Miguel, Vicente, Alonso, Tomás, Hugo, Mayeli... quienes han sido mis amigos, maestros y compañeros.*

*A Kethzeel, quien me ha ayudado tantas veces y se ha vuelto un gran amigo.*

*A mis compañeros del laboratorio de Biofísicoquímica, Miguel Ángel, Enrique, Adriana, Jorge, Óscar, Daniel, Ximena, Xelhua, Lalo y Juan, por hacer mi estancia en este laboratorio algo muy ameno y agradable. A Jessica, por hacernos la vida más fácil.*

*A mis profesores, M. en C. José Manuel Méndez Stivalet, Dr. Noé Zúñiga, Dr. Jesús Hernández, Carlos Cosío, Dr. Armando Marín, M. en C. Arturo García, porque con sus clases me motivaron a ser una mejor Química.*

*A Maru, por hacer la vida en la facultad más fácil y por ser siempre tan amable y accesible con los Químicos.*

*Al Prof. Gaudencio, por iniciarme en el mundo de la química.*

*A mi madrina Lili, quien siempre estuvo orgullosa de mí.*

*Al profe Chucho, quien impulsó la olimpiada de química en la Oficial B y siempre apoyó mucho a sus alumnos.*

---

# Índice

Abreviaturas	8
Relación de compuestos	9
1. Resumen	10
2. Antecedentes	11
2.1. Enzimas	11
2.1.1. <i>Promiscuidad de las enzimas</i>	11
2.1.2. <i>Serina proteasas</i>	12
2.2. Cinética Enzimática	15
2.2.1. <i>Cinética Química</i>	15
2.2.2. <i>Dependencia de la velocidad con la temperatura</i>	17
2.2.2.1. <i>Ecuación de Van't Hoff</i>	17
2.2.2.2. <i>Ecuación de Arrhenius</i>	18
2.2.2.3. <i>Teoría del Complejo Activado</i>	19
2.2.3. <i>Modelo de Michaelis-Menten</i>	20
2.2.4. <i>Modelo de Michaelis-Menten para las Serina Proteasas</i>	24
2.3. Análisis de Di Cera	27
2.4. Análisis de Aguirre-Martínez	30
2.5. Medición Experimental de las Velocidades de Reacción	32
2.6. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	33
2.6.1. <i>Funcionamiento y fundamento termodinámico</i>	33
3. Hipótesis y objetivos	38
4. Sección experimental	39
4.1. Materiales	39
4.2. Equipos	40
4.3. Empleo de ITC	40

---

4.4. Empleo de DSC	41
5. Tratamiento de datos	42
5.1. Obtención de las constantes y las energías de activación	42
5.2. Obtención de la Entropía, la Energía libre y la Entalpía de activación	44
5.2.1. <i>Obtención de los Parámetros Termodinámicos de activación para el paso 1</i>	44
5.2.2. <i>Obtención de los Parámetros Termodinámicos de Activación para los pasos 2 y 3</i>	45
6. Resultados y discusión	47
6.1. Parámetros de Michaelis-Menten	47
6.2. Comparación con los ésteres de lisina	48
6.3. Ajuste global	49
6.4. Obtención de Energías de Activación con los gráficos de Arrhenius	55
6.5. Obtención de $\Delta G$ , $\Delta H$ y $\Delta S$ de Activación	57
6.6. Verificación de las hipótesis	59
7. Resumen de las observaciones y conclusiones	60
7.1. Resumen de las observaciones	60
7.2. Conclusiones	60
8. Trabajo futuro	61
9. Apéndice	62
Termogramas y Curvas de Michaelis-Menten	62
Matriz para el ajuste global simultáneo	65
Bibliografía	66

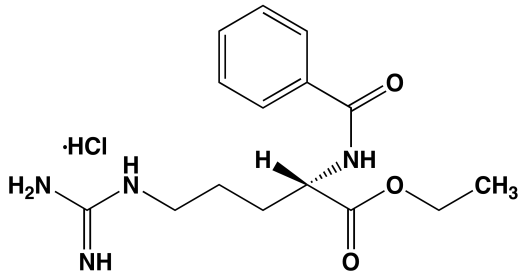
---



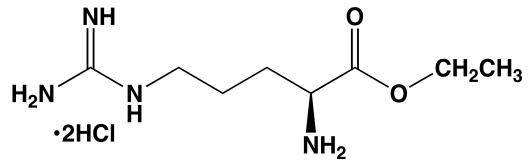
## Abreviaturas

Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BAEE	Benzoíl Arginina Etil éster
DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
Ec.	Ecuación
FPR	H-D-Ph-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilida
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
ITC	Calorimetría de Titulación Isotérmica
LAEE	L-Arginina Etil éster
LKEE	L-Lisina Etil éster
LKME	L-Lisina Metil éster
LKPNA	L-Lisina <i>p</i> -nitroanilida
Lys	Lisina
PEG	Polietilenglicol
Ph	Fenil
Pro	Prolina
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano
ZLysONp	N- $\alpha$ -carbобенzoxi-L-lisina nitrofenil éster

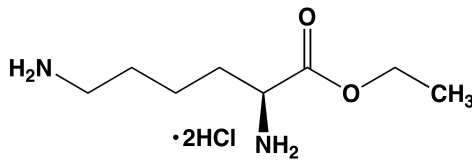
Relación de compuestos



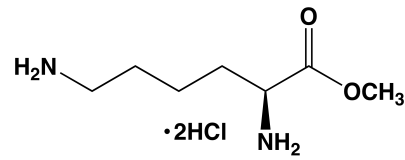
BAEE



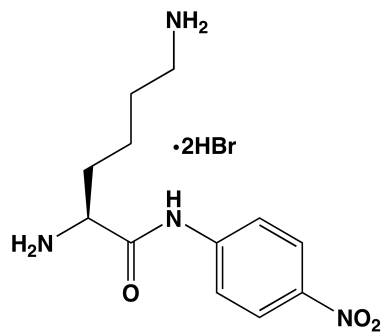
LAEE



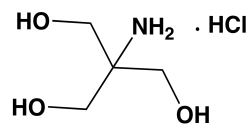
LKEE



LKME



LKPNA



Tris-HCl

## I. Resumen

Las constantes de velocidad para la hidrólisis de un sustrato con enlace de amida (1-lisina-*p*-nitroanilida) catalizada por la  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus* fueron obtenidas mediante Calorimetría de Titulación Isotérmica. Con el método utilizado fue posible determinar la constante de velocidad y la energía de activación tanto para el paso limitante de la reacción (acilación en el caso de LKPNA) como para la formación del complejo ES. Sin embargo, no fue posible obtener los parámetros de velocidad ( $k_3$  y  $E_3$ ) de la desacilación. Además, en este trabajo se calcularon los parámetros de activación ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ ), obteniendo una entropía de activación negativa para el paso limitante, es decir, existe un mecanismo de tipo asociativo en la formación del complejo activado en la acilación.

## 2. Antecedentes

### 2.1. ENZIMAS

Las enzimas son proteínas globulares capaces de convertir a un sustrato en producto(s) con gran eficiencia. Frecuentemente se encuentra que las enzimas pueden catalizar otras reacciones además de la reacción nativa, fenómeno conocido como *promiscuidad catalítica* (Nath & Atkins, 2008).

Una proteína es una cadena lineal del orden de 100 aminoácidos, unidos mediante enlaces peptídicos. Los aminoácidos que forman a las proteínas son principalmente 20 llamados proteicos, aunque en ocasiones se pueden encontrar otros distintos<sup>1</sup> (Frauenfelder, 2010). Las proteínas son macromoléculas de origen biológico, aunque actualmente existen algunas modificadas por el hombre (Svedendahl Humble & Berglund, 2011).

La estructura proteica puede clasificarse en 3 o 4 niveles, dependiendo de la proteína. La *estructura primaria* es la secuencia de aminoácidos de la proteína. La *estructura secundaria* obedece al arreglo conformacional local del esqueleto, que resulta de interacciones no covalentes entre los residuos de la proteína (e.g.  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -lámina, giros, asas, random-coil) sin tomar en cuenta interacciones con otros segmentos. La *estructura terciaria* es la conformación que adquiere la proteína en el espacio debido a cómo se pliega. Si la proteína está formada por más de una cadena polipeptídica individual, la manera en cómo éstas se distribuyen en el espacio se denomina *estructura cuaternaria*. La secuencia de aminoácidos, entre otras propiedades, determina la conformación plegada de la proteína, y esta estructura (forma nativa), es la que le confiere su actividad biológica (Lehninger, Nelson, & Cox, 2005, Cap. 3).

#### 2.1.1. PROMISCUIDAD DE LAS ENZIMAS

En la estructura nativa de las enzimas, existe un sitio al cual se une el sustrato y permite que ocurra la catálisis. A este centro se le denomina *sitio activo*. Para que ocurra catálisis, el sustrato se une de tal forma al sitio activo de la enzima, que el estado de transición es estabilizado, ya sea me-

---

<sup>1</sup> Entre los aminoácidos que se pueden encontrar en las proteínas, además de los 20 estándar, se encuentran algunos derivados de los residuos estándar.

dianter interacciones electrostáticas o covalentes. Al estabilizar el estado de transición, la energía de éste disminuye y la reacción ocurre más rápido (Babtie, Tokuriki, & Hollfelder, 2010).

A pesar de que tradicionalmente se piensa que cada enzima es catalizador de una reacción en particular, existe un fenómeno conocido como *promiscuidad* de las enzimas, en el cual éstas pueden catalizar reacciones o actuar en distintos sustratos o condiciones para los cuales la enzima ha evolucionado y que no son parte de la fisiología del organismo (Khersonsky & Tawfik, 2010).

El comportamiento promiscuo en las enzimas puede presentarse en distintas formas: a) *promiscuidad de las condiciones de reacción*, si muestran incremento de actividad en condiciones distintas a las naturales; b) *promiscuidad de sustrato*, si actúan sobre una variedad de distintos sustratos; c) *promiscuidad catalítica*, cuando pueden catalizar distintas reacciones y d) *promiscuidad de sitio-alterno*, si realizan catálisis en un sitio activo distinto al nativo (Svedendahl Humble & Berglund, 2011).

Muchas enzimas se consideran promiscuas, por lo cual este fenómeno debe ser considerado más como una regla que una excepción (Khersonsky & Tawfik, 2010). Un ejemplo común de enzima que presenta promiscuidad catalítica es la tripsina, la cual puede catalizar la hidrólisis de distintos enlaces, entre ellos amidas, ésteres o tioésteres en pequeñas moléculas, péptidos o proteínas (Long & Cravatt, 2011).

La tripsina es una enzima proteolítica de las más selectivas, ya que ha evolucionado para romper los enlaces peptídicos que se encuentran del lado CO de los residuos de Arg y Lys, los cuales son relativamente largos, tienen una carga positiva y son hidrofílicos (Stroud, 1974). Dos posiciones de la enzima, los residuos 189 y 190, son esenciales para el reconocimiento del sustrato (Evinin, Vásquez, & Craik, 1990).

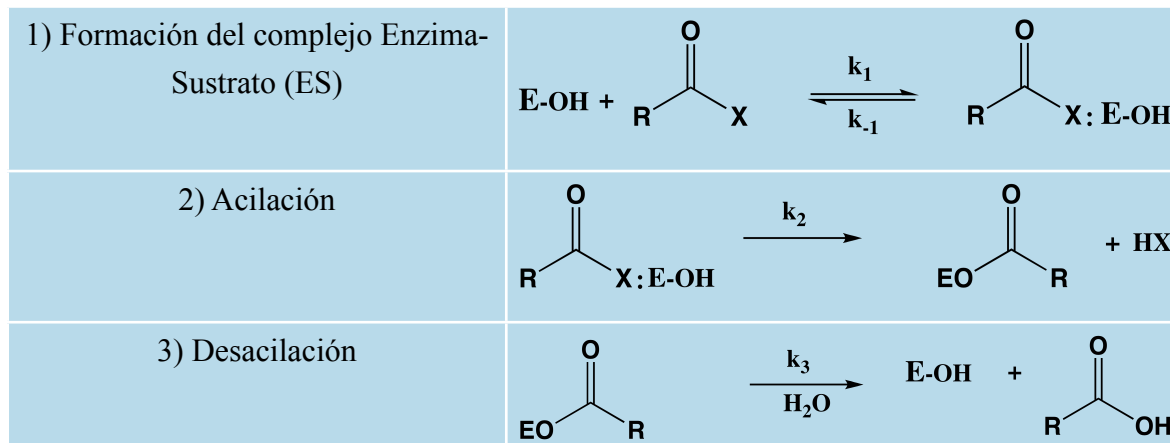
### 2.1.2. SERINA PROTEASAS

Las serina proteasas son una clase de enzimas proteolíticas caracterizadas por la presencia de un residuo de serina en su sitio activo. La familia<sup>2</sup> de la tripsina se encuentra entre las mejor estudiadas entre las serina proteasas (Kraut, 1977).

---

<sup>2</sup>El término *familia* se refiere a un grupo de enzimas homólogas, que son casi siempre similares en su geometría tridimensional.

Las serina proteasas catalizan la hidrólisis de enlaces de amida y éster de acuerdo la secuencia de reacciones mostrada en el esquema 2.1. El mecanismo ha sido ampliamente estudiado y se conoce que consta de tres pasos (Hedstrom, 2002; Polgár, 2005).



Esquema 2.1. Mecanismo general de la hidrólisis catalizada por las Serina Proteasas. HX = amina o alcohol.

En el primer paso, ocurre la formación del complejo Enzima-Sustrato (ES) de forma reversible. Una vez formado el complejo, el grupo hidroxilo de la serina funciona como nucleófilo y ataca al carbono carbonílico del sustrato para formar un intermediario tetraédrico (acil-enzima) y liberar el primer producto (alcohol en el caso de que el sustrato sea un éster o amina en el caso de que sea una amida). Finalmente, el intermediario acil-enzima se hidroliza para regenerar la enzima y un segundo producto, el grupo carbonilo del sustrato como ácido carboxílico o carboxilato, dependiendo del pH (Case & Stein, 2003).

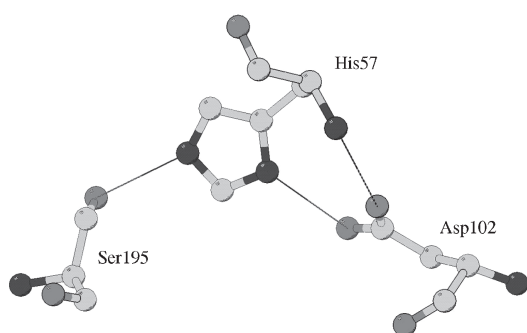


Figura 2.1. Tríada catalítica de la quimotripsina, PDB 4CHA (Polgár, 2005).

El nombre de *serina proteasas* proviene del residuo de serina en el sitio activo de estas enzimas. La forma en la que actúan las serina proteasas depende de la acción de un nucleófilo, una base débil y una base fuerte. En la familia de la tripsina, esta *tríada catalítica* está formada por los residuos Ser195 (nucleófilo), His57 (base débil) y Asp102<sup>3</sup> (base fuerte; ver Figura 2.1). De esta forma, el aspartato compite con la His57 por el protón de la Ser195.

<sup>3</sup> A pH = 8.00 el Asp102 se encuentra como aspartato. (Asp, pK<sub>a1</sub> = 1.99, pK<sub>a2</sub> = 9.90, pK<sub>a3</sub> = 3.90).

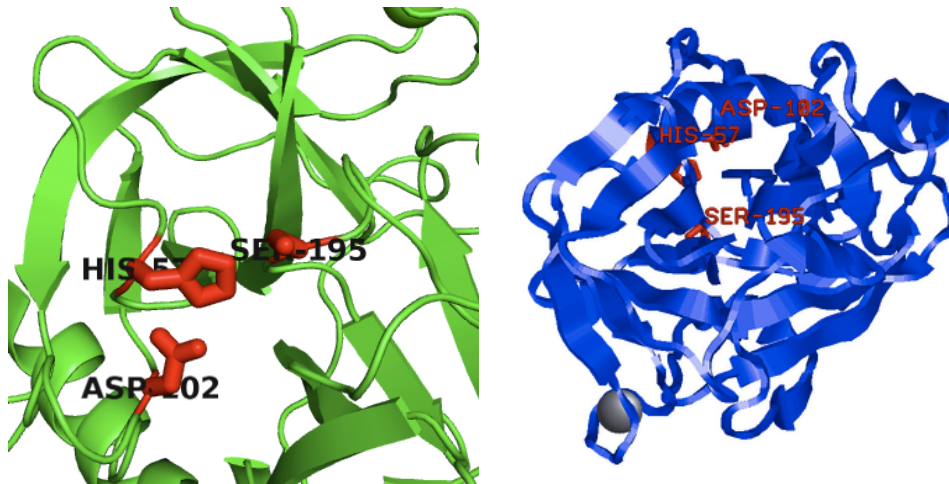


Figura 2.2. Residuos que participan en la tríada catalítica de la tripsina. Imágenes elaboradas con el programa POLI-VIEW-3D (Porollo A, 2007) con los datos obtenidos del PDB (PDB ID: 2PTN).

En general, el mecanismo de la hidrólisis es vía adición-eliminación, con un intermediario tetraédrico. En la figura 2.2 se muestra la orientación de los residuos de la tríada catalítica, la cual es crucial para que pueda ocurrir catálisis (Polgár, 2005).

