

2ej
78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE MODELOS DE MECANISMOS
CINETICOS ENZIMATICOS”**



EXAMENES DE LICENCIATURA
FACULTAD DE QUÍMICA

**T E S I S
M A N C O M U N A D A**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
I N G E N I E R O Q U I M I C O**

P R E S E N T A N :

**LUIS JOEL LOPEZ BAJONERO
RAUL DANIEL MARTINEZ VILLAGRAN**

1986



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 está 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.

C O N T E N I D O

INTRODUCCION	1
CAPITULO I	
PROTEINAS	2
1. Generalidades	2
2. Aminoácidos	2
3. Características de las proteínas	6
4. Desnaturalización	13
CAPITULO II	
ENZIMAS	15
1. Antecedentes	15
2. Obtención. Tecnología enzimática	17
3. Nomenclatura	18
4. Cofactores	19
5. Especificidad	23
6. Sitio activo	24
7. Principios termodinámicos	27
8. Equilibrio químico	29
9. Cinética química	30
9.1 Definición de velocidad de reacción	30
9.2 Reacciones reversibles y equilibrio termodinámico	32
9.3 Efecto de la temperatura en las reacciones químicas	33
10. Cinética enzimática	34
10.1 Velocidad de reacción para el sistema enzima- sustrato	35
10.2 Efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción	38
10.3 Efecto del pH	38
10.4 Efecto pH-temperatura	39
10.5 Otros factores que modifican la velocidad de reacción	39
10.6 Inhibición de las reacciones enzimáticas	40
11. Uso presente y futuro de las enzimas	45
11.1 Enzimas extracelulares	45
11.2 Enzimas intracelulares	45
11.3 Uso en tecnología de alimentos	49
11.4 Aplicaciones industriales en forma inmovilizada	49
11.5 El futuro	51
CAPITULO III	
ECUACIONES DE VELOCIDAD PARA SISTEMAS ENZIMATICOS	55
1. Nomenclatura	55
2. Derivación de ecuaciones de velocidad	56
2.1 Método sistemático	56
2.2 Método esquemático de King-Altman	59
2.2.1 Comprobación del número de patrones válidos	69
3. Ecuaciones de restricción	71
4. Combinación de las ecuaciones de velocidad y restricción	78
5. Derivación de ecuaciones de velocidad para mecanismos en estado estacionario con equilibrio rápido	80
6. Forma de la ecuación de velocidad	83
7. Derivación de la ecuación de velocidad para estudios de inhibición	85
8. Derivación de ecuaciones de velocidad en estudios de intercambio de isótopos	86

C A P I T U L O I V

GENERACION DE ECUACIONES DE VELOCIDAD POR COMPUTADORA	89
1. Sistema de descripción del mecanismo a la computadora	90
2. Resultados	92
a) Mecanismo reversible de un sustrato	92
b) Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo	95
c) Mecanismo hipotético	98

C A P I T U L O V

CONSTANTES DE VELOCIDAD	101
I. Métodos experimentales	101
1. Cinética de estado transitorio	101
1.1 Métodos de flujo	101
1.2 Formación del complejo enzima-sustrato	102
1.3 Formación del producto de reacción	103
2. Obtención de constantes de velocidad a partir de cinética de relajación	106
2.1 Reacción de primer orden	106
2.2 Isomerización del complejo enzima-sustrato	109
3. Obtención de constantes a partir de cinética de estado estacionario	110
II. Métodos estadísticos	111
4. Mínimos cuadrados	111
5. Regresión lineal	113
6. Regresión no lineal	114
7. Ponderación y precisión	116
8. Linearización	118
9. Bondad del ajuste	121
III. Estimación de parámetros	121
10. Resultados del programa de optimización PRAXIS	121
11. Resultados del programa SIMPLEX	127
C O N C L U S I O N E S	130
A P E N D I C E I	131
A P E N D I C E II	138
A P E N D I C E III	145
A P E N D I C E IV	162
A P E N D I C E V	183
B I B L I O G R A F I A	197

INTRODUCCION

El objetivo principal de este trabajo es el de presentar un método sistemático para el análisis de resultados cinéticos enzimáticos experimentales, derivando la ecuación de velocidad para un modelo propuesto, la estimación de parámetros y la verificación de que tan bien se ajusta el modelo propuesto a los datos experimentales.

Para esto es necesario utilizar herramientas analíticas en forma de programas de computadora que son presentadas en este trabajo.

Una característica de este método sistemático es que la técnica aquí tratada cubre mecanismos lineales y cíclicos reversibles. Esto es importante ya que la mayoría de los mecanismos enzimáticos publicados no son del tipo del modelo de Michaelis-Menten.

Para lograr el objetivo de este trabajo se dividió en cinco partes por separado, pero relacionadas entre sí y cinco apéndices. En el análisis o modelamiento de resultados cinéticos enzimáticos, el primer paso importante es la derivación de la ecuación de velocidad del mecanismo propuesto. Antes de iniciar esta etapa, consideramos necesario, por ser probablemente el mejor camino para una mejor comprensión de las reacciones enzimáticas, un breve repaso a las generalidades del tema. Es por esto que el trabajo se estructuró de la siguiente forma:

El Capítulo I cubre las generalidades sobre las Proteínas, grupo al que pertenecen las enzimas y que son necesarias para una mejor comprensión del tema.

El Capítulo II abarca de una manera más detallada a las enzimas. Hace un repaso de los conocimientos básicos de las enzimas como son: generalidades, nomenclatura, principios termodinámicos, etc. Así también, una parte de este capítulo se encarga de hacer un resumen del potencial de aplicación de las enzimas en la industria en forma inmediata y a futuro.

El Capítulo III cubre las técnicas requeridas para la derivación de ecuaciones de velocidad, tanto para un mecanismo en equilibrio, como para uno en estado estacionario. Se tratan también, brevemente, estudios de inhibición e intercambio de isótopos. Se incluyen tanto el método manual como el mecánico.

El Capítulo IV muestra la forma apropiada de describir el mecanismo enzimático a la computadora, presentándolo a detalle con ejemplos y resultados.

El Capítulo V que se divide en tres partes, trata de la medición y estimación de las constantes de velocidad. La primera parte trata de la medición de las constantes por métodos experimentales. La segunda parte describe la estimación de tales constantes por métodos estadísticos y finalmente, la tercera parte, trata de la estimación de parámetros por métodos de optimización a partir de una expresión de velocidad generada en base a un modelo propuesto.

Los programas de computadora mencionados en los capítulos se presentan en cinco apéndices donde se da una breve explicación del programa, formato de datos de entrada, diagramas de flujo, formato de resultados o datos de salida y el listado de dicho programa.

CAPITULO I PROTEINAS

1. Generalidades

Las células, que constituyen la unidad de la vida, están formadas por diversas sustancias, entre las que se encuentran las proteínas, las cuales tienen funciones específicas dentro de éstas. Las enzimas son algunas de estas proteínas, cuya función es la de catálisis de las reacciones biológicas.

Las proteínas son los compuestos más abundantes de las células, ya que -- constituyen el 50 por ciento o más de su peso seco. Al ser compuestos orgánicos están formados por carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y muchas de ellas contienen además azufre. Adicionalmente algunas pueden contener fósforo, hierro, -- zinc, cobre, etc.

Las proteínas tal como los polímeros sintéticos son cadenas de unidades -- que se van repitiendo periódicamente. Estas unidades son los grupos peptídicos -- (Fig. 1.1), los que a su vez están formados por monómeros llamados aminoácidos, -- de los cuales se llegan a distinguir 20 diferentes (Tabla 1.1).

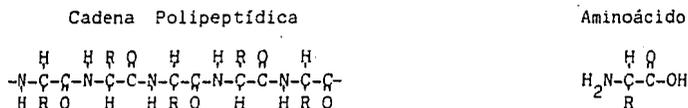
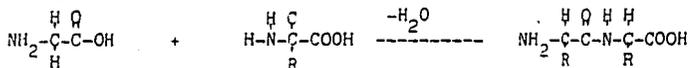


Fig. 1.1 La cadena polipeptídica es una estructura repetitiva formada -- por grupos peptídicos (-CONHC-). La cadena en sí está formada por grupos de -- aminoácidos unidos covalentemente, cada uno de los cuales contribuye con un grupo idéntico a la estructura más un radical distintivo R como grupo lateral.

Los enlaces peptídicos (-NHCO-) se forman cuando dos aminoácidos reaccionan entre sí, eliminando una molécula de agua (reacción de condensación), según la siguiente ecuación:



La unión de estos grupos péptídicos da por resultado cadenas de polipéptidos (llamados así cuando la cadena tiene un peso molecular menor a 10000) o proteínas (cuando el peso molecular es mayor a 10000). La reacción inversa, la -- hidrólisis, sobre estas cadenas da por resultado aminoácidos, con lo cual se puede afirmar que son éstos la base de las proteínas.

Cada proteína puede estar formada por cientos de aminoácidos y su peso molecular puede variar de 5000 hasta más de un millón.

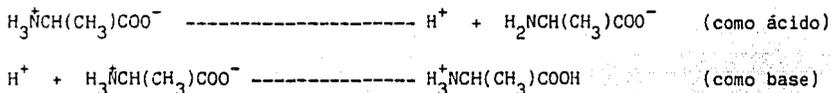
2.- Aminoácidos

Por ser los aminoácidos la base constitutiva de las proteínas a continuación se describirán algunas de sus propiedades más importantes.

Su fórmula general es:



A excepción de la prolina, todos los aminoácidos tienen como común denominador un grupo carboxílico libre (-COOH) y un grupo amino libre (-NH₂) e insustituido unido a un carbono asimétrico (carbono alfa) difiriendo entre sí en la cadena lateral, que es distintiva para cada uno y a la que se ha dado por llamar "grupo R". Eléctricamente, esta molécula es un ion dipolar (+H₃-N-CHR-COO⁻), llamado también ion híbrido, ya que puede actuar en solución como ácido (donador de protones) o bien como base (aceptor de protones). La primera característica se la confiere el grupo amino y la segunda el grupo carboxílico. Por ejemplo, la alanina cuando se disuelve, puede comportarse según alguno de los equilibrios -- que se presentan a continuación:



Estas propiedades ácido-base de los aminoácidos son de suma importancia, ya que éstas le confieren a las proteínas algunas de las características que poseen, tal como su secuencia, su forma, etc. Además es en base a estas propiedades que se hace el estudio de la composición y caracterización (o secuencia de aminoácidos en la cadena) de las proteínas.

Lo que sucede con una solución de un aminoácido, cuando se le coloca en un campo eléctrico, depende de su pH. En solución alcalina hay más aniones de la forma II que cationes de la forma III (fig. 1.2), por lo que hay una migración neta del aminoácido hacia el ánodo.

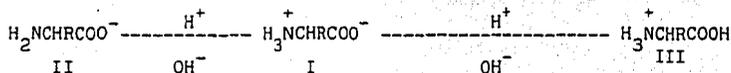


Fig. 1.2. Especies iónicas presentes en una solución de aminoácidos.

En solución ácida, en cambio, se encuentran los cationes III en exceso, por lo que hay migración neta del aminoácido hacia el cátodo. Si las especies -- II y III se equilibran exactamente, no hay migración; en tales condiciones existe cualquiera de las moléculas como ion positivo y negativo durante el mismo lapso de tiempo, de modo que cualquier movimiento en la dirección de uno de los --- electrodos, es contrarrestado por uno igual y de sentido contrario hacia el otro electrodo.

La concentración de ion hidrógeno para la cual un aminoácido no migra en un campo eléctrico, se conoce como el punto Isoeléctrico de dicho aminoácido.

Un aminoácido generalmente tiene la solubilidad más baja cuando el pH corresponde al punto isoeléctrico, puesto que tiene en ese punto la concentración más alta del ion dipolar. A medida que la solución se hace más alcalina o más -- ácida, aumenta la concentración de uno de los iones.

Uno de los métodos de clasificación de los aminoácidos se basa en la polaridad del grupo R, existiendo de acuerdo a esto, cuatro grupos --- principales: a) aminoácidos con grupo R polar o hidrofóbicos; b) aquellos que tienen grupo R polar pero sin carga; c) aminoácidos con grupo polar de carga positiva; y d) aquellos con carga negativa, considerando que cualquiera de ellos de encuentra a un pH de 6 a 7, que es el valor intracelular de pH.

A los aminoácidos se les designa comúnmente con vocablos de tres - letras, aunque también existe un código de una sola letra. En la tabla 1.1 se mencionan los 20 aminoácidos más comúnmente encontrados en las protei-- nas y además de su nombre y fórmula desarrollada se da su nombre por código y su peso molecular.

A continuación se presentan las principales características de la clasificación de aminoácidos que se dió anteriormente.

a) Aminoácidos con grupo no polar o hidrofóbicos.