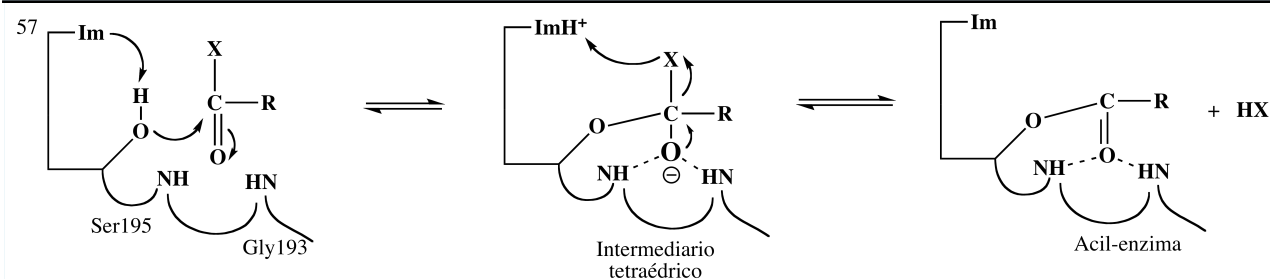
El esquema 2.2 muestra los intermediarios de los pasos 2 y 3 del mecanismo. Una vez que el complejo ES ha sido formado, el grupo hidroxilo de la Ser195 actúa como nucleófilo sobre el carbonilo del sustrato, con ayuda del grupo imidazol de la His57 como base, formando un intermediario tetraédrico (reacción de adición) y el ion imidazol ( $\text{His57-H}^+$ ). El intermediario tetraédrico se rompe y forma la acil-enzima más el primer producto (amina o alcohol). En este paso, el ion imidazol transfiere el protón al grupo saliente antes de que ocurra la eliminación, ya que las aminas son un mal grupo saliente.

En el último paso del mecanismo, ocurre nuevamente una reacción de adición-eliminación, pero esta vez el agua actúa como nucleófilo, asistida por la His57 como base. El agua se adiciona al carbonilo de la acil-enzima formando otro intermediario tetraédrico y el ión  $\text{His57-H}^+$ . El intermediario tetraédrico se rompe para devolver a la enzima libre y el ácido carboxílico proveniente del sustrato, el cual, dependiendo del pH del medio, puede encontrarse como ácido o como carboxilato.

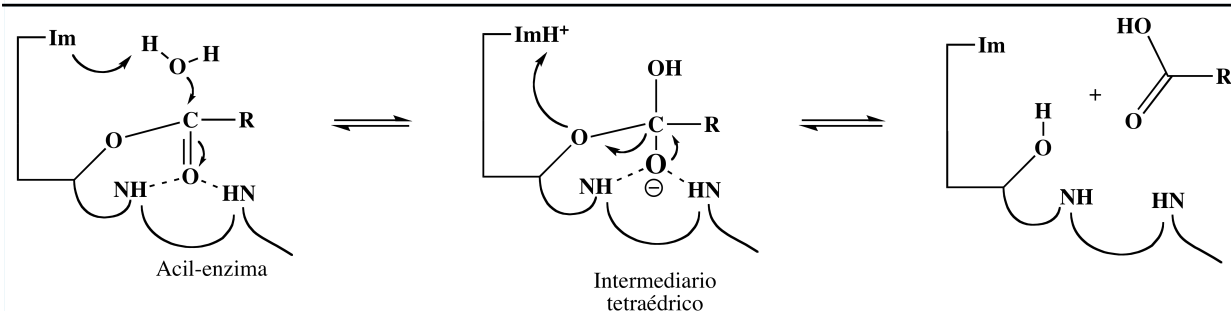
Cabe mencionar que ambos intermediarios tetraédricos formados durante el mecanismo son estabilizados por el llamado *hueco del oxianión* de la enzima, formado por los grupos NH de la

Gly193 y la Ser195, los cuales estabilizan la carga negativa en el oxígeno del intermediario (Hedstrom, 2002).

## 2) Acilación



## 3) Desacilación



Esquema 2.2. Intermediarios para los pasos de acilación (2) y desacilación (3) de la hidrólisis catalizada por Serina Proteasas.  $X = OR$  o  $NHR$  ya sea éster o péptido, respectivamente.

A pesar de que los intermediarios del mecanismo de acción de las serina proteasas han sido caracterizados por diversos métodos, es necesario conocer la velocidad con la que ocurre cada paso de la reacción. El área encargada de estudiar la velocidad con la que ocurren dichas reacciones se conoce como *Cinética Enzimática*.

## 2.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

### 2.2.1. CINÉTICA QUÍMICA

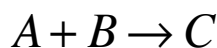
La velocidad de reacción  $V$  puede definirse como:

$$V = \frac{1}{\nu_j} \frac{d[J]}{dt} \quad (1.1)$$



Donde  $J$  es cada componente de la reacción,  $\nu_J$  es el número estequiométrico de la sustancia, para productos  $\nu_J > 0$  y para reactivos  $\nu_J < 0$  (Atkins, 1999).

Por ejemplo, para la reacción elemental<sup>4</sup>:



la velocidad queda como:

$$V = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} \quad (1.2)$$

Experimentalmente se encuentra que la velocidad es función de diversas variables, como la concentración de las especies, la temperatura, entre otras (Castellan, 1998). La velocidad es proporcional a la concentración de los reactivos:

$$V \propto [A]^m [B]^n \quad (1.3)$$

La expresión anterior puede convertirse en igualdad introduciendo una constante de proporcionalidad  $k$ :

$$V = k[A]^m [B]^n \quad (1.4)$$

Los exponentes  $m$  y  $n$  se conocen como *orden de reacción*,  $m$  es el orden de reacción respecto a A y  $n$  es el orden de reacción respecto a B. El orden total de la reacción es la suma de todos los exponentes, los cuales casi siempre son enteros positivos pero en algunos casos pueden ser negativos, cero o incluso fracciones (Ball, 2004). Igualando las Ecuaciones 1.2 y 1.4, se obtiene la ley de la velocidad para esta reacción:

$$V = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = \frac{d[C]}{dt} = k[A]^m [B]^n \quad (1.5)$$

---

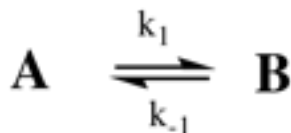
<sup>4</sup> *Reacciones elementales*: reacciones que se llevan a cabo en una etapa.

La constante  $k$  es la *constante de velocidad* de la reacción, la cual depende de la temperatura y presión (para reacciones en fase gaseosa) y temperatura y concentración si son reacciones en disolución (Castellan, 1998).

## 2.2.2. DEPENDENCIA DE LA VELOCIDAD CON LA TEMPERATURA

### 2.2.2.1. ECUACIÓN DE VAN'T HOFF

En 1867, Pfaundler descubrió que en el equilibrio, las velocidades de una reacción en ambas direcciones (reactivos a productos y viceversa) no varían, de tal forma que la relación entre ambas es igual a la constante de equilibrio (Laidler, 1984). Por ejemplo, para la reacción genérica:



la relación de equilibrio sería:

$$k_1(T) / k_{-1}(T) = K_{eq}(T) \quad (1.6)$$

Donde  $k_1(T)$  es la constante de velocidad de la reacción de formación de productos y  $k_{-1}(T)$  es la constante de velocidad de la reacción inversa.

La relación que expresa la dependencia de la constante de equilibrio con la temperatura, conocida como *Ecuación de Van't Hoff*:

$$\frac{d \ln K_{eq}(T)}{dT} = \frac{\Delta H_{eq}^o}{RT^2} \quad (1.7)$$

Combinando las ecuaciones 1.6 y 1.7, se obtiene:

$$\frac{d \ln k_1}{dT} - \frac{d \ln k_{-1}}{dT} = \frac{\Delta H_{eq}^o}{RT^2} \quad (1.8)$$

Las constantes de velocidad son dependientes de la temperatura, por dos cantidades  $E_1$  y  $E_{-1}$ , cuya diferencia es  $\Delta H_{eq}^o$ , de tal forma que:

$$\frac{d \ln k_1(T)}{dT} = \frac{E_1}{RT^2} \quad (1.9)$$

$$\frac{d \ln k_{-1}(T)}{dT} = \frac{E_{-1}}{RT^2} \quad (1.10)$$

Donde las energías de activación no son independientes de la temperatura. Considerando que  $\Delta H_{eq}$  es constante con la temperatura e integrando la ecuación 1.8 entre los estados  $T_1$  y  $T_2$ , se llega a la siguiente expresión:

$$\ln \frac{K_{T_2}}{K_{T_1}} = -\frac{\Delta H^o}{R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (1.11)$$

#### 2.2.2.2. ECUACIÓN DE ARRHENIUS

Con base en el tratamiento de Van't Hoff, Arrhenius desarrolló un modelo en el cual considera que las energías de activación son independientes de la temperatura. Este modelo ha sido casi universalmente aceptado como una expresión que relaciona el efecto de la temperatura en la velocidad de una reacción elemental (Peleg, Normand, & Corradini, 2012)

$$k(T) = k(T_{ref}) e^{\left[ \frac{Ea}{R} \left( \frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right]} \quad (1.12)$$

Otra forma de expresar la ecuación de Arrhenius es:

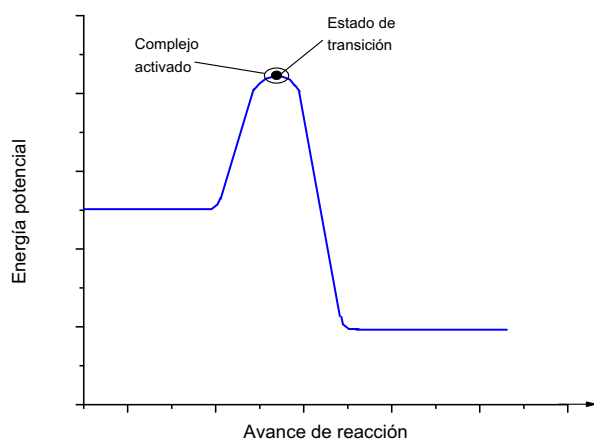
$$k(T) = A \exp\left(-\frac{E_{act}}{RT}\right) \quad (1.13)$$

$A$  es comúnmente llamado *el factor pre-exponencial* y  $E_{act}$  es la *energía de activación*<sup>5</sup>, se asume que estas dos cantidades son independientes de la temperatura (Smith, 2007). Una forma de obtener estos dos parámetros es con el llamado *gráfico de Arrhenius*, en el cual la variable independiente es el inverso de la temperatura y la variable dependiente es el  $\ln k$ . La pendiente de esta recta es  $m = -E_a/R$  y la ordenada al origen es  $\ln A$  (Atkins, 1999).

<sup>5</sup> La energía de activación positiva está asociada al concepto de barrera de energía potencial en el camino de mínima energía que va de reactivos a productos en una reacción elemental (Smith, 2007).

## 2.2.2.3. TEORÍA DEL COMPLEJO ACTIVADO

Existe una teoría que permite expresar la constante de velocidad como función de parámetros termodinámicos para reacciones bimoleculares. Durante el avance de una reacción, la energía potencial de los reactivos se distorsiona hasta que llega a un máximo de energía, dicha configuración se conoce como el *estado de transición* de la reacción. El complejo activado es la región cercana en



energía al estado de transición (ver figura 2.3).

Cuando las moléculas alcanzan este punto, una ligera distorsión las lleva a formar productos.

La diferencia entre la energía de los productos y la energía del estado de transición se conoce como  $\Delta G^\ddagger$  y es posible obtenerla ya sea con cálculos ab initio que proporcionen la superficie de energía, o con el valor de la constante de velocidad experimental, usando la ecuación de Eyring:

Figura 2.3. Energía potencial vs avance de reacción.

(1.14)

donde:

$\Delta G^\ddagger$  : Energía libre de activación

$k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$  Constante de Boltzmann  $k = \frac{k_B}{h} T e^{-\Delta G^\ddagger / RT}$

$h = 6.634 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$  Constante de Planck

Como  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$ , es posible obtener la entalpía y la entropía de activación. La entropía de activación es la entropía estándar del estado de transición menos la entropía estándar de los reactivos a la temperatura de la reacción (Gold, 1963).

## 2.2.3. MODELO DE MICHAELIS-MENTEN

La ecuación de velocidad de una reacción proporciona información sobre el mecanismo de ésta. Cualquier mecanismo que se proponga debe ser consistente con el experimento observado (Levine, 1999). El primer mecanismo que explicaba el comportamiento de las enzimas fue el propuesto por Brown en 1912 (Copeland, 2000):



Este mecanismo asume la formación de un complejo Enzima Sustrato (ES) en un paso reversible, seguido por la descomposición del complejo de forma irreversible para devolver a la enzima libre y uno o más productos. El tratamiento matemático para este sistema es atribuido a Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913, por lo que este modelo se conoce como el de *Michaelis-Menten*.

Las velocidades individuales para cada una de las especies implicadas se expresan con las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (1.15)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.16)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.17)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad (1.18)$$

La velocidad de reacción  $v$  se define como la velocidad de formación del producto. Esta velocidad depende directamente de la concentración de ES, la cual en la práctica es difícil de medir, por lo cual es necesario hacer un tratamiento para conocer la velocidad en términos de cantidades factibles de ser medidas, como las concentraciones iniciales de E y S, por ejemplo. El tratamiento matemático para obtener la ecuación de Michaelis-Menten incluye las siguientes consideraciones:

1) Se asume que la formación del complejo ES ocurre más rápido que la fase de catálisis, es decir,  $k_1 = k_{-1} > k_2$ .

2) Una vez que el complejo ES ha sido formado, su concentración se encuentra prácticamente constante (*estado estacionario*<sup>6</sup>), es decir,  $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ .

Es necesario mencionar que en la propuesta inicial de Michaelis-Menten no se considera el estado estacionario, sino un equilibrio rápido, donde las concentraciones de la enzima libre y el complejo ES permanecen constantes unos segundos después de mezclar la enzima con el sustrato. El tratamiento con estado estacionario se atribuye a Briggs y Haldane (Schulz, 1994).

De la Ecuación 1.17 y la aproximación del estado estacionario se obtiene:

$$\frac{d[ES]_{ee}}{dt} = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]_{ee} \quad (1.19)$$

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES]_{ee} \quad (1.20)$$

Despejando  $[ES]_{ee}$ :

$$[ES]_{ee} = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (1.21)$$

$$[ES]_{ee} = \frac{[E][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (1.22)$$

$$[ES]_{ee} = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (1.23)$$

Donde:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (1.24)$$

Haciendo un balance de materia para  $[E]_0$ :

$$[E]_0 = [E] + [ES]_{ee} \quad (1.25)$$

<sup>6</sup> La aproximación del *estado estacionario* considera que las velocidades de formación y decaimiento de  $[ES]$  se mantienen en equilibrio por un periodo de tiempo limitado, lo que permite que la concentración de  $[ES]$  sea prácticamente constante (Bisswanger, 2008).

Despejando el término  $[E]$  de la Ec. 1.25 y sustituyéndolo en la Ec. 1.23:

$$[ES]_{ee} = [E]_0 \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (1.26)$$

Al sustituir el término  $[ES]_{ee}$  de la Ec. 1.26 en la expresión de velocidad de la Ec. 1.18, se obtiene:

$$v = k_2[ES] = k_2 \frac{[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (1.27)$$

La Ec. 1.27 se puede utilizar para el modelo de Michaelis-Menten modificado, en cuyo caso se escribe  $k_{cat}$  en lugar de  $k_2$ <sup>7</sup>:

$$v = k_{cat} \frac{[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (1.28)$$

La Ec. 1.28, conocida como *ecuación de Michaelis-Menten* es fundamental en la cinética enzimática (Bisswanger, 2008). Esta ecuación está definida por dos constantes:

- La *constante de Michaelis*  $K_m$ , con unidades de molaridad, está relacionada inversamente con la afinidad de la enzima por el sustrato.
- La *constante catalítica*  $k_{cat}$ , con unidades de tiempo<sup>-1</sup>, es la frecuencia de ciclos catalíticos de la enzima por unidad de tiempo.

A partir de las constantes del modelo es posible definir dos constantes más:

- La constante de disociación  $K_d$ , que es la relación entre  $k_l$  y  $k_{-l}$  de la formación del complejo ES,  $K_d = k_{-l}/k_l$ .

---

<sup>7</sup> Para una variación del mecanismo de Michaelis-Menten, la  $k_{cat}$  es una constante global, mientras que para el mecanismo estándar  $k_{cat} = k_2$ .

• La relación entre  $k_{cat}$  y  $K_m$ , conocida como *constante de especificidad* o *eficiencia catalítica*  $K_s = k_{cat}/K_m$ , proporciona información acerca de la eficiencia de la reacción. Permite comparar la selectividad de una enzima hacia distintos sustratos (Peretó, 2007).

En la figura 2.4 se muestra la dependencia de la velocidad con la concentración de sustrato de una reacción que sigue el modelo de Michaelis-Menten. Como puede observarse, a altas concentraciones de sustrato, la velocidad alcanza una asíntota, conocida como *velocidad máxima*<sup>8</sup>  $V_{max}$ :

$$V_{max} = k_{cat}[E]_0 \quad (1.29)$$

Conociendo la velocidad máxima y la concentración inicial de enzima  $E_0$ , es posible calcular  $k_{cat}$ . Además, de este gráfico también es posible obtener el valor de  $K_m$  ya que es igual al valor de concentración de sustrato en el cual se produce la mitad de  $V_{max}$ .