Este grupo de aminoácidos tiene la característica de que su cadena lateral les confiere la propiedad de hidrofóbicos: son no polares. En total son ocho aminoácidos de esta clase; en cinco de ellos la cadena R es - un radical alifático (alanina, leucina, isoleucina, valina y prolina), en dos de ellos es aromática (fenilalanina y triptófano) y uno de ellos, la metionina, contiene azufre. De todos ellos el más soluble en agua es la -- alanina.

b) Aminoácidos con grupo R polar sin carga.

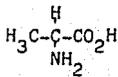
Estos son relativamente más solubles en agua que los anteriores. - Este grupo esta constituido por la serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina, cisteina y por la glicina. La solubilidad de estos se debe en - los tres primeros, al grupo hidróxilo (-OH), en los dos siguientes al grupo amídico $-(NH_2) C=O$, , en el siguiente al grupo sulfhidrilo (-SH) y en el último al hidrógeno, aunque algunas veces se clasifica como no polar, debido a que este átomo es muy pequeño para influir en la elevada polaridad de los grupos amino y carboxílico.

c) Aminoácidos con grupo R cargado positivamente.

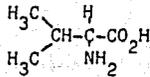
Estos aminoácidos son básicos y todos los grupos R son cadenas de seis carbonos. Los tres aminoácidos de este grupo son la lisina, la argini na y la histidina. El primero contiene un grupo amino, la arginina contiene un grupo guanidino y la histidina contiene la función imidazol en la - cadena. Este último, que es débilmente básico, es el único que posee un -- protón que se disocia a pH neutro. Esta característica permite a ciertos - residuos de histidina desempeñar un papel importante en las actividades -- catalíticas de algunas enzimas.

Tabla 1.1 Clasificación de los aminoácidos según su polaridad.

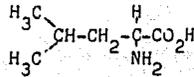
1. Aminoácidos con grupos R no polares o hidrofóbicos



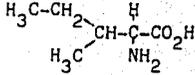
L-alanina



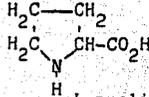
L-valina



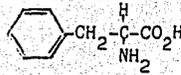
L-leucina



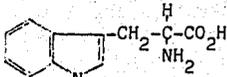
L-isoleucina



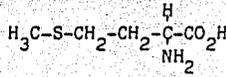
L-prolina



L-fenilalanina



L-triptófano

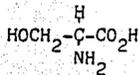


L-metionina

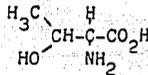
2. Aminoácidos con grupos R polares pero sin carga eléctrica



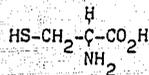
Glicina



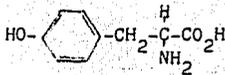
L-serina



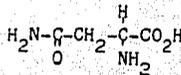
L-treonina



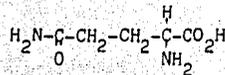
L-cisteína



L-tirosina

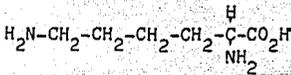


L-asparagina

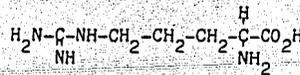


L-glutamina

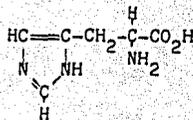
3. Aminoácidos con grupos R cargados positivamente



L-lisina

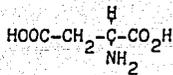


L-arginina

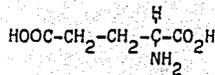


L-histidina

4. Aminoácidos con grupos R cargados negativamente



L-ácido aspártico



L-ácido glutámico

d) Aminoácidos con grupos R cargados negativamente.

A esta clasificación pertenecen los ácidos aspártico y glutámico, cada uno de los cuales contiene un segundo grupo carboxílico que se encuentra completamente ionizado, cargado negativamente, a un pH entre 6 y 7.

Otros aminoácidos.

Algunas proteínas además de los 20 aminoácidos corrientes, pueden contener otros aminoácidos, todos ellos derivados de alguno de los 20 comunes. Por ejemplo la hidróxiprolina, que es un derivado de la prolina se le puede encontrar en la proteína del colágeno (Fig. 1.3).



Fig. 1.3 Además de los 20 aminoácidos corrientes que forman las proteínas, se pueden encontrar otros aminoácidos que en general son derivados de los comunes.

Adicionalmente se pueden encontrar en la materia viva hasta 200 aminoácidos no protéicos, llamados así porque no forman parte de las proteínas y se les puede encontrar combinados o solos formando parte de células y tejidos.

Configuración de los aminoácidos naturales.

Las estructuras que se muestran en la Tabla 1.1 nos demuestran que todos los aminoácidos, salvo la glicina, contienen por lo menos un carbono asimétrico, por lo que tal y como se obtienen a partir de las proteínas, todos resultan ópticamente activos.

Los estudios de los aminoácidos naturales han demostrado que todos contienen la misma configuración en torno al átomo de carbono alfa y esta configuración es la misma que la del aldehído L-(-)-glicérico.



El signo L no se refiere al signo de rotación, aunque indica una relación configuracional de compuestos similares.

3. Características de las Proteínas.

Las proteínas se pueden clasificar, según la forma en que se encuentran en estado nativo o forma tridimensional (también conocida como conformación), en dos grupos: a) proteínas fibrosas y b) proteínas globulares. Las primeras se ---

hallan constituidas por cadenas polipépticas ordenadas de modo paralelo formando fibras o laminillas. Las segundas son cadenas plegadas estrechamente de modo -- que adoptan formas esféricas (globulares) compactas. Esta última conformación -- es la que adoptan las enzimas.

Para el estudio de la estructura y propiedades de las proteínas es importante conocer la gama de enlaces que se presentan en la molécula o grupos de moléculas y que en sí les dan las propiedades que presentan; estos son:

- a) Enlaces covalentes, resultado de compartir un par electrónico entre dos átomos (uno de cada uno). Las energías de enlace pueden variar de 30 a 100 - Kcal/mol. En las proteínas este enlace se presenta entre porciones de péptidos, uniones disulfuro, ester y amina. Estos pueden presentarse entre los grupos -- reactivos de aminoácidos en la misma cadena (inter).
- b) Enlace covalente coordinado, se origina de la compartición de un par de electrones por dos átomos, provenientes ambos electrones (originalmente) del mismo átomo. Las energías de enlace son mucho menores que el caso anterior (4 a 5 Kcal/mol), por lo que son mucho más lábiles. Estos enlaces se presentan entre -- metales (Fe y Co) y las proteínas.
- c) Fuerzas iónicas (enlaces iónicos), que resultan de la atracción electrostática entre dos grupos de carga opuesta. La energía de enlace varía de 10 a 20 Kcal/mol, lo cual depende de la distancia entre especies involucradas. Estos enlaces se forman entre residuos positivos (α y ϵ -amino guanidino e imidazol) y -- grupos cargados negativamente (formas ionizadas de grupos α -carboxilo, fosfato y sulfato).
- d) Enlaces de hidrógeno, este se produce como resultado de la compartición de un átomo de hidrógeno por dos átomos electronegativos que tienen electrones -- no enlazados. La energía de enlace varía de 2 a 10 Kcal/mol. En las proteínas, los grupos que poseen un átomo de hidrógeno que puede ser compartido incluyen al nitrógeno peptídico, imidazol, indol; grupos con el radical -OH (serina, treonina, tirosina, hidróxiprolina); con grupo $-\text{NH}_2$ y $-\text{NH}_3^+$ (arginina, lisina, α -amino) y el grupo carbamino ($-\text{CONH}$). Los grupos que pueden aceptar la compartición de -- un hidrógeno incluyen al $-\text{COO}^-$ (aspartato, glutamato, α -carboxilato), el enlace-disulfuro ($-\text{S}-\text{S}-$) y el enlace peptídico y ester ($=\text{C}=\text{O}$).
- e) Fuerzas atractivas de Van der Waals. Estas actúan entre todos los átomos, iones y moléculas que inducen un dipolo oscilante en otra molécula por distor-- torción de la nube de carga electrónica. El extremo positivo de un dipolo fijo atraerá una nube electrónica, mientras que el extremo negativo la repelerá. -- Estas interacciones son de importancia particularmente en la estructura inter-- rior no polar de las proteínas, proporcionando fuerzas atractivas entre cadenas-laterales no polares.
- f) Interacciones hidrófobas, que permiten a las cadenas laterales no pola-- res, adherirse entre sí en disolventes polares, especialmente en agua. La ener-- gía real para este proceso parece provenir de fuerzas de enlaces de hidrógeno -- entre moléculas de agua en vez de atracciones entre grupos hidrófobos. Actual-- mente este tipo de enlaces no es bien comprendido.
- g) Repulsión electrostática, entre grupos con el mismo signo. Es lo opuesto -- a las fuerzas iónicas (atractivas).

intra-unión por medio de enlaces de hidrógeno. Por medio del estudio de las cadenas protéicas con rayos X, se ha puesto en evidencia el hecho de que hay ciertas repeticiones de algunas unidades estructurales. Una de estas estructuras es la alfa-hélice, que es la forma más abundante de estructura secundaria, que consiste en la formación en la cadena de una hélice torcida a la derecha que contiene aproximadamente 3.6 residuos por vuelta. Esta estructura se estabiliza por medio de puentes de hidrógeno entre grupos NH y CO de los aminoácidos que se unen para formar la cadena peptídica (Fig. 1.4).

Otra estructura secundaria es la conocida como β -plegada, que también se estabiliza por medio de puentes de hidrógeno entre residuos de NH y CO, pero de secciones distintas de cadenas que se acomodan lado a lado (Fig. 1.5).

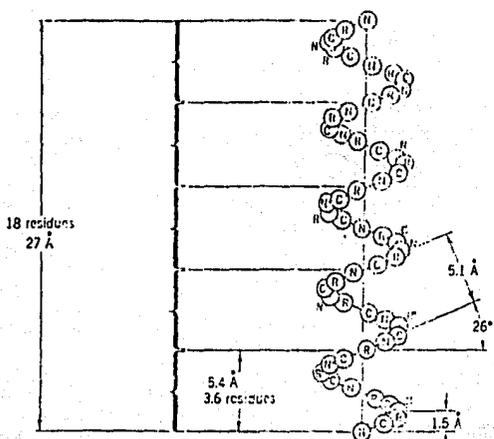
c) Estructura Terciaria

Se refiere a como la proteína se pliega y curva. Para el caso de proteínas globulares, producto de uniones covalentes, las que se llevan a cabo entre-residuos de cisteína (uniones disulfuro), además de uniones hidrógeno, salinas y particularmente hidrófobas o no polares de los grupos R no polares sustituyentes. Esta estructura es necesaria en algunas proteínas para que puedan desarrollar su función. La estructura terciaria o tridimensional, es en general muy irregular. Practicamente no existen proteínas en forma de hélice simple y en su lugar muchas de ellas tienen regiones tanto helicoidales como irregulares; algunas, de hecho, parecen no tener casi nada de las primeras. Hay varias razones que justifican que no se encuentre con más frecuencia las alfa-hélice o algún otro tipo de disposición regular de cadenas, a pesar de los puentes de hidrógeno de regularidad casi perfecta (estructura secundaria). Una de ellas es que el aminoácido prolina no contiene un grupo amino libre, por lo que se debe interrumpir estos enlaces de hidrógeno regulares por su presencia, provocando plegamientos para la formación de otro tipo de enlaces que establezcan la molécula. Los residuos de glicina, serina y asparagina, al igual que la prolina, provocan el plegamiento, por lo que son llamados "residuos que rompen la hélice". Otra razón es la formación de puentes de disulfuro (-S-S-) entre residuos de cisteína, que cuando aparecen en una misma cadena polipeptídica, la hélice necesariamente sufre distorsión.

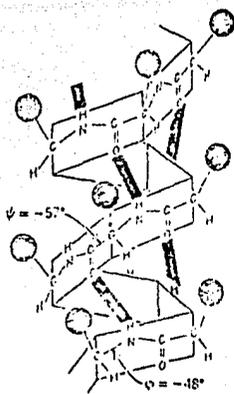
Sin embargo, el factor más importante de la irregularidad en estructuras protéicas es la naturaleza química tan diversa de los grupos laterales (grupos R) de los aminoácidos; cada uno de ellos tenderá a formar la interacción secundaria más favorable desde el punto de vista energético; por ejemplo, el grupo hidróxilo de la tirosina tenderá a establecer una unión de hidrógeno, pero esta energía se perderá si está junto a un grupo hidrófobo de isoleucina (Fig. 1.6).

d) Estructura Cuaternaria

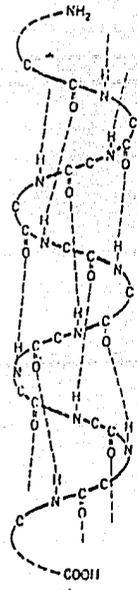
Es la forma en que se disponen las cadenas en el espacio cuando la proteína está formada por más de un polipéptido (Fig. 1.6).