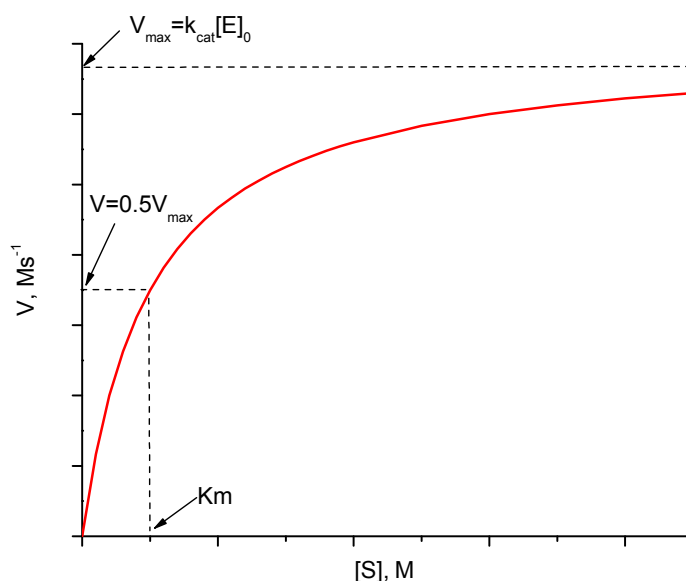


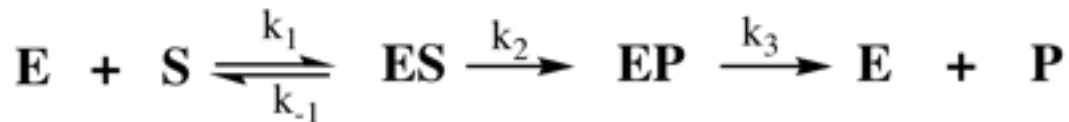
Figura 2.4. Gráfico de Michaelis-Menten: variación de la velocidad con la concentración de sustrato para una reacción catalizada enzimáticamente que sigue la ecuación de Michaelis-Menten.

<sup>8</sup> Por definición, la  $K_m$  es la concentración de sustrato con la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima bajo condiciones de saturación (Copeland, 2000).



#### 2.2.4. MODELO DE MICHAELIS-MENTEN PARA LAS SERINA PROTEASAS

El modelo de Michaelis-Menten funciona muy bien para muchos sistemas. Para las Serina Proteasas es posible utilizarlo haciendo el tratamiento matemático adecuado. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo para las serina proteasas puede resumirse como:



EP es la acil-enzima. Las velocidades para cada especie quedan como:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (1.30)$$

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] - k_3[EP] \quad (1.31)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[EP] \quad (1.32)$$

Las expresiones para [S] y [E] quedan como las Ec. 1.15 y 1.16, respectivamente. Se puede aplicar la aproximación del estado estacionario para los intermediarios [ES] y [EP] (Aguirre-Martínez, 2011; Fersht, 1985):

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (1.33)$$

$$k_2[ES] - k_3[EP] = 0 \quad (1.34)$$

$$[EP] = \frac{k_2[ES]}{k_3} \quad (1.35)$$

El balance de materia para la enzima queda como:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EP] \quad (1.36)$$

Sustituyendo el término [E] de la Ec. 1.36 y luego el término [EP] de la Ec. 1.35 en la Ec. 1.33 se obtiene:

$$k_1[E]_0[S] - k_1[ES][S] - \frac{k_1k_2}{k_3}[ES][S] - k_2[ES] - k_{-1}[ES] = 0 \quad (1.37)$$

Despejando [ES] y ordenando términos:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{[S] \left( 1 + \frac{k_2}{k_3} \right) + \left( \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \right)} \quad (1.38)$$

[ES] se sustituye en la Ec. 1.35:

$$[EP] = \frac{k_2[E]_0[S]}{k_3[S] \left( 1 + \frac{k_2}{k_3} \right) + \left( \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \right)} \quad (1.39)$$

El término [EP] de la Ec. 1.39 se sustituye en la expresión de la velocidad (Ec. 1.32):

$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{[S] \left( \frac{k_2 + k_3}{k_3} \right) + \left( \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \right)} \quad (1.40)$$

Haciendo el tratamiento algebraico adecuado se puede demostrar que:

$$v = \frac{\frac{k_2k_3}{k_2 + k_3}[E]_0[S]}{\frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} + [S]} \quad (1.41)$$

La Ec. 1.41 se puede expresar de la forma:

$$v = \frac{k_{cat}[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (1.42)$$

En donde (Ayala & Di Cera, 2000; Fersht, 1985; Hedstrom, 2002):

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (1.43)$$

$$K_m = \frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} \quad (1.44)$$

$$K_s = \frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (1.45)$$

### 2.3. ANÁLISIS DE DI CERA

Existe un método reportado para la determinación de las constantes individuales ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  y  $k_3$ ) y energías de activación para cada paso del mecanismo de las Serina Proteasas. Este método relaciona el modelo de Michaelis-Menten con la dependencia de la temperatura de las constantes de velocidad (Ayala & Di Cera, 2000).

Como se mencionó previamente, la dependencia de las constantes con la temperatura está dada por la ecuación de Arrhenius ( $T_0 = 298.15$  K):

$$k = k^o \exp \left[ -\frac{Ea}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] \quad (1.46)$$

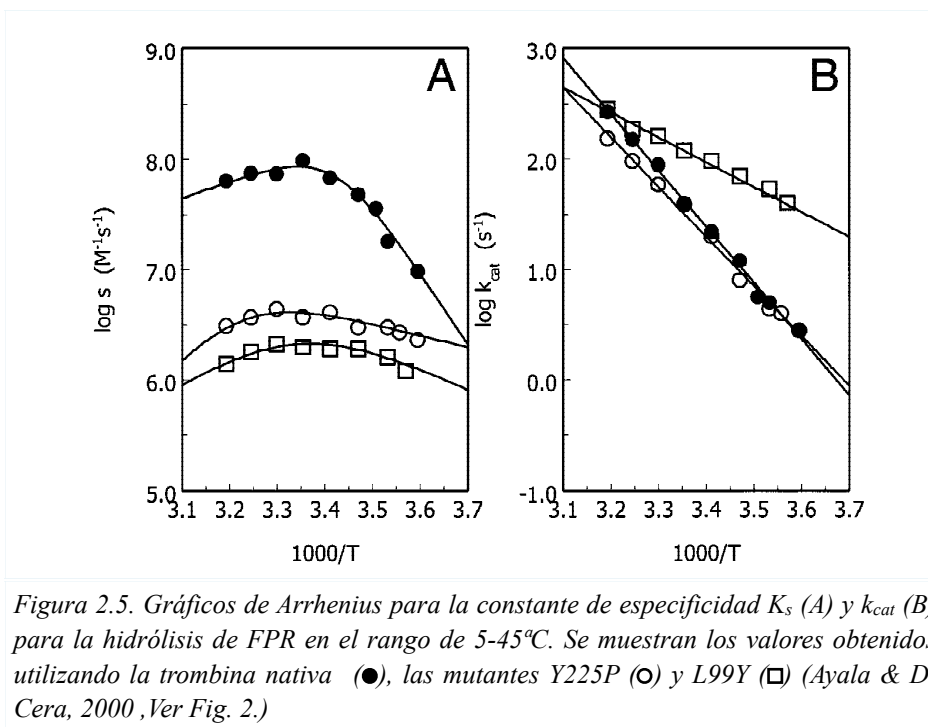
Las constantes de especificidad  $K_s$  y la constante catalítica  $k_{cat}$  pueden expresarse en función de la temperatura:

$$K_s = \frac{k_1^o k_2^o \exp \left[ -\frac{E_1 + E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}{k_{-1}^o \exp \left[ -\frac{E_{-1}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] + k_2^o \exp \left[ -\frac{E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (1.47)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2^o k_3^o \exp \left[ -\frac{E_2 + E_3}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}{k_2^o \exp \left[ -\frac{E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right] + k_3^o \exp \left[ -\frac{E_3}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (1.48)$$

Para determinar los valores de las constantes, se necesitan hacer algunas consideraciones de acuerdo con el tipo de sustrato que se esté utilizando (amida o éster). En la figura 2.5 se muestran los gráficos de Arrhenius para la hidrólisis de FPR<sup>9</sup> catalizada por trombina, en sus formas nativa y mutantes.

<sup>9</sup> FPR: péptido H-D-Ph-Pro-Arg-*p*-nitroanilida.



Del gráfico A puede observarse que a bajas temperaturas, la pendiente es negativa mientras que a altas temperaturas la pendiente es positiva. Esto puede explicarse asumiendo que los pasos de acilación ( $k_2$ ) y de formación del complejo ES ( $k_1$ ) tienen energías de activación menores que la energía de disociación del complejo ( $k_{-1}$ ), por lo que a temperaturas bajas se favorece el proceso de acilación:

$$k_2 \gg k_{-1} \quad (1.49)$$

Así que la Ec. 1.47 puede simplificarse:

$$(1.50) \quad K_s = k_1^o \exp \left[ -\frac{E_1}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]$$

$$(1.51) \quad \ln K_s = \ln k_1^o - \frac{E_1}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)$$

De la Ec. 1.51 pueden obtenerse  $k_1$  y  $E_1$  puesto que  $m = -\frac{E_1}{R}$  y  $b = \ln k_1^o$ .

A altas temperaturas, el proceso favorecido es el de disociación del complejo, es decir  $k_{-1} \gg k_2$ , bajo esta suposición, la constante de especificidad puede escribirse como:

$$K_s = \frac{k_1 k_2}{k_{-1}} \quad (1.52)$$

Por lo tanto, al simplificar la Ec. 1.47 y aplicando logaritmo natural, puede obtenerse una ecuación con forma de una línea recta:

$$\ln K_s = \ln \frac{k_1^o k_2^o}{k_{-1}^o} - \frac{E_1 + E_2 - E_{-1}}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (1.53)$$

Donde  $m = \frac{E_{-1} - E_1 - E_2}{R}$  y  $b = \ln \frac{k_1^o k_2^o}{k_{-1}^o}$ . La pendiente es positiva ya que por lo regular

$E_{-1} \gg E_1 \approx E_2$ . Para conocer el valor de las incógnitas restantes, es necesario observar el gráfico de Arrhenius de  $k_{cat}$  (Fig. 2.7, gráfico B), el cual presenta un comportamiento lineal en este rango de temperaturas. El paso de desacilación,  $k_3$ , es determinante para la mayoría de los sustratos tipo éster, mientras que para los sustratos con enlaces de amida, el paso determinante es la acilación,  $k_2$  (Brouwer & Kirsch, 1982). Para el péptido FPR, puede asumirse que  $k_3 \gg k_2$ , por lo que  $k_{cat}$  se puede escribir como:

$$\ln k_{cat} = \ln k_2^o - \frac{E_2}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (1.54)$$

En resumen, las consideraciones que plantea Di Cera son:

- 1) A bajas temperaturas el proceso que se favorece la acilación sobre la disociación del complejo,  $k_2 \gg k_{-1}$ .
- 2) A altas temperaturas la disociación del complejo está favorecida, es decir,  $k_{-1} \gg k_2$ .
- 3) El paso determinante es la desacilación en ésteres ( $k_2 \gg k_3$ ) y la acilación en amidas ( $k_3 \gg k_2$ ).

Esta metodología tiene la desventaja de que requiere hacer suposiciones, las cuales no necesariamente son válidas para todos los sustratos y condiciones de reacción. Aunque se pensaba que el paso determinante para la hidrólisis de ésteres era la acilación, se ha demostrado que éste podría llegar a ser la desacilación, dependiendo de la concentración del sustrato (Aguirre-Martínez, 2011; Fastrez & Fersht, 1973).

#### 2.4. ANÁLISIS DE AGUIRRE - MARTÍNEZ

En 2011, Aguirre-Martínez estudió la hidrólisis de diversos ésteres de lisina y arginina, catalizada por tripsina utilizando Calorimetría de Titulación Isotérmica (Aguirre-Martínez, 2011). Al obtener las diversas curvas de Michaelis-Menten a distintas temperaturas, se puede hacer un ajuste simultáneo de todos los datos, utilizando la dependencia de la velocidad con la temperatura (Ec. de Arrhenius) y así obtener las constantes individuales para cada paso del mecanismo.

En el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad puede expresarse como:

$$v = \frac{[E]_0 k_{cat} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.28)$$

Como se explicó en la sección 2.2.4, se puede ajustar el modelo de Michaelis-Menten al caso de las serina proteasas y la velocidad puede expresarse como función de las constantes individuales del mecanismo de la siguiente forma:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [S]}{\frac{k_3(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_3)} + [S]} \quad (1.55)$$

Es posible simplificar la Ec. 1.55, puesto que se ha demostrado que el paso de disociación del complejo es más rápido que el paso de acilación, es decir,  $k_{-1} \gg k_2$ , por lo que la Ec. 1.55 Se puede reescribir como:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [S]}{\frac{k_3 k_{-1}}{k_1 (k_2 + k_3)} + [S]} \quad (1.56)$$

Donde  $K_d = k_{-1}/k_1$ , así que la Ec. 1.56 puede escribirse como:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} [S]}{\frac{K_d k_3}{(k_2 + k_3)} + [S]} \quad (1.57)$$

La Ec. 1.57 puede expresarse en función de la temperatura y las energías de activación, utilizando la Ec. de Arrhenius para cada una de las constantes:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\left( \frac{k_2 k_3 \exp\left(-\frac{E_2 + E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)}{k_2 \exp\left(-\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) + k_3 \exp\left(-\frac{E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)} \right) [S]}{\left( \frac{K_d k_3 \exp\left(-\frac{-\Delta E + E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)}{\left( k_2 \exp\left(-\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) + k_3 \exp\left(-\frac{E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \right) + [S]} \right)} \quad (1.58)$$

La Ec. 1.58 se utiliza para hacer un ajuste simultáneo de todas las curvas de Michaelis-Menten a sus respectivas temperaturas, quedando como incógnitas las constantes individuales así como las energías de activación, es decir, ocho parámetros en total ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $E_1$ ,  $E_{-1}$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ).

En el trabajo de Aguirre-Martínez se demostró que al intentar resolver la ecuación 1.56 y obtener así el valor para cada una de las constantes y las energías de activación (“Ajuste Global de 8 parámetros”), no era posible calcular los valores individuales de  $k_1$  y  $k_{-1}$ , así como sus energías de activación ( $E_1$  y  $E_{-1}$ ), puesto que se generan incertidumbres demasiado grandes. Sin embargo, también se demostró que el cociente de  $k_{-1}$  y  $k_1$  era una constante ( $K_d = k_{-1}/k_1$ ) y era posible obtenerla



así como también la diferencia entre las energías de activación  $\Delta E = E_{-1} - E_1$ , por lo que los parámetros a ajustar son sólo seis ( $K_d, k_2, k_3, \Delta E, E_2, E_3$ ) y la ecuación que se utiliza es la 1.58 (“Ajuste global de 6 parámetros”).

A diferencia del trabajo de Di Cera, esta metodología presenta la ventaja de no hacer ninguna consideración previa al análisis de datos acerca de los valores de constantes individuales ni energías de activación. Los resultados del trabajo de Aguirre-Martínez demostraron que la tercera suposición de Di Cera (el paso limitante en la hidrólisis de ésteres es la desacilación) no es válida para los ésteres con modificaciones<sup>10</sup>, para los cuales el paso limitante es la acilación.

## 2.5. MEDICIÓN EXPERIMENTAL DE LAS VELOCIDADES DE REACCIÓN

Para conocer la velocidad de reacción, es necesario conocer cómo cambia la concentración de un reactivo en función del tiempo. De acuerdo con el tipo de análisis que se realiza, los métodos pueden ser *químicos* o *físicos* (Levine, 1999).

En los *métodos químicos* se colocan varias celdas de reacción a temperatura constante, con las mismas concentraciones de reactivos. A determinados tiempos se detiene la reacción<sup>11</sup> y se analiza la composición de la mezcla, con diversos métodos analíticos como espectrometría de masas y cromatografía de gases o líquidos.

Los *métodos físicos* analizan una propiedad del sistema que varíe con el tiempo y no directamente la composición química. Entre estos métodos se encuentran la medición de la presión  $P$  del sistema para reacciones en fase gaseosa, conductividad eléctrica para reacciones con especies iónicas en disolución o rotación óptica si alguna especie es ópticamente activa. Si una especie presenta una banda de absorción espectroscópica puede seguirse la intensidad de ésta. Como las reacciones químicas están asociadas a un cambio de calor, otra manera de seguir las reacciones es mediante calorimetría.

---

<sup>10</sup> BAEE y ZLysONp.

<sup>11</sup> Entre los métodos para detener la reacción se encuentran: adición de un inhibidor, dilución abundante, enfriamiento, entre otros.

Dependiendo si el sistema de reacción se encuentra abierto o cerrado, los métodos pueden ser *estático* o *de flujo continuo*. Si la celda de reacción se mantiene cerrada se trata del *método estático*. Por el contrario, en *flujo continuo* los reactivos fluyen continuamente a la celda de reacción y los productos hacia el exterior, para crear condiciones de estado estacionario. Si la reacción es muy rápida (con un tiempo de vida media del orden de  $10^1$  a  $10^{-3}$  s) normalmente se utiliza el flujo continuo.

## 2.6. CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC)

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC por sus siglas en inglés, *Isothermal Titration Calorimetry*) es una herramienta que debido a su alta sensibilidad, posee diversas ventajas sobre otras técnicas en el monitoreo de las reacciones enzimáticas. Al ser una técnica que permite obtener directamente el calor absorbido o liberado durante el transcurso de una reacción química, ITC es capaz de proveer información de manera rápida, precisa y sin necesidad de modificar a los reactivos (Ghai, Falconer, & Collins, 2012). Además, ya que toda reacción química va acompañada con un cambio en energía, permite el estudio de una gran variedad de sistemas.

Hasta hace algunos años, ITC era considerada una técnica muy especializada a la que pocos laboratorios tenían acceso. Hoy en día, es ampliamente utilizada en una gran variedad de aplicaciones que van desde el diseño de fármacos hasta la química de polímeros y desde biología celular hasta nanotecnología (Ababou & Ladbury, 2006; Thomson & Ladbury, 2004).

### 2.6.1. FUNCIONAMIENTO Y FUNDAMENTO TERMODINÁMICO

Un Calorímetro de Titulación Isotérmica (ver figura 2.6) opera de acuerdo al principio de compensación de potencia (Hansen, Lewis, & Eatough, 1985), es decir, la señal observada es directamente proporcional a la potencia requerida para mantener una diferencia de temperatura entre la celda de referencia y la celda de reacción igual a cero.

El calorímetro de titulación isotérmica mide el calor absorbido o liberado en muestras líquidas como resultado de mezclar a los reactivos. Una jeringa se utiliza para inyectar a uno de los reactivos y a su vez funciona como agitador de la mezcla. Un par de celdas idénticas se encuentran dentro de

una cubierta adiabática, una de ellas contiene agua y la otra contiene a la mezcla de reacción. Antes de la inyección, la diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) entre ambas celdas es prácticamente cero, al inyectar el reactivo con la jeringa, se produce un cambio en la temperatura de la celda que contiene la mezcla de reacción debido al calor que ésta genera (o absorbe). El equipo mide la potencia necesaria ( $dP$ ) para mantener la  $\Delta T = 0$ , la señal es detectada y emitida por el software del equipo.

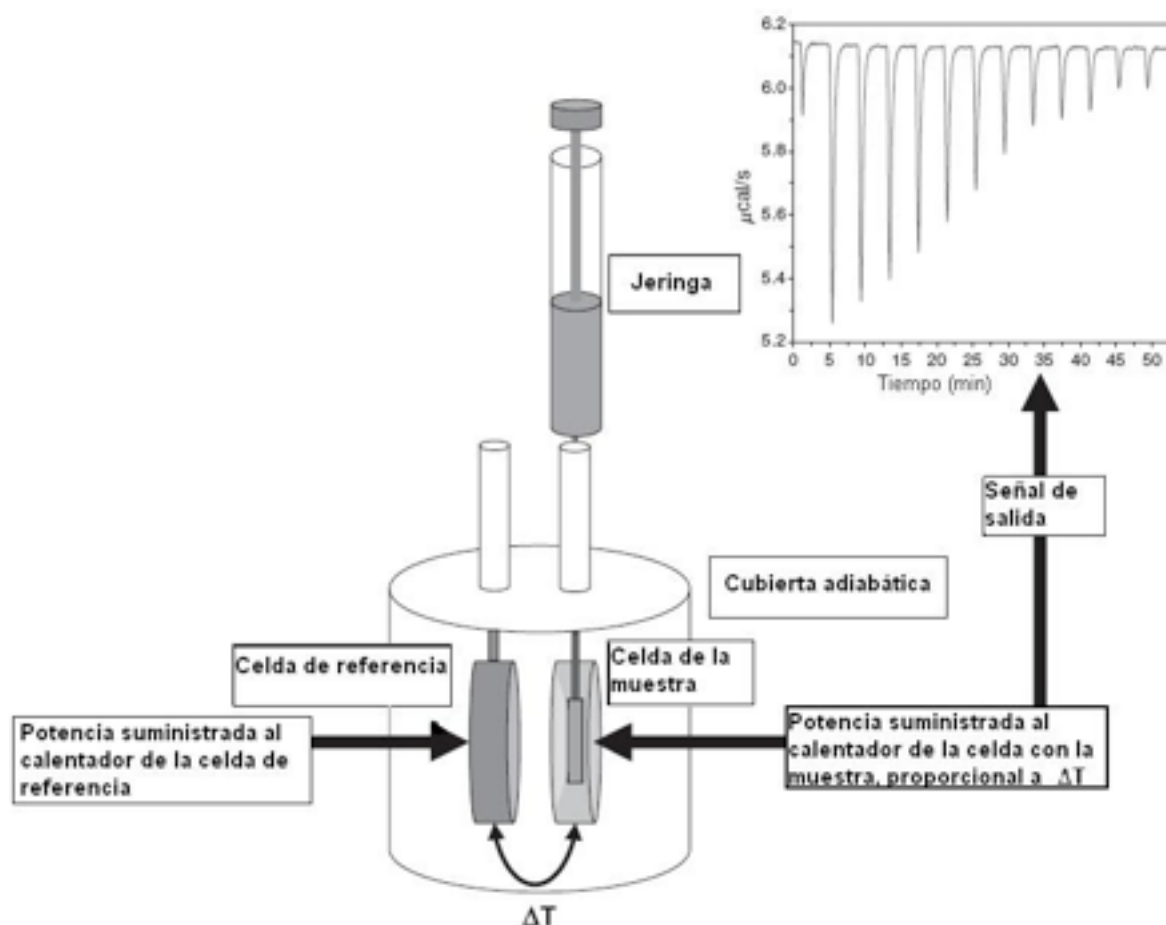


Figura 2.6. Un Calorímetro de Titulación Isotérmica en funcionamiento (Freyer & Lewis, 2008).

Usualmente, el ligante (sustrato) se encuentra en la jeringa mientras que la macromolécula se encuentra en la celda. Si la reacción es exotérmica, al inyectar el ligante la señal emitida será negativa, puesto que el equipo deja de suministrar potencia ( $dP < 0$ ) para mantener una  $\Delta T = 0$ . Por el contrario, cuando ocurre una reacción endotérmica la señal observada es positiva ya que se requiere administrar potencia ( $dP > 0$ ) para mantener la temperatura de la celda de reacción igual a la de referencia.

El calor ( $Q$ ) medido como función del tiempo es la potencia térmica,  $P$  (Todd & Gomez, 2001):

$$P = \frac{dQ}{dt} \quad (1.59)$$

El calor asociado a la conversión de  $n$  moles de sustrato a producto está dada por:

$$Q = n \cdot \Delta H \quad (1.60)$$

Ya que  $n = [P]_{total} \cdot V$ , el calor queda como:

$$Q = [P]_{total} \cdot V \cdot \Delta H \quad (1.61)$$

Donde  $V$  es el volumen total de la solución en la celda de reacción,  $[P]_{total}$  es la concentración del producto total generado y  $\Delta H$  es la entalpía molar determinada experimentalmente. Si se deriva respecto al tiempo la Ec. 1.61, se obtiene:

$$P = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta H \quad (1.62)$$

Para obtener la velocidad como función de la potencia, se reorganiza la Ec. 1.62 para obtener:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad (1.63)$$

Para obtener una curva de Michaelis-Menten, es necesario obtener el  $\Delta H$  y conocer la concentración del sustrato. En la figura 2.7 se muestra un experimento utilizando el método de una inyección.

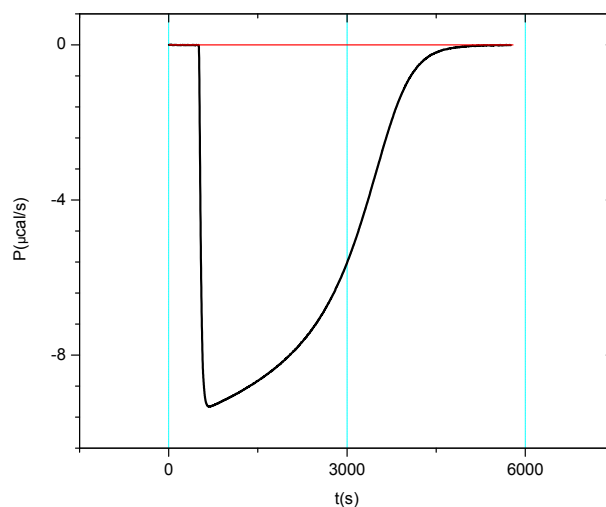


Figura 2.7. Hidrólisis de LAEE catalizada por tripsina a 25°C seguida por ITC.

Es posible obtener el valor de  $\Delta H$  al integrar la potencia sobre la línea base:

$$\Delta H = \frac{1}{[S]_{total} \cdot V} \int_{t=0}^t \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (1.64)$$

Para conocer la concentración del sustrato en cada tiempo, primero se hace un balance de materia:

$$[S]_0 = [P]_t + [S]_t \quad (1.65)$$

donde  $[S]_0$  es la concentración inicial de sustrato,  $[P]_t$  y  $[S]_t$  son las concentraciones de producto y sustrato, respectivamente, al tiempo  $t$ . Despejando el término  $[S]_t$  de la Ec. 1.65, se obtiene:

$$[S]_t = [S]_0 - [P]_t \quad (1.66)$$

$$[P]_t = \frac{Q_t}{V \cdot \Delta H} \quad (1.67)$$

Sustituyendo la Ec. 1.67 en la Ec. 1.66 y expresando al calor como la integral de la potencia térmica, se puede obtener una expresión para calcular  $[S]_t$  como función de la potencia:

$$[S]_t = [S]_0 - \frac{\int_{t=0}^t \frac{dQ}{dt} dt}{V \cdot \Delta H} \quad (1.68)$$

$$[S]_t = [S]_0 - \frac{\int_{t=0}^t P(t) dt}{V \cdot \Delta H} \quad (1.69)$$

De manera que con una curva de ITC es posible obtener una de Michaelis-Menten utilizando el *método de mínimos cuadrados* no-lineal y obtener así las constantes  $k_{cat}$  y  $K_m$ .

Es necesario mencionar que los datos que se obtienen incluyen las contribuciones de calor de dilución. Es necesario realizar un blanco donde sólo se inyecte buffer a la celda, y sustraer este resultado de los datos finales.

Entre las ventajas de ITC sobre otras técnicas, se encuentran:

- La independencia de métodos ópticos, es decir, no existe necesidad de utilizar sustratos con cromóforos. Muchas veces los sustratos no son activos en UV, por lo que se requiere modificarlos para estudiarlos por este método. Sin embargo, esto puede alterar las propiedades del sustrato y por consecuencia, su interacción con la enzima.

- Se requieren pequeñas cantidades de los reactivos (concentraciones menores o iguales que  $10^{-3}M$ ; Haq, 2005).

- Además, la velocidad se calcula directamente, no como la derivada de alguna cantidad (Ghai, et al., 2012).

## 3. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

La hidrólisis de L-lisina-*p*-nitroanilida catalizada por tripsina sigue el comportamiento de los sustratos nativos con enlace de amida. Entonces, la reacción será más eficiente que la de los ésteres y el paso limitante en el mecanismo será la acilación<sup>12</sup>.

### Objetivo general

Caracterizar el mecanismo de hidrólisis de LKPNA mediante  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus* utilizando Calorimetría de Titulación Isotérmica.

### Objetivos particulares

Determinar las constantes microscópicas de velocidad del mecanismo de la hidrólisis de una amida catalizada por la  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus*.

Comparar los resultados de la hidrólisis de la amida con los resultados de la hidrólisis de ésteres obtenidos en trabajos previos.

Determinar los parámetros termodinámicos de activación para cada paso del mecanismo.

---

<sup>12</sup> La veracidad o falsedad de estas hipótesis se discutirá en la sección 6.6.

## 4. Sección experimental

### 4.1. MATERIALES

La  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus* así como el sustrato, di-hidrobromuro de l-lisina-*p*-nitroanilida, y los reactivos empleados en la elaboración del buffer (Tris-HCl, PEG y CaCl<sub>2</sub>), se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El agua utilizada fue primero destilada y posteriormente desionizada hasta obtener un valor de 18 m $\Omega$  a 25°C.

La actividad de la enzima fue cuantificada mediante un ensayo de actividad enzimática con un sustrato de naturaleza conocida, BAEE, mediante el protocolo de Sigma-Aldrich:

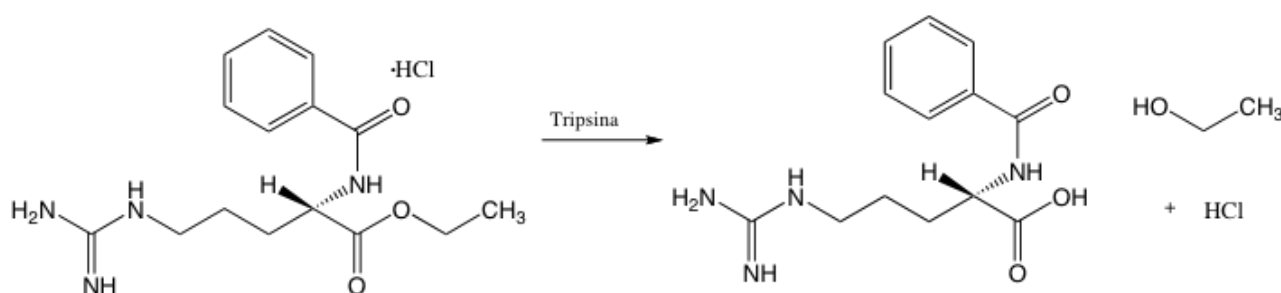


Figura 4.1. Reacción de hidrólisis de BAEE catalizada por tripsina.

Condiciones:  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\lambda = 253\text{ nm}$

Buffer: Tris-HCl (200 mM), CaCl<sub>2</sub> (50 mM), PEG (0.2% m/V), pH = 8.0

200  $\mu\text{l}$  de una disolución de tripsina (500 u/ml) fueron añadidos a 3.0 ml de la disolución de BAEE (0.23 mM). Inmediatamente, 1.0 ml de la mezcla de reacción se traspasó a una celda de cuarzo de ( $l = 1\text{ cm}$ ). Se midieron los cambios en la absorbancia de la mezcla a 25°C, detectando la aparición del producto ( $\lambda = 253\text{ nm}$ ) durante 5 minutos. Se realizaron 6 réplicas del ensayo, considerando un promedio de los datos.

La concentración de la enzima se determina de la siguiente manera:

$$A = \epsilon l C \quad (4.1)$$



$$\frac{dA}{dt} = \epsilon l C \quad (4.2)$$

$$V_0 = \frac{dC}{dt} = \frac{1}{\epsilon l} \frac{dA}{dt} \quad (4.3)$$

$$[E] = V_0 \cdot \frac{K_M + [S]_0}{K_{cat} [S]_0} \quad (4.4)$$

Se encontró que la tripsina tenía un 90.2% de pureza.

## 4.2. EQUIPOS

**UV:** Espectrofotómetro de UV-visible, modelo Cary 50 Bio.

**ITC:** Microcalorímetro de Titulación Isotérmica de Microcal, VP-ITC (GE).

**DSC:** Microcalorímetro de Barrido Diferencial con automuestreador de Microcal, VP-DSC (GE).

## 4.3. EMPLEO DE ITC

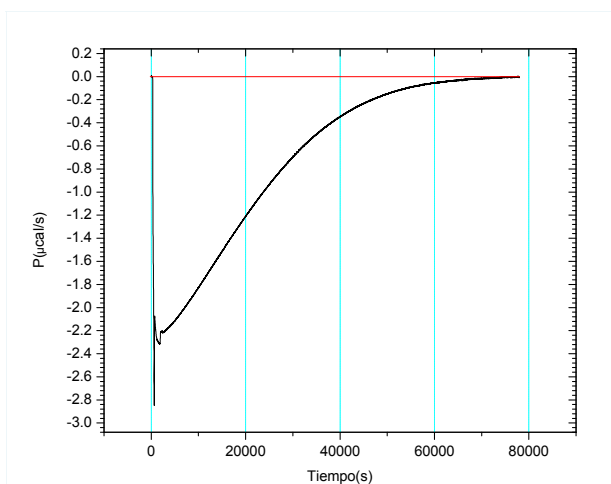


Figura 4.2. Termograma de la hidrólisis de LKPNA catalizada por tripsina a 25°C obtenido con ITC.

Debido a la alta concentración de tripsina requerida para la hidrólisis de LLPNA, la enzima fue colocada en la jeringa (0.4 mM) y fue inyectada (200  $\mu$ l) en la celda de reacción, la cual contenía al sustrato (6.0 mM), de tal forma que las concentraciones finales después de la inyección fueran 50  $\mu$ M de la enzima y 5.33 mM del sustrato. Tanto el sustrato como la enzima se encontraban en un mismo buffer (Tris-HCl 200 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM, PEG 0.2% m/V, pH = 8.0). Se realizaron 8 experimentos cubriendo el intervalo de temperaturas desde 10 a 45°C, en intervalos de 5°C, a

una velocidad de agitación de 550 rpm y un tiempo de inyección de 390 s.

La figura 4.2 muestra el termograma que se obtiene de la hidrólisis de LKPNA catalizada por tripsina a 25 °C obtenido mediante ITC. El equipo proporciona directamente la potencia como función del tiempo. La línea base (mostrada en rojo) se ajusta utilizando el software de Origin. Los termogramas de cada una de las temperaturas así como su respectivo ajuste al modelo de Michaelis-Menten se muestran en el Apéndice (ver pág. 59).

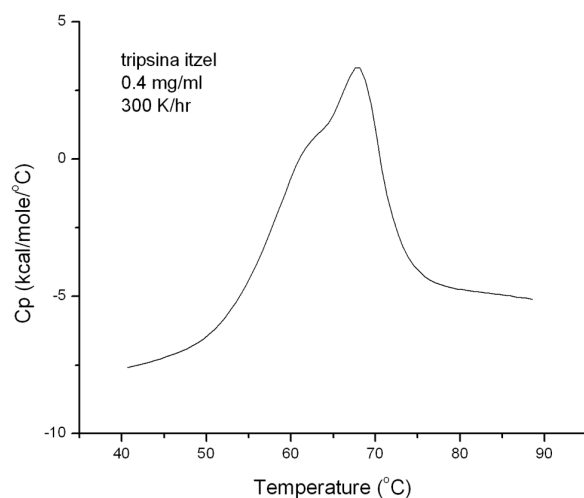


Figura 4.3. Termograma de la  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus* a una velocidad de barrido de 300 K/hr obtenido mediante DSC.