(a)

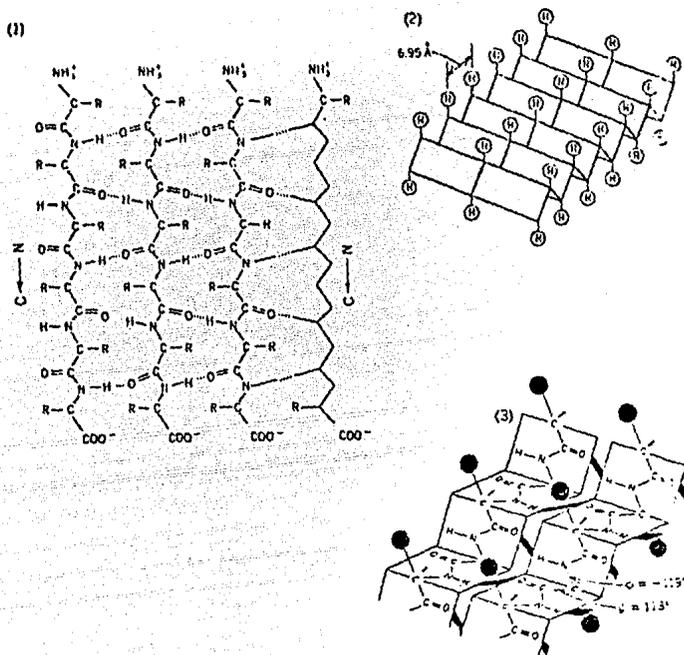


(b)

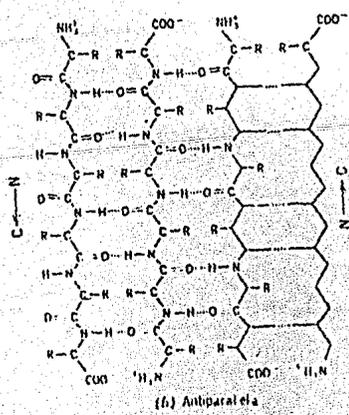


(c)

Fig. 1.4 Tres representaciones de la estructura secundaria alfa-hélice. Esta estructura es estabilizada por puentes de hidrógeno entre grupos aminoácidos de la cadena (uniones intra).



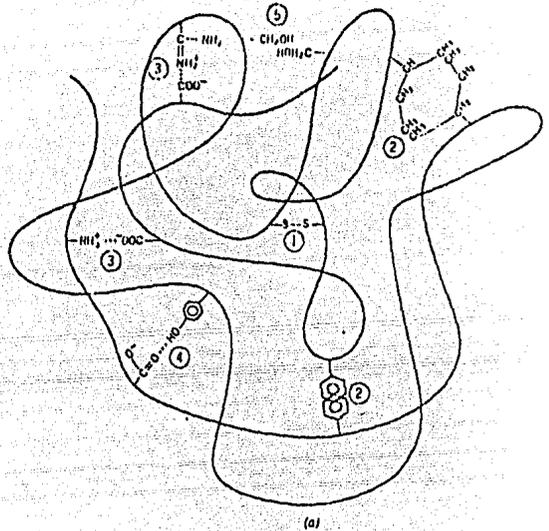
(a) Paralela



(b) Antiparalela

Fig. 1.5 (a) Tres representaciones de la estructura Beta-plegada paralela, (b) Estructura Beta-antiparalela.

ESTRUCTURA TERCIARIA



ESTRUCTURA CUATERNARIA

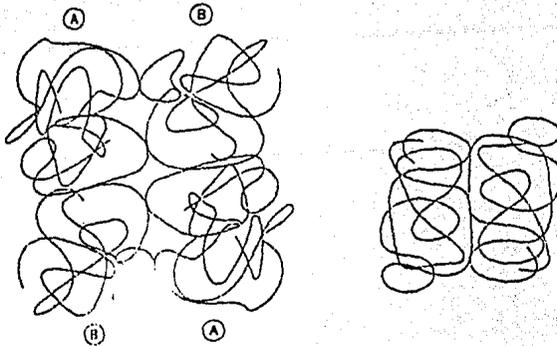


Fig. 1.6 La estructura terciaria de una proteína es estabilizada por (1)- uniones disulfuro producto de la oxidación, de dos residuos de cisteína; (2) interacciones hidrófobas; (3) interacciones iónicas; (4) puentes de hidrógeno y (5) interacciones dipolo-dipolo. (b) La estructura cuaternaria, es la asociación de unidades estructuradas terciariamente, para formar grupos de proteínas, en este caso un tetramero y un dímero. Las subunidades de un conglomerado no son siempre idénticas.

4. Desnaturalización

El estado de una proteína puede ser definido como la conformación altamente ordenada en la cual la actividad biológica de las proteínas es manifiesta. La desnaturalización representa la pérdida de la conformación nativa con alteración de la estructura ordenada de manera única, en cadenas de péptidos arregladas al azar. Esto asume que, en general, hay una sola conformación nativa de máxima estabilidad. La pérdida de la actividad biológica específica, particularmente de la actividad enzimática, es lo más común y generalmente, la indicación más sensible de una alteración en la conformación, lo suficientemente notable que puede ser descrita como "desnaturalización".

Las causas de la desnaturalización de las proteínas incluyen:

- a) Un cambio significativo en el pH de la solución proteica.
- b) Cambios de temperatura (en particular temperaturas altas).
- c) Por acción de detergentes.
- d) Radiación ultravioleta.
- e) Vibraciones ultrasónicas.
- f) La agitación mecánica de la solución.
- g) Concentraciones altas de compuestos polares tales como urea o la guanidina. Estos compuestos actúan rompiendo enlaces de hidrógeno.
- h) Tratamiento con disolventes orgánicos solubles en agua, tal como la acetona y el etanol.
- i) La trituration de la proteína, que provoca la ruptura de las cadenas.

El efecto de estos factores sobre las proteínas se manifiesta en cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas, entre las que se encuentran:

- a) Disminución de la solubilidad.
- b) Pérdida de la capacidad para cristalizar.
- c) Aumento de la viscosidad.
- d) Alteración en la estructura interna y disposición de la cadena peptídica, que no corresponde a la ruptura de enlaces peptídicos.
- e) Disminución de la simetría (pérdida de la estructura helicoidal).
- f) Aumento en la reactividad química, en particular de los grupos ionizables y sulfhidrilo.
- g) Disminución o pérdida de la actividad biológica.

El grado de desnaturalización depende de la complejidad de la proteína y de la intensidad y duración del tratamiento desnaturalizante.

En general se puede afirmar que este proceso es reversible si las condiciones de desnaturalización no fueron muy severas o duraderas.

CAPITULO II

ENZIMAS

La enzimología es la ciencia que abarca el estudio de la estructura y funcionamiento de las enzimas, siendo la característica más importante de éstas, su habilidad para desarrollar reacciones complejas rápidamente y a temperaturas moderadas. Las enzimas son proteínas sintetizadas por las células, que catalizan reacciones termodinámicamente posibles siendo sus propiedades, como las de todo catalizador, ya que no se consumen en el curso de las reacciones; una vez realiza da la reacción, quedan libres para volver a actuar; además de no alterar el equilibrio ya que simplemente aceleran la velocidad a la que éste se alcanza.

Las enzimas vistas como catalizadores, actúan a velocidades altas con respecto a los procesos sin catalizar, llegando en algunas ocasiones a intervenir en un millón de reacciones por minuto.

1. Antecedentes

La tecnología enzimática es un arte muy antiguo. En oriente las enzimas son usadas desde tiempos prehistóricos en la preparación de una gran variedad de productos fermentados y bebidas. En el pasado, las principales enzimas usadas fueron amilolíticas y proteolíticas y los microorganismos usados predominantemente fueron del grupo *Aspergillus* y *Mucor*. Uno de los procesos usados fue la fermentación semisólida de arroz en pequeña escala.

Los pastores primitivos descubrieron que el almacenar leche en bolsas fabricadas a partir de la piel del estomago de algunos ruminantes resultaba en la formación de un alimento sólido, el queso, que es el resultado de la acción de la enzima renina sobre las proteínas de la leche. Este es uno de los casos más antiguos del uso de las enzimas en el procesamiento de alimentos.

Otro caso, lo constituye el hecho de que algunas tribus de las zonas tropicales han practicado por siglos el ablandamiento de la carne con hojas y frutos, efecto producto de enzimas como la papaína, la bromelina y la ficina.

El nombre de ENZIMA, que significa "en la levadura", no se empleó sino -- hasta 1878 en que Kühne lo propuso, aunque mucho antes Payen y Persoz (1833) descubrieron que en la transformación de almidón de malta en azúcar estaba implicado un catalizador biológico (la diastasa), que no requería de la presencia de la levadura viva. J.J. Berzelius (1835) en su teoría general sobre la catálisis, mencionaba como ejemplo el trabajo de Payen, como un proceso más eficaz que cuando se usaba ácido sulfúrico como promotor de la reacción.

Desde su descubrimiento en 1833, el estudio de las enzimas se enfocó a conocer su naturaleza química, hasta que en 1926, Summer logró aislar la ureasa en forma cristalina, llegando a la conclusión de que las enzimas eran proteínas.

Las enzimas de origen microbiano con fines comerciales fueron introducidas en occidente alrededor de 1890 cuando un científico japonés, Takamine, fundó en los Estados Unidos una fábrica para obtener enzimas con tecnología japonesa. El principal producto era la Takadiastasa, una mezcla de enzimas amilolíticas y pro-

teolíticas obtenidas del cultivo de *Aspergillus cryzae*. Takamine mejoró el proceso tradicional significativamente reemplazando el arroz por salvado de trigo.

Las enzimas bacterianas fueron desarrolladas en Francia hacia 1913 por -- Boidin y Effrint, que encontraron que la bacteria *Bacillus subtilis*, que se encuentra en el heno, producía una α -amilasa extremadamente estable a la temperatura cuando era desarrollada en cultivos en medio líquido formado por extractos de malta o granos. Esta enzima fue primeramente usada en la industria textil para eliminar el almidón que protegía a los hilos de la torcedura innecesaria en la -- fabricación de telas. La proteasa, que se formaba también en el proceso, tenía -- poco valor, aunque se le encontró uso en la industria de curtiduría.

Alrededor de 1930, se descubrió que las pectinasas podían ser usadas con -- ciertas ventajas en la preparación de productos de frutas. Las mezclas de enzima cruda se preparaban de la misma forma que la Takadiastasa con microorganismos del grupo *Aspergillus niger*, por ejemplo, *Aspergillus wentii*.

En los siguientes años, muchas enzimas hidrolíticas fueron desarrolladas y vendidas en escala comercial, por ejemplo, la celulasa y la lipasa, pero la tecnología no fue satisfactoria. El producto era crudo, de baja actividad y muy caro, por lo que, los progresos en nuevas aplicaciones fueron lentos y resultaban en -- muchas incoherencias.

Después de la Segunda Guerra Mundial, la industria de la fermentación tuvo un rápido desarrollo como resultado del descubrimiento de métodos más eficientes -- de cultivo para la producción de antibióticos. Estos métodos pronto fueron adaptados a la producción de enzimas, pero no resultaron en una expansión económica -- de la industria.

En 1960, la glucoamilasa fue introducida como un medio para hidrolizar almidón para la producción de dextrosa. La enzima era conocida desde hacía tiempo, pero la preparación a partir de *Aspergillus niger* resultaba en una hidrólisis incompleta. El descubrimiento de un medio para eliminar la transglucosidasa de la preparación permitió llegar a una eficiencia de casi 100% de hidrólisis de almi-- dón a dextrosa, abriendo el camino para su uso industrial. Hoy en día, la hidrólisis enzimática, ha sustituido aunque no totalmente a la hidrólisis ácida en la producción de dextrosa.

En la misma época, se descubrió que la proteasa alcalina del *Bacillus licheniformis*, Subtilisin Carlsberg, era factible de incorporarse a los detergentes. Ya que los detergentes enzimáticos fueron bien aceptados por los consumidores, la enzima fue adicionada rápidamente a casi todos los detergentes, y esta -- aplicación llegó a ser una de las más grandes para enzimas microbianas. Después -- de un retroceso en 1970, debido a que algunos trabajadores desarrollaron reacciones alérgicas al polvo enzimático, se modificaron las preparaciones para que fueran libres de polvo, lo que permitió que se siguiera ganando una importante aplicación en la industria de los detergentes.