#### 4.4. EMPLEO DE DSC

Con el objetivo de determinar el rango de temperaturas al cual es posible trabajar con la tripsina sin que ésta se desnaturalice, se llevaron a cabo dos experimentos en Calorimetría de Barrido Diferencial. Se obtuvieron las curvas en el rango de temperaturas de 10 a 90 °C de una disolución de tripsina (0.4 mg/ml) en el mismo buffer utilizado en los experimentos de ITC, a una velocidad de barrido de 90K/h así como a una velocidad de 300 K/h.

En la figura 4.3 se muestra la traza calorimétrica obtenida con DSC a una velocidad de 300K/hr. Como puede observarse, la desnaturalización de la tripsina es manifiesta arriba de los 50 °C, por lo cual es posible trabajar con la tripsina hasta los 45 °C sin que ocurra desnaturalización.

## 5. Tratamiento de datos

### 5.1. OBTENCIÓN DE LAS CONSTANTES Y LAS ENERGÍAS DE ACTIVACIÓN

En este trabajo se utilizó el método de Aguirre-Martínez el cual, como se mencionó en la sección 2.5, consiste en utilizar la dependencia de la constante de velocidad con la temperatura, para hacer un ajuste simultáneo de las curvas de Michaelis-Menten a distintas temperaturas:

$$\frac{v}{[E]_0} = \frac{\left( \frac{k_2 k_3 \exp\left(-\frac{E_2 + E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)}{k_2 \exp\left(-\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) + k_3 \exp\left(-\frac{E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)} \right) [S]}{\left( \frac{K_d k_3 \exp\left(\frac{-\Delta E + E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)}{\left( k_2 \exp\left(-\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) + k_3 \exp\left(-\frac{E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right) \right) + [S]} \right)} \quad (5.4)$$

De la Ec. 5.4, se pueden ajustar las energías de activación ( $\Delta E$ ,  $E_2$  y  $E_3$ ) y las constantes de velocidad ( $K_d$ ,  $k_2$  y  $k_3$ ). La temperatura de referencia  $T_0$  se toma como 298 K y  $v/[E]_0$  a cada temperatura se obtiene de los experimentos en ITC. Para hacer el ajuste simultáneo, el Script de Origin utilizado es el siguiente:

```
R=0.00831;
T=298.15;
A=(((1/x)-(1/T))/R);
BD1=KD1*EXP(-1*DE1*A);
B2=K2*EXP(-1*E2*A);
B3=K3*EXP(-1*E3*A);
KCAT=(B2*B3)/(B2+B3);
KM=(BD1*B3)/(B2+B3);
V1=(KCAT*S)/(KM+S);
V2=(KCAT*S)/(KM+S);
...
V8=(KCAT*S)/(KM+S);
y=(AP*V1)+(AQ*V2)+(AR*V3)+(AS*V4)+(AT*V5)+(AU*V6)+(AV*V7)+(AX*V8)
/*END
```

En el cual las variables son las siguientes:

R: es la constante Universal de gas ideal, en unidades de kJ/Kmol

T: es la temperatura de referencia del sistema en K, en este caso 25°C.

A: es una variable que se utiliza para simplificar la Ec. 5.5, en este caso  $A = \frac{1}{R} \left( \frac{1}{x} - \frac{1}{T} \right)$ , don-

de x es la temperatura de trabajo.

BD1: es la expresión de  $K_d$  en función de la temperatura, es decir

$BD1 = K_d \exp \left( -\frac{\Delta E}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right)$ . B2 y B3 son las expresiones de  $k_2$  y  $k_3$ , respectivamente, en fun-

ción de la temperatura.

KCAT y KM son las constantes  $k_{cat}$  y  $K_m$  expresadas en términos de BD1, B2 y B3.

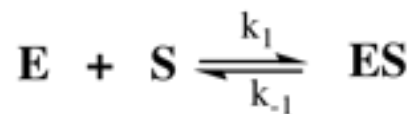
$V_i$ , donde i va de 1 hasta 8, representa la velocidad sobre la concentración inicial de enzima,  $V/[E]_0$ , queda expresada en términos de las constantes  $k_{cat}$  y  $K_m$ , y de la concentración de sustrato [S].

La función “y” es una función global, la cual representa también velocidad sobre concentración del sustrato,  $V/[E]_0$ . Se utiliza para que todas las curvas compartan parámetros (constantes y energías de activación). A su vez los términos AP, AQ...AX se fijan en 0 y 1, para crear una matriz que asegure la asignación de una curva para cada temperatura (Ver Apéndice).

## 5.2. OBTENCIÓN DE LA ENTROPÍA, LA ENERGÍA LIBRE Y LA ENTALPÍA DE ACTIVACIÓN

### 5.2.1. OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE ACTIVACIÓN PARA EL PASO I

Bajo ciertas condiciones, la formación del complejo ES (Paso 1) puede considerarse un equilibrio, por lo que puede utilizarse la ecuación de Van't Hoff para la obtención de los parámetros en este paso. La formación del complejo ES:



Tiene una constante  $K_d^o = \frac{k_{-1}^o}{k_1^o}$ . La energía de activación para un proceso en disolución está

dada por  $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$  donde  $\Delta H^\ddagger$  es la entalpía de activación, y el término  $RT$  a  $T = 25^\circ\text{C}$  tiene un valor de 2.48 kJ/mol (Levine, 1999). La energía para la formación del complejo ES queda entonces como:

$$\Delta E_1 = E_{-1} - E_1 \quad (5.6)$$

$$\Delta E_1 = (\Delta H_{-1}^\ddagger + RT) - (\Delta H_1^\ddagger + RT) = \Delta H_{-1}^\ddagger - \Delta H_1^\ddagger \quad (5.7)$$

El cambio de energía para el paso 1 del mecanismo es una diferencia entre las entalpías de formación y disociación del complejo ES:

$$\Delta E_1 = \Delta\Delta H_1^\ddagger = \Delta H_{-1}^\ddagger - \Delta H_1^\ddagger \quad (5.8)$$

La ecuación de Van't Hoff para este proceso:

$$\frac{d \ln K_d}{dT} = \frac{\Delta\Delta H_1^\ddagger}{RT^2} \quad (5.9)$$

Integrando la Ec. 5.9 y considerando a la entalpía independiente de la temperatura, se obtiene:

$$\ln K_d - \ln K_d^o = \frac{-\Delta\Delta H_1^\ddagger}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (5.10)$$

La Ec. 5.10 puede escribirse de tal forma que quede una ecuación de línea recta:

$$\ln K_d = \left( \ln K_d^o + \frac{\Delta\Delta H_1^\ddagger}{RT_0} \right) - \frac{\Delta\Delta H_1^\ddagger}{R} \frac{1}{T} \quad (5.11)$$

El valor de  $\Delta\Delta H_1^\ddagger$  puede obtenerse tanto de la ordenada al origen como de la pendiente. Para obtener el valor de la energía libre de Gibbs, se puede utilizar la relación con la constante de equilibrio:

$$\Delta\Delta G_{1,T_0}^\ddagger = -RT_0 \ln K_d \quad (5.12)$$

Como  $\Delta\Delta G_{1,T_0}^\ddagger = \Delta\Delta H_1^\ddagger - T\Delta\Delta S_1^\ddagger$ , es posible obtener también el valor de la entropía:

$$\Delta\Delta S_1^\ddagger = \frac{\Delta\Delta H_1^\ddagger - \Delta\Delta G_{1,T_0}^\ddagger}{T} \quad (5.13)$$

### 5.2.2. OBTENCIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE ACTIVACIÓN PARA LOS PASOS 2 Y 3

Para los pasos 2 y 3, es posible utilizar la Ecuación de Eyring. Esta ecuación deriva del tratamiento para una reacción bimolecular. Como puede observarse en el mecanismo, en ambos pasos ocurren reacciones que involucran dos especies. En el paso 2 (acilación), ocurre un ataque nucleofílico de la Serina hacia el carbonilo del sustrato. En el paso 3, ocurre la hidrólisis de la acil-enzima, por lo que el agua interviene como nucleófilo.

Es posible obtener la energía libre de Gibbs de activación para los pasos 2 y 3, utilizando la ecuación de Eyring:

$$k_i = \frac{k_B}{h} T e^{-\Delta G_i^\ddagger / RT} \quad (5.14)$$

Ya que  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$ , la Ec. 5.14 puede escribirse como:

$$k_i = \frac{k_B}{h} T e^{-\Delta H^\ddagger/RT} e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad (5.15)$$

$$\frac{k_i}{T} = \frac{k_B}{h} e^{-\Delta H^\ddagger/RT} e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad (5.16)$$

Si se aplica logaritmo natural a la Ec. 5.16 y luego se reordena, puede quedar con la forma de una línea recta:

$$\ln \frac{k_i}{T} - \ln \frac{k_B}{h} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (5.17)$$

Al graficar  $\ln \frac{k_i}{T} - \ln \frac{k_B}{h}$  contra  $\frac{1}{T}$ , se puede obtener la entalpía de activación ya que la pendiente  $m = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R}$  y la entropía de activación se obtiene del valor de la ordenada al origen  $b = \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$ . El valor de la energía libre de Gibbs de activación se obtiene de la ecuación  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$ , una vez que se tienen los valores de entalpía y entropía de activación.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. PARÁMETROS DE MICHAELIS-MENTEN

Se estudió la cinética de la hidrólisis de LKPNA con la tripsina de *Bos taurus* mediante ITC. La Tabla 6.1 muestra los parámetros de Michaelis-Menten de la hidrólisis de LKPNA a distintas temperaturas. Debido a que estas constantes no son de una reacción elemental, no necesariamente deberían aumentar con la temperatura, aunque así ocurra en los tres casos. El valor de  $k_{cat}$  tan pequeño indica una reacción muy lenta, mientras que el valor relativamente grande de  $K_m$  indica la pobre afinidad de la enzima por el sustrato.

T (°C)	$k_{cat}$ (ms <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$K_s$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
10	3.21	2.63	1.22
15	3.98	2.20	1.81
20	7.31	3.47	2.11
25	13.65	4.26	3.20
30	18.56	5.25	3.53
35	26.29	5.65	4.65
40	68.60	14.99	4.58
45	81.76	10.45	7.82

Tabla 6.1. Constantes de Michaelis-Menten de la hidrólisis de LKPNA a distintas temperaturas obtenidas mediante ITC.



## 6.2. COMPARACIÓN CON LOS ÉSTERES DE LISINA

Siendo LKPNA un sustrato con un enlace de amida, más parecido al sustrato natural de la tripsina que los ésteres, se podría esperar una  $k_{cat}$  mayor que la de éstos. Por otro lado, ya que la energía de activación de la hidrólisis de amidas suele ser bastante alta, también podría ocurrir que la  $k_{cat}$  del LKPNA sea menor que la de los ésteres.

Como puede observarse en la tabla 6.2, la  $k_{cat}$  es 3 órdenes de magnitud más pequeña para el LKPNA que para los ésteres. Para explicar esto es necesario tomar en cuenta dos aspectos. En primer lugar, aunque el enlace de LKPNA es de una amida, no es tan parecido al sustrato natural debido a la presencia del grupo nitro y, técnicamente, no es un enlace peptídico<sup>13</sup>. En segundo lugar, para comparar correctamente la eficiencia de ambas reacciones, se necesita conocer el valor de las constantes de velocidad de las reacciones no catalizadas ( $k_{non}$ ), lo que permite conocer el valor efectivo del aumento de velocidad ( $k_{cat}/k_{non}$ ).

<i>Sustrato</i>	$k_{cat} / s^{-1}$
LKPNA	0.013
LKME*	8.62
LKEE*	6.88

Tabla 6.2. Valores de  $k_{cat}$  y  $K_m$  a 25°C de la hidrólisis de los sustratos LKPNA, LKME y LKEE. \*(Aguirre-Martínez, 2011).

Aunque los valores de velocidad la hidrólisis espontánea de LKPNA no se encuentran reportados, se sabe que la hidrólisis espontánea de algunas amidas tienen un tiempo de vida media de cientos o incluso miles de años, con constantes  $k_{non}$  del orden de  $10^{-10} s^{-1}$  (Wolfenden, 2011). Por otro lado, la hidrólisis de ésteres de cadena corta como el acetato y el formiato de metilo, tienen constantes del orden de  $10^{-10} s^{-1}$  (Guthrie, 1973). Los valores de estas constantes pueden variar mucho con el pH, puesto que las hidrólisis tanto de amidas como de ésteres pueden ser catalizadas siguiendo un mecanismo ácido-base. Aún así, los valores de  $k$  tanto para amidas como para ésteres, oscilan en valores entre  $10^{-7}$  y  $10^{-5} s^{-1}$  (Robinson, 1990).

<sup>13</sup> El enlace peptídico es un enlace de amida entre dos aminoácidos.

Si se comparan los valores de  $k_{cat}/k_{non}$  con un aproximado de los valores reportados en la literatura para ésteres y amidas, el valor para LKPNA ( $\sim 10^8$ ) es menor que para los ésteres ( $\sim 10^{11}$ ). A diferencia de lo esperado, la hidrólisis de los ésteres es más eficiente que la de LKPNA.

### 6.3. AJUSTE GLOBAL

Los resultados del análisis simultáneo de las curvas de Michaelis-Menten de la hidrólisis de LKPNA a distintas temperaturas fueron obtenidos mediante un ajuste global de 6 parámetros, como el utilizado por Aguirre-Martínez en 2011. Se observó que las incertidumbres de los parámetros eran muy grandes. Posiblemente, este rango de incertidumbres se debe al rango de concentraciones y velocidad de reacción del sustrato LKPNA<sup>14</sup>.

El paso de desacilación en el mecanismo de la hidrólisis de LKPNA, coincide con el de la hidrólisis de los ésteres de lisina, ya que este paso no depende del sustrato inicial. Como puede observarse en los esquemas 6.1 y 6.2, los mecanismos coinciden en el paso de desacilación ( $k_3$ ) el cual es el mismo para los tres sustratos: LKPNA, LKME y LKEE.

Bajo la hipótesis de que el paso de desacilación es igual en los tres sustratos, es posible decir que tanto la constante como la energía de activación debería ser igual o similar para que LKPNA que para LKME y LKEE. Los valores para LKME son  $k_3 = 7.8 \text{ s}^{-1}$  y  $E_3 = 39.5 \text{ kJmol}^{-1}$ , mientras que para LKEE son  $k_3 = 9.6 \text{ s}^{-1}$  y  $E_3 = 33.6 \text{ kJmol}^{-1}$ , por lo que en efecto, la constante y energía de activación son muy similares para este paso, sin importar que el sustrato inicial es distinto. Para el caso de LKPNA, es entonces válido fijar los valores de  $k_3$  y  $E_3$  como un promedio entre los valores de LKME y LKEE,  $k_3 = 8.7 \text{ s}^{-1}$  y  $E_3 = 36.6 \text{ kJmol}^{-1}$ . Al hacer esto, las incertidumbres en los cuatro parámetros restantes se mantienen por debajo del 10%.

En la figura 6.2 se muestran las distintas curvas de Michaelis-Menten obtenidas en el rango de temperaturas de 10 a 45 °C. Las diferencias entre los resultados obtenidos al hacer el ajuste global de seis parámetros o el de sólo cuatro, son principalmente dos. La primera es que al hacer el ajuste de seis parámetros, las incertidumbres son altas. La segunda es que los valores que se obtienen al variar los seis parámetros son diferentes dependiendo el valor inicial que se toma antes de hacer las

---

<sup>14</sup> La hidrólisis de LKPNA a 25° C (Sustrato: 5.33mM, enzima: 50µM) toma alrededor de 24 horas para completarse.

iteraciones (i.e. no hay convergencia al mínimo global del paisaje de la función de error), mientras que los valores que se obtienen al hacer el ajuste de cuatro parámetros son siempre los mismos sin importar el valor de partida.

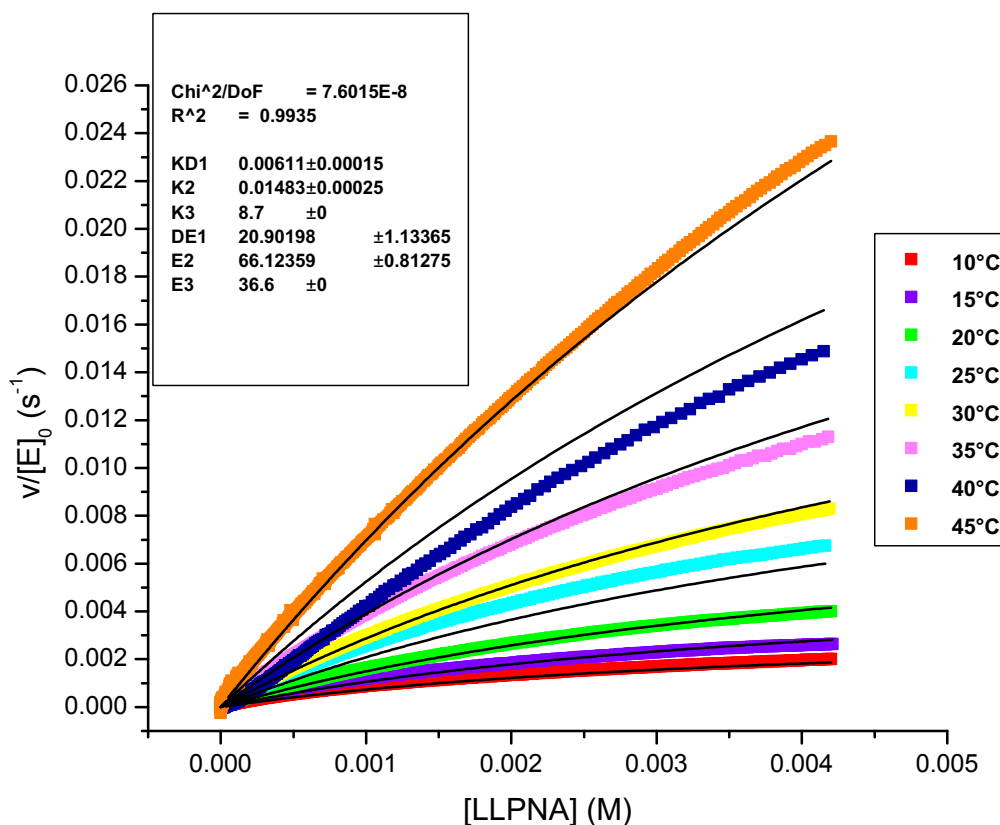


Figura 6.2. Ajuste global de 4 parámetros de la hidrólisis de LKPNA catalizada por la  $\beta$ -tripsina de *Bos taurus*. La línea negra es el ajuste con los datos calculados mientras que los cuadros son los datos obtenidos experimentalmente.

La tabla 6.3 muestra los resultados del ajuste global para los sustratos de lisina. LKPNA fue el obtenido en este trabajo mientras que LKME y LKEE son los obtenidos en el trabajo de Aguirre-Martínez. Como se puede observar, la  $K_d$  es aproximadamente del mismo orden para los tres sustratos, mientras que la  $k_2$  es tres órdenes de magnitud más pequeña para el LKPNA que para los sustratos tipo éster. Para el caso de las energías de activación, se puede observar que la  $\Delta E_1$  es unas 4 veces más pequeña para el LKPNA que los sustratos con enlace de tipo éster. La  $E_2$  es ligeramente más pequeña (32 kJ/mol) en el LKPNA que para los ésteres, aunque esto no implica que la  $k_2$  deba ser más grande.

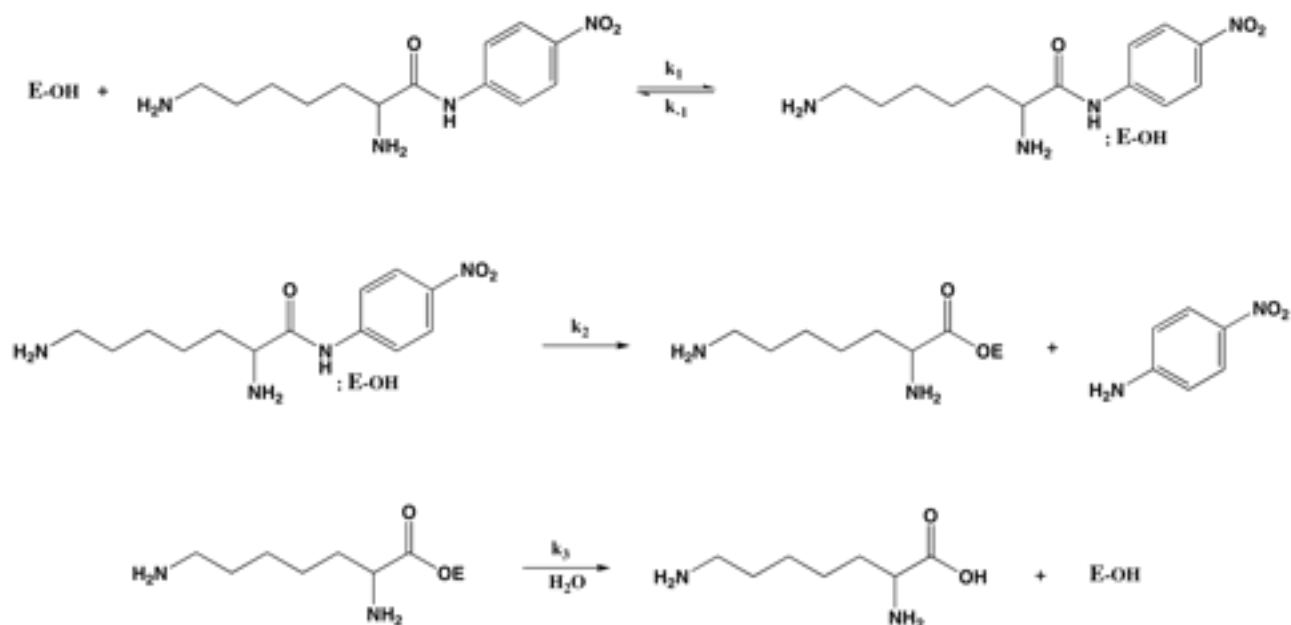
Parámetro	LKPNA	LKME	LKEE
$K_d / mM$	6.11	2.54	7.69
$k_2 / s^{-1}$	0.0148	58.8	84.6
$k_3 / s^{-1}$	8.7*	7.8	9.6
$\Delta E_1 / KJmol^{-1}$	20.9	88.3	80.17
$E_2 / KJmol^{-1}$	66.12	98.2	84.6
$E_3 / KJmol^{-1}$	36.6*	39.5	33.6

Tabla 6.3. Parámetros obtenidos del ajuste global de los sustratos LKPNA, LKME\*\* y LKEE\*\*. \*Parámetros fijos. \*\* (Aguirre-Martínez, 2011).

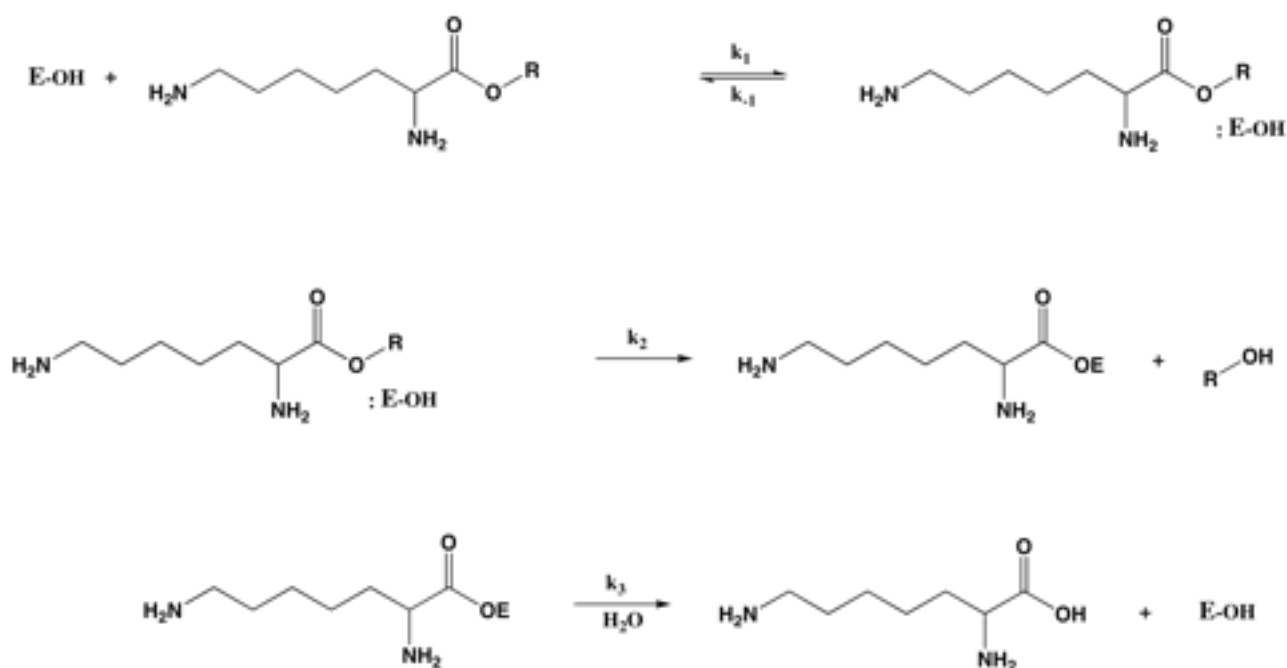
Ya que la  $K_d$  es muy similar en los ésteres y el LKPNA, puede decirse que la tripsina tiene afinidad similar por los tres sustratos, ya que los tres contienen lisina y éste aminoácido es el que se une al sitio de reconocimiento de la enzima. Sin embargo, es importante mencionar que, debido a la naturaleza del sustrato<sup>15</sup>, el grupo nitro podría afectar las interacciones enzima-sustrato, por estereoquímica y por ser un grupo aromático electroattractor.

La  $k_2$ , por otro lado, es muy pequeña para el LKPNA en comparación con los sustratos de tipo éster. Como puede observarse en el mecanismo (esquema 6.1), en el paso de acilación, se rompe un enlace de tipo amida y el grupo saliente es una amina, a diferencia de los ésteres, para los cuales el grupo saliente es un alcohol (esquema 6.2). Con estos datos puede decirse que el paso limitante en la hidrólisis de LKPNA es la acilación ( $k_2 \ll k_3$ ), con una velocidad determinada por la dificultad de la hidrólisis de un enlace de amida. Aunque el paso de desacilación es el mismo en los ésteres de lisina que en el LKPNA, queda como paso limitante en la hidrólisis de ésteres pues  $k_3 \ll k_2$ .

<sup>15</sup> El grupo nitro no se encuentra dentro de los sustratos que la tripsina hidroliza naturalmente. Por lo general, este grupo se añade a sustratos sintéticos con el fin de que sean activos en UV.



Esquema 6.1. Mecanismo de la hidrólisis de LKPNA con tripsina.

Esquema 6.2. Mecanismo de la hidrólisis de LKME ( $R = CH_3$ ) y LKEE ( $R = CH_2CH_3$ ) con tripsina.

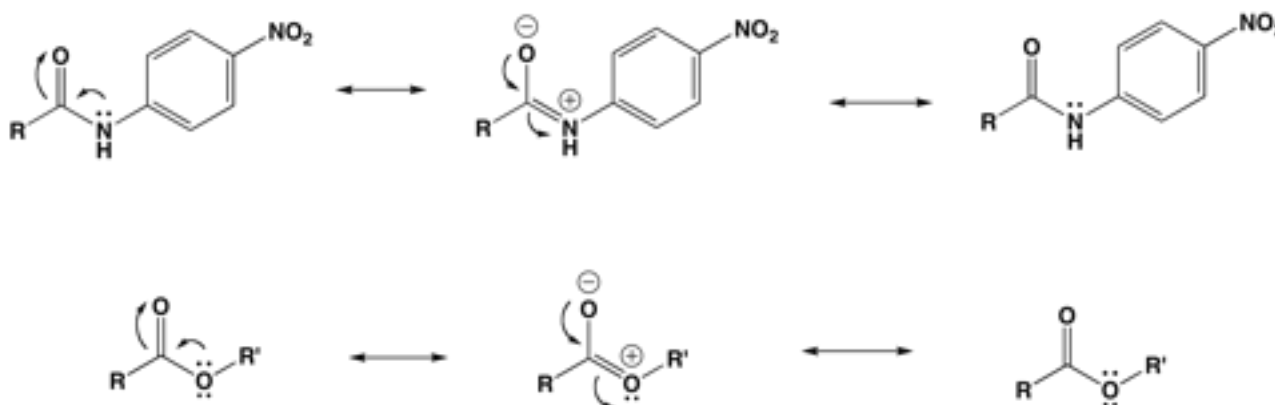
El enlace de amida es más fuerte que el enlace de éster debido a que la deslocalización del par electrónico del nitrógeno es más efectiva que la deslocalización del par electrónico del oxígeno pues el oxígeno es más electronegativo que el nitrógeno y, por lo tanto, el par del oxígeno queda menos disponible para entrar en resonancia.

En la tabla 6.4 puede observarse que aunque la energía del enlace C-N es menor que la del enlace C-O sencillo, la formación del enlace doble C=N es menor por lo que la deslocalización del par electrónico es más efectiva en el caso de la amida.

Tipo de enlace	Energía (kJ/mol)	Tipo de enlace	Energía (kJ/mol)
C-N	305	C-O	360
C=N	616	C=O	750

Tabla 6.4. Energías de enlace para C-N y C-O (Sykes, 2002).

Las estructuras resonantes de los sustratos de lisina se muestran a continuación:



$R = L\text{-Lys}$ ,  $R' = \text{CH}_3$  en LKME y  $R' = \text{CH}_2\text{CH}_3$  en LKEE.

Aunque existe un mayor número de estructuras resonantes para el LKPNA por efecto del grupo nitro aromático, no se mencionan en este diagrama ya que las estructuras predominantes serán las que se producen con el grupo carbonilo, debido a que son las más estables por cargas formales más cercanas y carga formal negativa en el átomo de oxígeno. La hidrólisis de una amida es más difícil que la de un éster debido a que la formación del enlace doble C-N es más efectiva<sup>16</sup> y, por lo tanto, existe una mejor deslocalización en el par electrónico del N, haciendo más difícil la hidrólisis de una amida. Además, es necesario mencionar que un alcohol es un grupo saliente más estable que una amida<sup>17</sup>.

<sup>16</sup> El C y el N son más similares en energía y simetría que el C y el O.

<sup>17</sup> En el mecanismo de la hidrólisis, en determinado momento hay una carga negativa en el átomo de N u O del grupo saliente. El átomo que estabiliza mejor esta carga es el O, aunque en realidad se protona antes de salir como alcohol.

Por todo lo mencionado en los párrafos anteriores, se puede explicar que la  $k_2$  de la hidrólisis de LKPNA es mucho más pequeña que en el caso de los ésteres. Incluso podría decirse que este paso es el limitante para la hidrólisis de una amida catalizada por tripsina, pero sería necesario estudiar la hidrólisis de más sustratos con este tipo de enlace para asegurarlo.

Un buen punto de comparación del valor de la constante del paso de acilación en la hidrólisis de amidas, es la quimotripsina. Los valores de la constante de velocidad para el paso de acilación de sustratos de tipo amida de bajo peso molecular catalizada por quimotripsina han sido determinados y oscilan alrededor de  $0.20 \text{ s}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  (Chiong, 1975). Por ejemplo, el valor de  $k_2$  para la hidrólisis de *N*-acetil-L-triptofanamida a  $\text{pH} = 7.9$ , tiene un valor de  $0.035 \text{ s}^{-1}$ , un valor muy cercano al de la  $k_2$  de la hidrólisis de LKPNA ( $0.013 \text{ s}^{-1}$ ).

Sin embargo, es importante mencionar que este valor es un promedio y que cada para cada sustrato, el valor de la constante es dependiente del pH y por supuesto de su estructura química. Además, recordemos que se trata de quimotripsina y no tripsina, que si bien son muy similares en su comportamiento y ambas poseen la misma tríada catalítica, no son exactamente la misma enzima.

En resumen, puede decirse que para el LKPNA en particular, la hidrólisis es menos eficiente que la de los ésteres. Primero, se trata de la hidrólisis de una amida, que aún con una catálisis sencilla de tipo ácido-base, es más difícil de lograr que la hidrólisis de un éster. Segundo, el LKPNA tiene un grupo nitro el cual, además de ser un grupo electroatractor, es aromático y tiene efectos electrónicos y de resonancia, que el metilo y el etilo no ocasionan en los ésteres. Para una mejor comparación se podría estudiar la hidrólisis de una amida L-lisina con una cadena no aromática.

Otro factor que puede afectar la interacción de LKPNA con la enzima es la orientación que presenta este sustrato cuando interacciona con la tripsina. La longitud de la cadena sustituyente en el enlace peptídico afecta en la conformación que adquiere la enzima al momento de formar el complejo enzima-sustrato. Si la tripsina no pudiera orientarse de tal forma que se una con cadenas lineales largas, entonces no podría hidrolizar los enlaces peptídicos de proteínas (sustrato natural).

Durante los experimentos, se intentó la hidrólisis de un tripéptido, Arg-Gly-Asp, el cual es más parecido a lo que podría hidrolizar la tripsina en la naturaleza, pero no se observó reacción al-

guna. Se esperaba que por ser un enlace peptídico, la hidrólisis ocurriera con mayor facilidad que la de LKPNA, pero esto no fue así, posiblemente debido a la longitud de la cadena, que no facilita las interacciones del sustrato con el sitio de reconocimiento de la enzima.

#### 6.4. OBTENCIÓN DE ENERGÍAS DE ACTIVACIÓN CON LOS GRÁFICOS DE ARRHENIUS

Ya que el trabajo de Di Cera resuelve los valores de las constantes con base en los gráficos de Arrhenius, con los datos de la hidrólisis de LKPNA no se podrían resolver siguiendo dicho procedimiento, puesto que el comportamiento observado es un aumento lineal con la temperatura, a diferencia de los sustratos de Di Cera, donde existe un máximo que indica un cambio de pendiente en los gráficos de Arrhenius de  $k_{cat}$  y  $K_s$ . Sin embargo, con estos datos es posible obtener el valor aproximado de energía de activación del paso lento de la reacción, haciendo algunas aproximaciones y sin necesidad de hacer un ajuste simultáneo de todos los datos.

La Figura 6.1 muestra los gráficos de Arrhenius de  $k_{cat}$  y  $K_s$ . Debido a que estas constantes no son de una reacción elemental, sino de una reacción compuesta, la energía de activación que se obtiene de cada gráfico viene dada por las energías de activación individuales.