Otros usos de las enzimas producidas comercialmente, se obtuvo en la sustitución de la renina para la producción de quesos, por otras proteasas de origen microbiano en 1960. En este caso las proteasas obtenidas de *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* y *Endothia parasítica*, han probado que cuando son aplicadas correctamente,

producen excelentes quesos , y tienen la ventaja sobre la renina de que son más baratas por su alta disponibilidad.

Durante los años 70, la investigación se concentró en enzimas con propiedades mejoradas. Un ejemplo interesante es la amilasa de *Bacillus licheniformis* que es estable térmicamente y que es la primera que se puede utilizar por arriba de los 100°C. Más aún, se han introducido algunas proteasas altamente estables a pH básico. Estas enzimas obtenidas de las especies *Bacillus* tienen actividades ópticas por arriba de pH 12, lo que mejora su uso en detergentes.

Actualmente se realiza una intensa investigación en varias áreas, por ejemplo, en la hidrólisis de desperdicios, especialmente de celulosa. Aunque la celulosa es fácil de hidrolizar por procesos enzimáticos, un proceso completo no se ha desarrollado, debido a que la lignocelulosa requiere de un pretratamiento químico o enzimático que no ha sido desarrollado para que sea factible económicamente.

2. Obtención. Tecnología enzimática.

En la obtención de una enzima para su uso como catalizador, la tecnología enzimática se enfrenta a cinco problemas a resolver antes de que una de éstas pueda ser usada. Los pasos para su obtención son:

a) El hallazgo de una fuente apropiada, microbiana, vegetal o animal, para obtener una enzima con objeto de emplearla en un proceso técnico. Potencialmente cada organismo vivo es una fuente para obtener enzimas aplicables a la tecnología. Sin embargo, como no todas las enzimas están presentes en todos los organismos vivos, o no se encuentran en la cantidad suficiente para obtenerlas con un alto rendimiento, la fuente debe contener la enzima en concentraciones adecuadas y permitir su aislamiento y purificación con la mínima pérdida de actividad. Actualmente la fuente más usada es la microbiana, aunque cuando se necesita de una alta especificidad, es necesario recurrir a fuentes específicas , p. ej., la renina es una enzima que solo puede ser obtenida de los intestinos de los rumiantes.

b) Aislamiento y purificación. Una vez conocida la fuente que será usada , este paso dependerá del uso que se le dará finalmente a la enzima; algunos de los pasos que se siguen para su obtención se muestran en la Fig. 2.1.

c) Obtención en la forma óptima para su empleo técnico. En esta etapa se determina como será usada la enzima para que se obtenga el máximo beneficio de su empleo. Esto es, se decide si se usa en forma de solución, o bien, fijada a un soporte sólido o encapsulada dentro de una matriz. En los dos últimos casos se determina el tipo de soporte o matriz y las condiciones bajo las cuales se obtienen buenos resultados.

d) Desarrollo de los dispositivos apropiados para llevar a cabo el proceso en que será usada la enzima, p. ej., diseño de reactores.

e) Comprobación de las ventajas del proceso enzimático sobre la alternativa química, cuando existe.

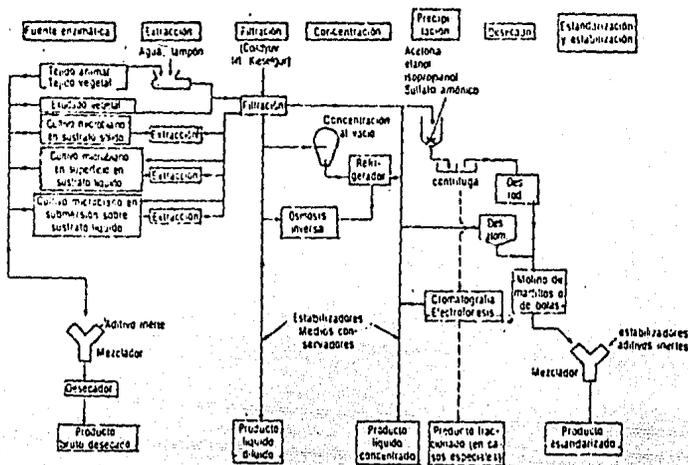


Fig. 2.1 Diagrama de flujo del proceso de obtención de enzimas en diferentes grados de pureza.

3. Nomenclatura

Las enzimas son usualmente nombradas en términos de la reacción que catalizan. Una de estas prácticas es la de agregar el sufijo "ASA", al nombre del sustrato sobre el que actúan. Por ejemplo, a la enzima que cataliza la reacción de la urea (el sustrato), se le da el nombre de ureasa. Sin embargo, no siempre resulta práctico el sistema y por otro lado, algunas de ellas han sido designadas con nombres que no dan ninguna información de la reacción que promueven, como es el caso de la papaína, bromelina y la tripsina, todas ellas, enzimas que actúan hidrolizando enlaces peptídicos.

Un método más sistemático es el propuesto por la Comisión Internacional de Enzimas, que las clasifica atendiendo a su especificidad de acción y de sustrato, dividiéndolas en seis grandes grupos de acuerdo al tipo de reacción que catalizan. Las divisiones son:

- 1) Oxidoreductasas, son aquellas que intervienen en procesos de oxidoreducción.
- 2) Transferasas, son aquellas que promueven la transferencia de un grupo (molécula) de un sustrato a otro, siempre y cuando este último no sea agua.
- 3) Hidrolasas, son todas aquellas que actúan introduciendo catalíticamente moléculas de agua a una unión específica del sustrato. Estas reacciones son frecuentemente reversibles y la clasificación de estas enzimas como hidrolíticas, se basa en el hecho de que, en solución acuosa, favorecen el equilibrio de formación de algún producto.
- 4) Liasas, son enzimas que promueven la ruptura de enlaces mediante un rearrreglo intramolecular.
- 5) Isomerasas, el término denota aquellas enzimas que catalizan un arreglo intramolecular, una mutación o una racemización.

6) **Ligasas**, son todas aquéllas que promueven la formación o síntesis de compuestos.

Según este sistema, la enzima es designada: a) con un nombre recomendado, generalmente corto y apropiado al uso habitual; b) por un nombre sistemático, que identifica la reacción que cataliza y c) por un número de clasificación, formado por cuatro cifras, que la ordenan inequívocamente, de acuerdo a la Tabla 2.1. Por ejemplo, a la enzima que cataliza la reacción



se le nombra: creatin-quinasa (nombre recomendado), y EC.2.7.3.2. (número de clasificación), cuyo significado es: a) EC, comisión de enzimas; b) el primer número (2), el tipo de reacción, transferasa; el segundo número (7), representa la subclase, fosfotransferasas; el tercer número (3), representa la sub-subclase, fosfotransferasas con un grupo nitrógeno como aceptor y la cuarta cifra (2) es un número consecutivo de este tipo de reacciones.