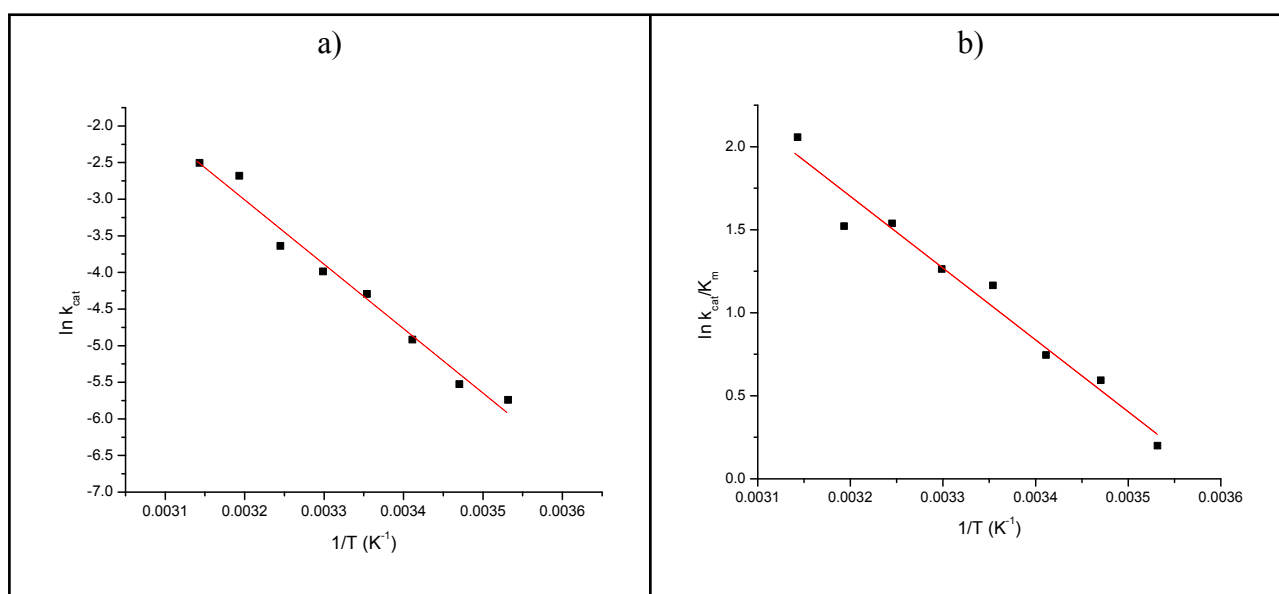


Figura 6.1. Gráfico de Arrhenius de  $k_{cat}$  (a) y de  $K_s$  (b).



Para el gráfico de  $k_{cat}$ , del ajuste con regresión lineal se obtiene la ecuación:

$$y = -8792.60x + 25.12 \quad (6.1)$$

De la cual puede obtenerse la energía de activación,  $E_a = 73.10 \text{ kJmol}^{-1}$ .

Como se demostró en la sección 6.3, para este sustrato  $k_3 \gg k_2$ , con lo cual  $k_{cat}$  puede reducirse a  $k_{cat} = k_2$  y esta energía de activación es una buena aproximación a la energía del paso de acilación ( $E_a \approx E_2$ ).

Del gráfico de  $K_s$ , se obtiene la ecuación:

$$y = -4322.66x + 15.53 \quad (6.2)$$

que corresponde a una Energía de Activación de  $E_a = 35.94 \text{ kJmol}^{-1}$ . Si se considera que la acilación es el paso lento de esta reacción, se puede decir que  $k_2 \ll k_{-1}$ , así que la  $K_s$  puede reducirse a:

$$K_s = \frac{k_1 k_2}{k_{-1}} = \frac{k_2}{K_d} \quad (6.3)$$

La energía de activación compuesta quedaría entonces como  $E_a = E_2 - E_d = 35.94 \text{ kJmol}^{-1}$ . El valor de la energía de activación para la formación del complejo ES sería entonces de  $E_d = 37.10 \text{ kJ/mol}$ . Estos valores son sólo aproximaciones, además de que el paso de formación del complejo es en algunas condiciones un equilibrio, en cuyo caso la ecuación de Arrhenius no sería válida.

La tabla 6.6 muestra la comparación entre las energías obtenidas con el ajuste simultáneo y las obtenidas con los gráficos de Arrhenius. Como puede observarse, los valores que se obtienen de los gráficos de Arrhenius son mayores que los obtenidos con el ajuste simultáneo. En el caso de  $E_2$ , la diferencia es de tan sólo  $6.98 \text{ kJmol}^{-1}$ , mientras que para  $\Delta E$  la diferencia es de  $16.2 \text{ kJmol}^{-1}$ . Estas diferencias indican que la aproximación de  $k_2 \gg k_3$  es válida para simplificar  $k_{cat}$  y obtener de manera rápida el valor de  $E_2$ . Sin embargo, el valor obtenido para  $\Delta E$  es muy diferente al que se ob-

tiene con el ajuste global. Posiblemente, esta diferencia se deba a que el valor de  $k_2$  sea muy similar al de  $k_{-1}$ , de tal forma que la aproximación  $k_2 \ll k_{-1}$  no sería válida, aunque esto no se puede saber ya que no se conoce el valor de  $k_{-1}$ .

Energía de activación	Valor obtenido con el Ajuste Simultáneo ( $\text{kJmol}^{-1}$ )	Valor obtenido de los gráficos de Arrhenius ( $\text{kJmol}^{-1}$ )
$\Delta E$	20.9	37.10
$E_2$	66.12	73.10

Tabla 6.6. Valores de energía de activación de la hidrólisis de LKPNA obtenidos con el ajuste simultáneo y con los gráficos de Arrhenius de  $k_{cat}$  y  $K_s$ .

El uso del gráfico de Arrhenius de  $k_{cat}$  es entonces una forma rápida de obtener el valor de una energía de activación aproximada para el paso lento de la reacción.

## 6.5. OBTENCIÓN DE $\Delta G$ , $\Delta H$ Y $\Delta S$ DE ACTIVACIÓN

Además de obtener las constantes para cada paso del mecanismo, con los datos obtenidos fue posible calcular los parámetros termodinámicos de activación. La figura 6.3 muestra un diagrama de las energías de activación que se obtienen con el procedimiento sugerido. Es necesario notar que no es posible obtener  $E_1$  y  $E_{-1}$  individuales, sino sólo la diferencia entre éstos. El  $\Delta E_{total}$  se representa negativo (reacción exergónica) ya que aunque no es posible calcularlo con exactitud, se sabe (con los experimentos en ITC) que el  $\Delta H_{total}$  de la reacción es negativo.

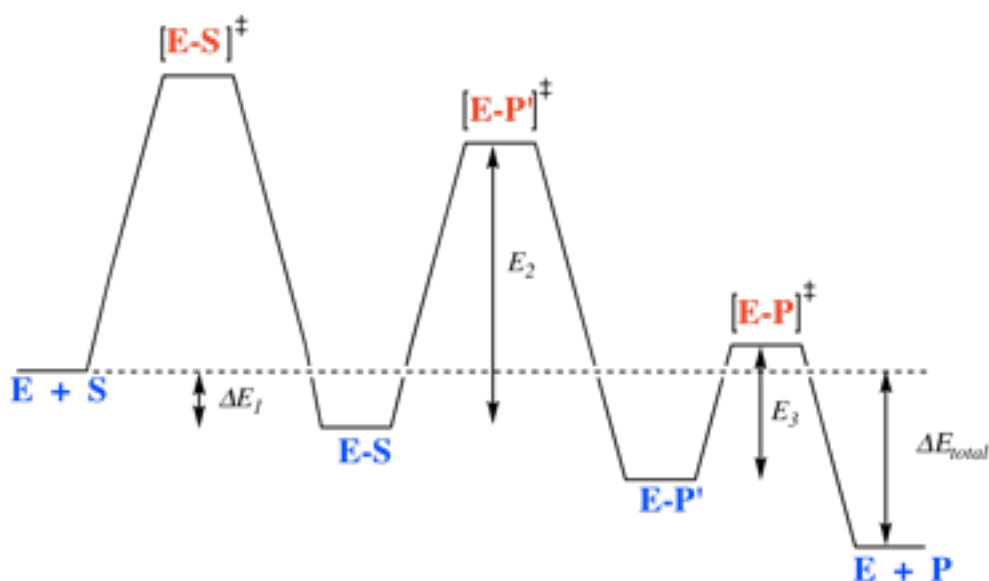


Figura 6.3. Diagrama aproximado de energías de activación durante la hidrólisis de LKPNA.

La tabla 6.6 muestra los parámetros termodinámicos para los sustratos LKPNA y los ésteres LKME y LKEE. Para el paso 1, como puede observarse, a pesar de que tienen un  $\Delta\Delta G^\ddagger$  similar, la entropía y la entalpía son menores en el caso del LKPNA.

<i>Parámetro</i>	<i>LKPNA</i>	<i>LKME*</i>	<i>LKEE*</i>
$\Delta\Delta G_1^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	12.64	14.81	12.07
$\Delta\Delta H_1^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	20.95	88.30	80.17
$\Delta\Delta S_1^\ddagger$ /JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	27.88	246.48	228.42
$\Delta G_2^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	83.47	62.92	62.02
$\Delta H_2^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	63.72	95.74	94.81
$\Delta S_2^\ddagger$ /JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	-66.27	110.09	109.98
$\Delta G_3^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	67.66	67.93	67.42
$\Delta H_3^\ddagger$ /kJmol <sup>-1</sup>	34.06	37.05	31.03
$\Delta S_3^\ddagger$ /JK <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>	-112.71	-103.56	-122.05

Tabla 6.6. Parámetros termodinámicos de activación para la hidrólisis de los sustratos de Lisina. \*(Aguirre-Martínez, 2011).

La diferencia más notable entre los sustratos de éster y el LKPNA, ocurre en el paso 2. La energía libre de Gibbs de activación es mayor en el LKPNA. A diferencia de los sustratos de éster, el término de entropía es negativo en el caso del LKPNA y, aunque la entalpía es menor para este sustrato, el valor de la entropía negativa hace que la energía libre de Gibbs sea mayor que la de los ésteres. Un valor de entropía negativa en el paso de acilación indica una pérdida en los grados de libertad rotacionales y traslacionales del complejo enzima-sustrato. Además, sugiere un paso de tipo asociativo durante la acilación. Dicho valor es consistente con el tipo de reacción que se lleva a cabo, adición nucleofílica en el carbono carbonílico (lento) seguida de una eliminación. Lo mismo ocurre en el paso 3.

Los parámetros del paso 3 son muy similares en los 3 sustratos, pero es necesario mencionar que dichos parámetros en el LKPNA se obtuvieron como un aproximado considerando que el paso 3 tiene los mismos intermediarios que los sustratos de tipo éster.

Los valores obtenidos concuerdan con la hipótesis de que en el caso de LKPNA, el paso lento es la acilación, ya que tiene una constante muy pequeña y un valor de energía de activación más alto que el de los sustratos de tipo éster.

## 6.6. VERIFICACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

Como se mencionó en la sección 3, al hacer este trabajo inicialmente se pensaba que por ser el LKPNA un sustrato con enlace de amida, debía parecerse más a un sustrato natural de la tripsina y por lo tanto la reacción debía ser más eficiente que la de los ésteres. Sin embargo, esta hipótesis resultó ser falsa ya que la hidrólisis de LKPNA es muy lenta y requiere de grandes cantidades de tripsina para llevarse a cabo. Aunque la tripsina ha evolucionado para hidrolizar los enlaces peptídicos, la hidrólisis de ésteres es más eficiente pues casi siempre la energía de activación en dichos compuestos no es tan alta como la de las amidas.

Por otro lado, se demostró que el paso limitante en la hidrólisis de LKPNA es la acilación, pues dicho paso tiene la energía de activación más alta. Esta hipótesis resultó ser verdadera y fue formulada en un principio con los datos de la literatura acerca de hidrólisis de amidas catalizada por serina proteasas.

## 7. Resumen de las observaciones y conclusiones

### 7.1. RESUMEN DE LAS OBSERVACIONES

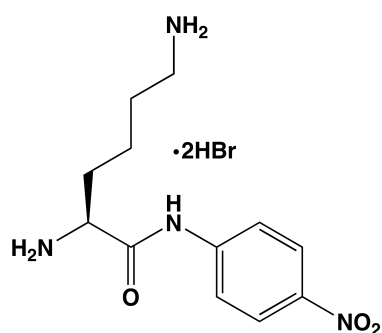
- La hidrólisis de LKPNA catalizada por tripsina es mucho más lenta que la hidrólisis de ésteres de lisina.
- Fue posible calcular los valores de las constantes y energías de los pasos 1 y 2 del mecanismo. Sin embargo, no fue posible determinar la constante y energía del paso de desacilación ( $k_3$  y  $E_3$ ) de la hidrólisis de LKPNA.
- Fue posible determinar los parámetros termodinámicos de activación ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) utilizando la ecuación de Van't Hoff para el paso 1 y la ecuación de Eyring para los pasos 2 y 3.

### 7.2. CONCLUSIONES

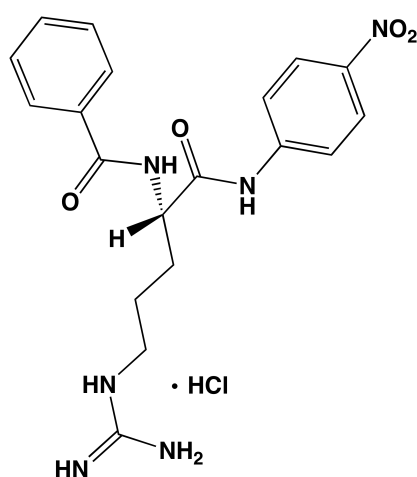
- Con los valores de energías de activación para el mecanismo de la hidrólisis de LKPNA obtenidos en este trabajo, puede concluirse que el paso limitante es la acilación (paso 2), a diferencia de los sustratos con enlace de tipo éster, donde el paso determinante es el 3 (desacilación).
- Posiblemente, el paso limitante en la hidrólisis de ésteres de lisina es distinto al del LKPNA debido a la naturaleza del grupo saliente en el paso de acilación (*p*-nitroanilina).

## 8. Trabajo futuro

- Realizar mediciones de velocidad de LKPNA utilizando espectroscopía de UV-visible para efectos de comparación.
- Estudiar el sustrato  $N\alpha$ -benzoíl-arginina-*p*-nitroanilida, para observar las diferencias entre el comportamiento de un sustrato de arginina con un sustituyente en la posición  $\alpha$  ( $N\alpha$ -benzoílo) con LKPNA.

L-lisina-*p*-nitroanilida

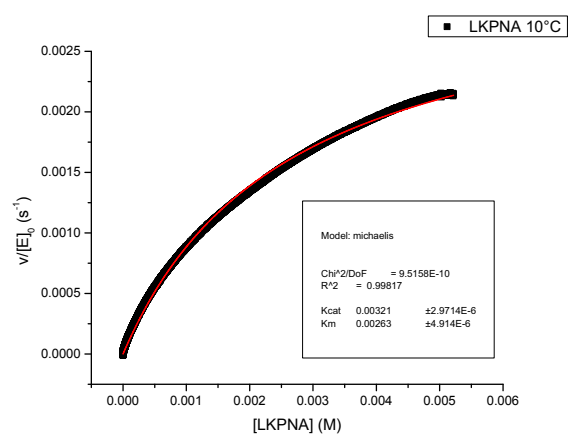
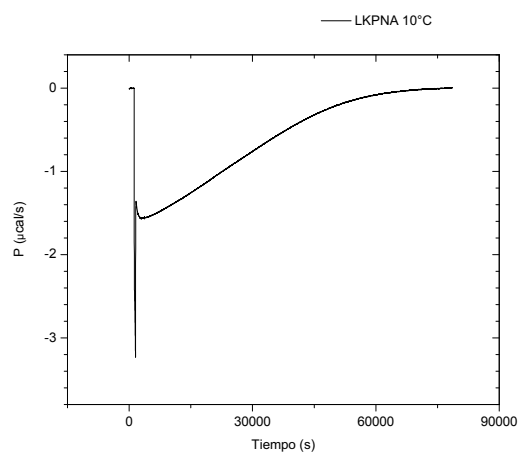
LKPNA

 $N\alpha$ -benzoil-arginina-*p*-nitroanilida

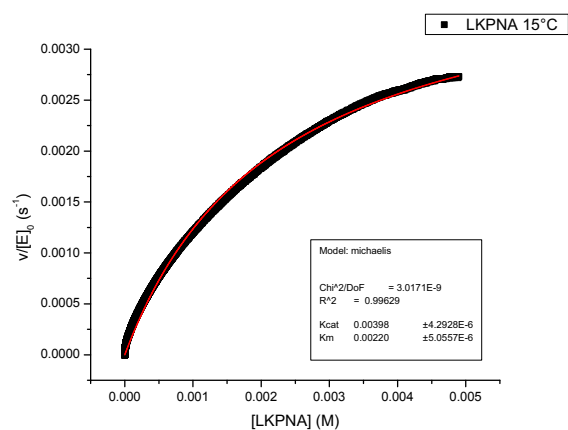
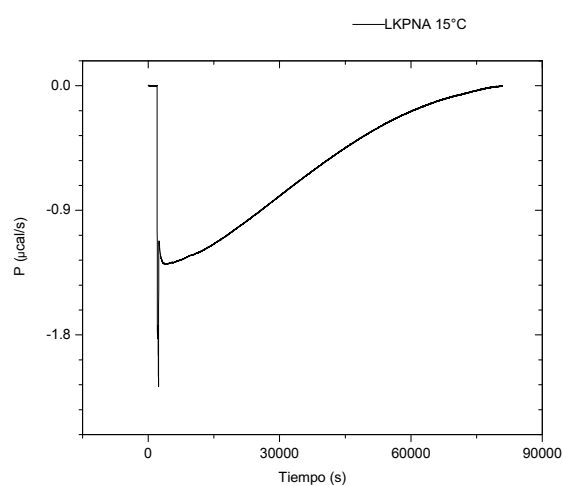
## 9. Apéndice

## TERMOGRAMAS Y CURVAS DE MICHAELIS-MENTEN

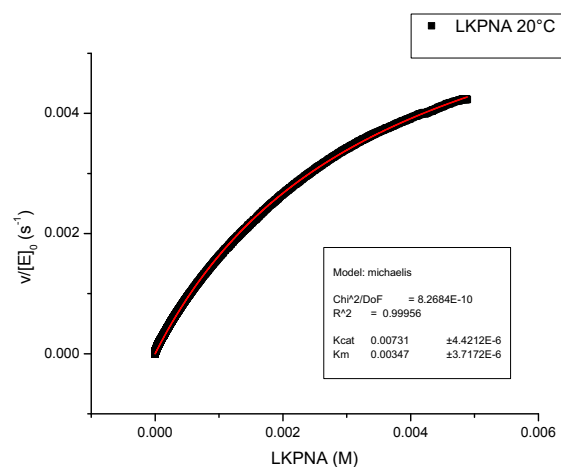
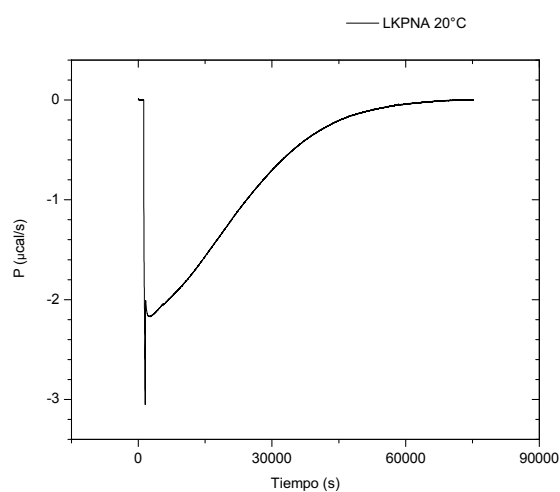
## Experimento a 10 °C



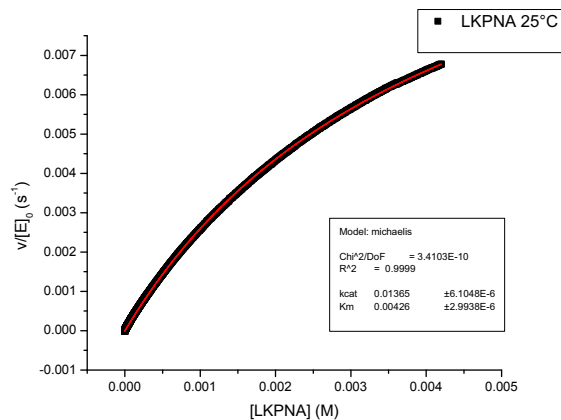
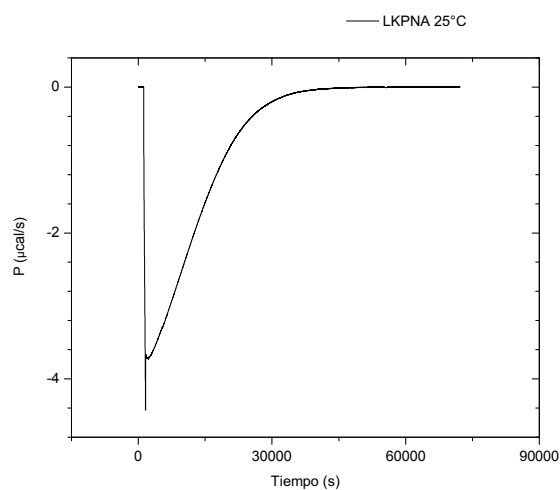
## Experimento a 15 °C



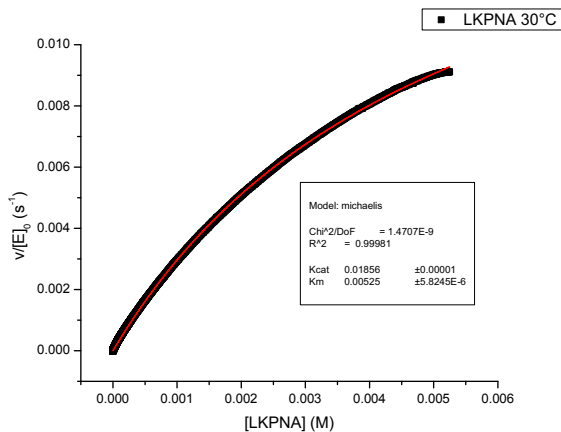
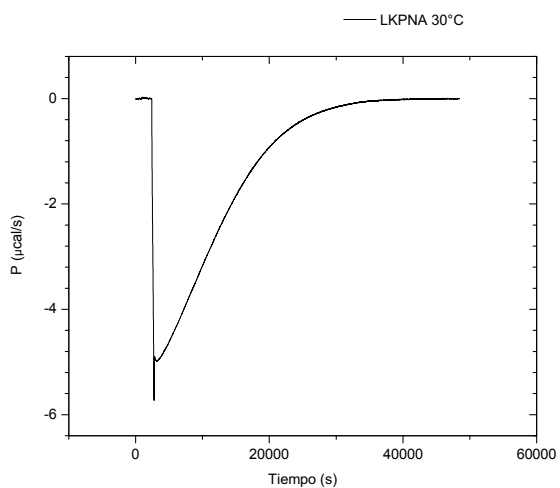
## Experimento a 20 °C



## Experimento a 25 °C

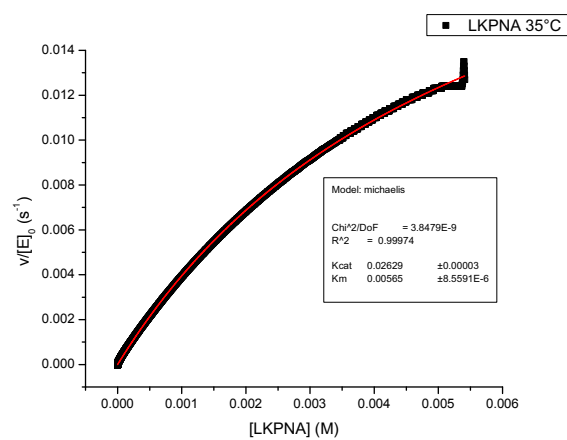
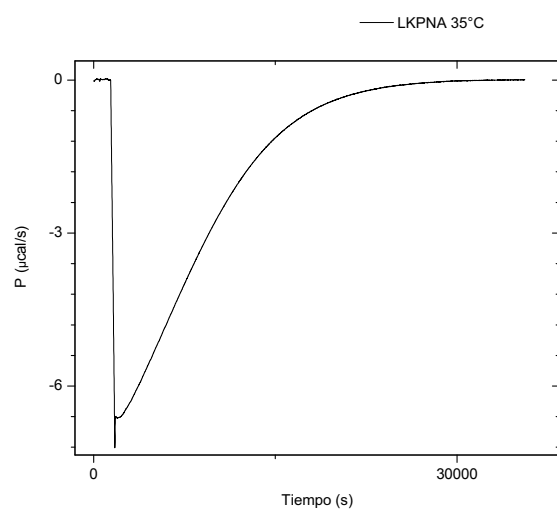


## Experimento a 30 °C

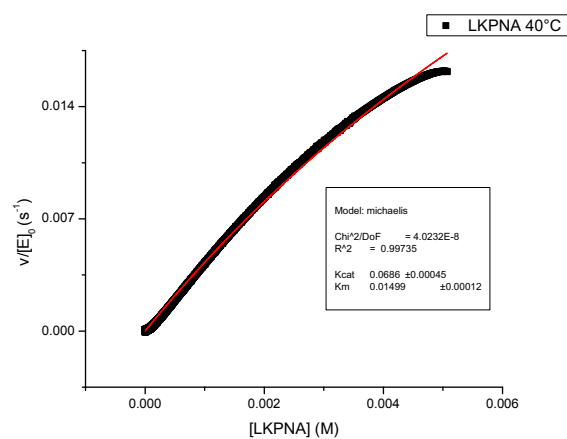
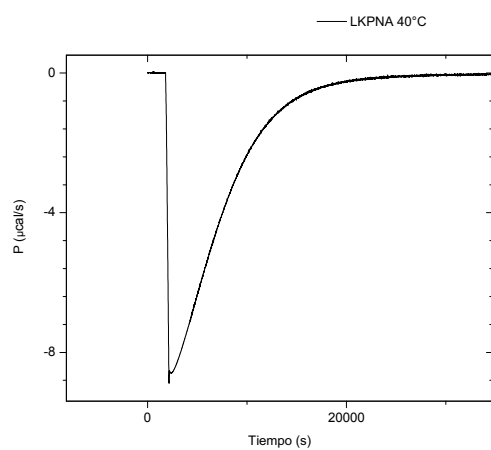




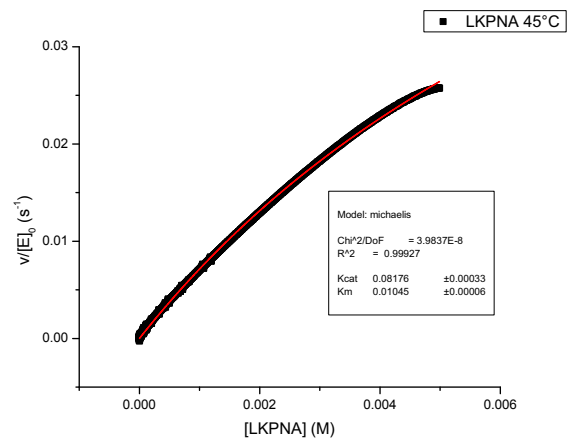
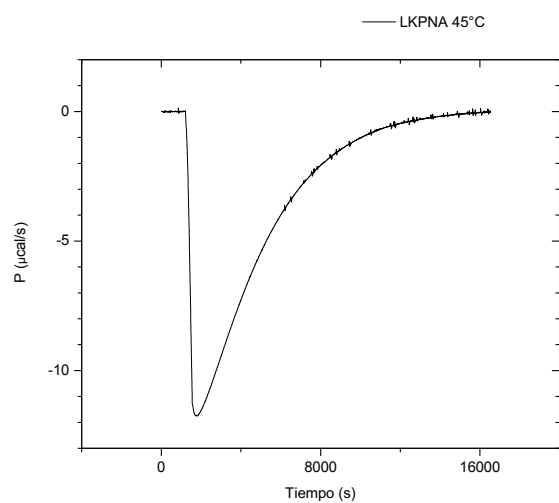
## Experimento a 35 °C



## Experimento a 40 °C



## Experimento a 45 °C



## MATRIZ PARA EL AJUSTE GLOBAL SIMULTÁNEO

$T(^{\circ}\text{C})$	AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AX
10	1	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	0	0	0	0	0	0
20	0	0	1	0	0	0	0	0
25	0	0	0	1	0	0	0	0
30	0	0	0	0	1	0	0	0
35	0	0	0	0	0	1	0	0
40	0	0	0	0	0	0	1	0
45	0	0	0	0	0	0	0	1

---

## Bibliografía

- Ababou, A., & Ladbury, J. E. (2006). Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. [Review]. *Journal of Molecular Recognition*, *19*, 79-89.
- Aguirre-Martínez, C. (2011). *Cinética enzimática de la tripsina de Bos taurus utilizando Calorimetría de Titulación Isotérmica*. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, D.F.
- Atkins, P. W. (1999). *Química Física* (6th ed.). Barcelona: Ediciones Omega S.A.
- Ayala, Y. M., & Di Cera, E. (2000). A simple method for the determination of individual rate constants for substrate hydrolysis by serine proteases. *Protein Science*, *9*, 1589-1593.
- Babtie, A., Tokuriki, N., & Hollfelder, F. (2010). What makes an enzyme promiscuous? *Current Opinion in Chemical Biology*, *14*, 200-207.
- Ball, D. W. (2004). *Fisicoquímica* (1a ed.). México: Thomson.
- Bisswanger, H. (2008). *Enzyme Kinetics, Principles and Methods* (2nd ed.). Weinheim, Germany: WILEY-VCH.
- Brouwer, A. C., & Kirsch, J. F. (1982). Investigation of Diffusion-Limited Rates of Chymotrypsin Reactions by Viscosity Variation. *Biochemistry*, *21*, 1302-1307.
- Case, A., & Stein, R. L. (2003). Mechanistic Origins of the Substrate Selectivity of Serine Proteases. *Biochemistry*, *42*, 3335-3348.
- Castellan, G. W. (1998). *Fisicoquímica* (2a. ed.). México: Pearson Educación.
- Chiong, K. N. G., Lewis, S. D., Shafer, J. A. (1975). Rationalization of the Acylation Step in Chymotrypsin-Catalyzed Hydrolysis of Amides. *J. Am. Chem. Soc.*, *97*(2), 418-423.
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis* (2nd. ed.). New York: Wiley & Sons.
- Evnin, L. B., Vásquez, J. R., & Craik, C. S. (1990). Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *87*, 6659-6663.

- 
- Fastrez, J., & Fersht, A. R. (1973). Demonstration of the Acyl-Enzyme Mechanism for the Hydrolysis of Peptides and Anilides by Chymotrypsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 12(11), 2025-2034.
- Fersht, A. (1985). *Enzyme structure and mechanism*. New York: Freeman and Co.
- Frauenfelder, H. (2010). Proteins. In S. S. Chan & W. S. Chan (Eds.), *The physics of proteins* (pp. 19): Springer.
- Freyer, M. W., & Lewis, E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology* (pp. 79-113): Elsevier Inc.
- Ghai, R., Falconer, R. J., & Collins, B. M. (2012). Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010. [Review]. *Journal of Molecular Recognition*, 25, 32-52.
- Gold, V. (1963). Advances in physical organic chemistry (Vol. 1). *Entropies of Activation and Mechanisms of reactions in Solution*. New York, NY: Academic Press Inc.
- Guthrie, J. P. (1973). Hydration of Carboxylic Acids and Esters. Evaluation of the Free Energy Change for Addition of Water to Acetic and Formic Acids and their Methyl Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 95:21, 6999-7003.
- Hansen, L. D., Lewis, E. A., & Eatough, D. J. (1985). Instrumentation and data reduction. In K. Grime (Ed.), *Analytical Solution Calorimetry* (pp. 57-95). New York, NY: John Wiley & Sons.
- Haq, I. (2005). Calorimetry in the fast lane: The use of ITC for obtaining enzyme kinetic constants, *Microcal, Application Note*, <http://www.microcal.com/>, (pp. 1-9).
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501-4523.
- Khersonsky, O., & Tawfik, D. S. (2010). Enzyme Promiscuity: A Mechanistic and Evolutionary Perspective. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 471-505.
- Kraut, J. (1977). Serine Proteases: Structure and Mechanism of Catalysis. [Review]. *Annual Reviews of Biochemistry*, 46, 331-358.
- Laidler, K. J. (1984). The development of the Arrhenius equation. *Journal of Chemical Education*, 61(6), 494-498.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Principios de Bioquímica* (4th. ed.): Omega.
-

- 
- Levine, I. N. (1999). *Fisicoquímica* (4a. ed. Vol. 2). Madrid: Mc Graw Hill.
- Long, J. Z., & Cravatt, B. F. (2011). The Metabolic Serine Hydrolases and Their Functions in Mammalian Physiology and Disease. [Review]. *Chemical Reviews*, *111*, 6022-6063.
- Nath, A., & Atkins, W. M. (2008). A Quantitative Index of Substrate Promiscuity. *Biochemistry*, *47*, 157-166.
- Peleg, M., Normand, M. D., & Corradini, M. G. (2012). The Arrhenius Equation Revisited. [Review]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*, 830-851.
- Peretó, J. (2007). *Fundamentos de Bioquímica* (1a. ed.). Valencia, España: PUV.
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. [Review]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *62*, 2161-2172.
- Porollo A, M. J. (Producer). (2007) Versatile Annotation and Publication Quality Visualization of Protein Complexes Using POLIVIEW-3D. *BMC Bioinformatics*.
- Robinson, B. A. (1990). Kinetics of Alkaline Hydrolysis of Organic Esters and Amides in Neutrally-Buffered Solution. *International Journal of Chemical Kinetics*, *22*, 431-448.
- Schulz, A. R. (1994). *Enzyme Kinetics: From Diastase to Multi-enzyme Systems*. (1a. ed). Australia: Cambridge University Press.
- Smith, I. W. M. (2007). The temperature-dependence of elementary reaction rates: beyond Arrhenius. [Critical Review]. *Chemical Society Reviews*, *37*, 812-826.
- Stroud, R. M. (1974). A family of protein-cutting proteins. *Scientific American*, *130*(1), 1-16.
- Svedendahl Humble, M., & Berglund, P. (2011). Biocatalytic Promiscuity. [Microreview]. *European Journal of Organic Chemistry*, 3391-3401.
- Sykes, P. (2002). *Mecanismos de reacción en química orgánica*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- Thomson, J. A., & Ladbury, J. E. (2004). Isothermal Titration Calorimetry: a Tutorial. In J. E. Ladbury & M. L. Doyle (Eds.), *Applications of Calorimetry in the Biological Sciences* (pp. 37-58): Wiley & Sons.
- Todd, M. J., & Gomez, J. (2001). Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A general Assay for Enzyme Activity? *Analytical Biochemistry*, *296*, 179-187.
-

Wolfenden, R. (2011). Benchmark Reaction Rates, the Stability of Biological Molecules in Water, and the Evolution of Catalytic Power in Enzymes. [Review]. *Annual Reviews of Biochemistry*, 80, 645-667.

Programa en línea POLIVIEW-3D: <http://polyview.cchmc.org/polyview3d.html>

PDB (Protein Data Bank): <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>