Este último sistema, aunque es completo, resulta muy complejo y aún no tiene aceptación generalizada.

4. Cofactores

Otra forma de clasificar a las enzimas, se basa en el hecho de que algunas de ellas deben su función catalítica exclusivamente a su naturaleza proteica, mientras que otras, aunque en parte su actividad se deba a su naturaleza, dependen además de otros compuestos con estructura no proteica y estables térmicamente, llamados cofactores.

Los cofactores pueden ser de naturaleza muy variada, desde simples iones inorgánicos como el Zn^{2+} y el Mg^{2+} , hasta compuestos orgánicos muy complejos. Los cofactores orgánicos, muchos de los cuales son derivados de las vitaminas, son denominados coenzimas.

En enzimología, al complejo enzima-cofactor se le llama Holoenzima y al componente proteico se le conoce como Apoenzima. Generalmente la apoenzima es inactiva catalíticamente cuando se encuentra sola. En algunos casos se requieren de dos o tres cofactores para hacerlas funcionar, de los cuales uno es generalmente un ion metálico.

Los cofactores funcionan: a) por complejación de la superficie de la enzima, dándole una conformación óptima para su interacción con el sustrato; b) por coordinación entre el sustrato y la enzima colocando a ambos en una ordenación especial; o c) por participación en la reacción total como agente activo, que acepta grupos químicos de un sustrato, para transferirlos a otros sustratos durante la reacción o en otra diferente. Los iones metálicos participan por cualquiera de estos mecanismos, mientras que las coenzimas funcionan normalmente como agentes que transfieren grupos.

Durante la reacción puede suceder que la coenzima se consuma y requiera que se regenere ya sea durante la reacción, por una reacción paralela o bien que se renueve de alguna fuente por haber perdido sus propiedades por algún cambio estructural sufrido durante la reacción y que no sea reversible.

Tabla 2.1 Numeración y Clasificación de las Enzimas.

1.	Oxidoreductasas
1.1	Actúan sobre los grupos CH-OH del donador
Ejemplos	
1.1.1	Con NAD o NADP como aceptor
1.1.1.1	Alcohol: NAD-oxidoreductasa (Alcohol-deshidrogenasa)
1.1.3	Con oxígeno como aceptor
1.1.3.4	β -D-glucosa: oxígeno-oxidoreductasa (glucosa-oxidasa)
1.2	Actúan sobre los grupos aldehído o cetona del donador
Ejemplos	
1.2.1	Con NAD o NADP como aceptor
1.2.1.12	D-gliceraldehído-3-fosfato: NAD-oxidoreductasa (fosforilizante) (gliceraldehído-fosfato-deshidrogenasa)
1.2.3	Con oxígeno como aceptor
1.2.3.2	Xantina: oxígeno-oxidoreductasa
1.3	Actúan sobre los grupos CH-CII del donador
Ejemplos	
1.3.99	Con otros aceptores
1.3.99.1	Succinato: (aceptor)-oxidoreductasa (Succinato-deshidrogenasa)
1.4	Actúan sobre los grupos CH-NH ₂ del donador
Ejemplos	
1.4.1	Con NAD o NADP como aceptor
1.4.1.4	L-glutamato: NADP- γ -Hormetasa (desaminante) (γ -glutamato-deshidrogenasa)
1.5	Actúan sobre los grupos NH-CII del donador
1.6	Actúan sobre el NAD ₂ o el NADP ₂ reducidos
Ejemplos	
1.6.4	Con un enlace disulfuro como aceptor
1.6.4.2	NAD(P) ₂ reducido: glutatión oxidado-oxidoreductasa (glutatión-reductasa)
1.7	Actúan sobre otros compuestos nitrogenados como donadores
1.8	Actúan sobre un grupo que contiene azufre como donador
1.9	Actúan sobre el grupo hemo como donador
1.10	Actúan sobre difenoles y sustancias relacionadas como donadores
1.11	Actúan sobre el peróxido de hidrógeno como aceptor
1.12	Actúan sobre el hidrógeno como donador
1.13	Actúan sobre donadores aislados aceptando oxígeno molecular (oxigenasas)
1.14	Actúan sobre donadores emparejados aceptando oxígeno molecular
1.15	Actúan sobre radicales peróxido como aceptores
1.16	Oxidan iones metálicos
1.17	Actúan sobre grupos -CH ₂ -
2.	Transferasas
2.1	Transportan grupos con un átomo de carbono
Ejemplos	
2.1.1	Metiltransferasas
2.1.1.6	S-adenosilmetionina: pirocatequina-O-metiltransferasa (Pirocatequina-metiltransferasa)
2.2	Transportan restos aldehído o cetona
2.3	Aciltransferasas
Ejemplos	
2.3.1	Aciltransferasas
2.3.1.8	Acetil-CoA: orotofosfato-acetiltransferasa (Fosfato-acetiltransferasa)
2.4	Glicosiltransferasas
Ejemplos	
2.4.1	Hexosiltransferasas
2.4.1.5	α -1,6-glicano: D-fructosa-2-glicosiltransferasa (dextranosa-carasa)
2.5	Transportan grupos alquilo y arilo, además de grupos metilo
2.6	Transportan grupos nitrogenados
Ejemplos	
2.6.1	Aminotransferasas
2.6.1.31	Piridoxamina: oxalacetato-aminotransferasa (Piridoxamina-oxalacetato-transaminasa).
2.7	Transportan grupos fosfato

Tabla 2.1 Continuación.

2.7.1.1	ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa (Hexoquinasa)
2.7.2	Fosfotransferasas con un grupo carboxilo como aceptor
2.7.2.1	ATP: acetato-fosfotransferasa (Acetato-quinasa)
2.8	Transportan grupos azufrados
3.	Hidrolasas
3.1	Actúan sobre enlaces éster
Ejemplos	
3.1.1	Esteres del ácido carbónico-hidrolasas
3.1.1.3	Esteres glicéricos-hidrolasas (Lipatas)
3.1.3	Esteres monofosfóricos-hidrolasas
3.1.3.1	Monoesteres del ácido ortofosfórico-fosfolidrolasa (Fosfatasa alcalina)
3.1.4	Diesteres del ácido fosfórico-hidrolasas
3.1.4.1	Diesteres del ácido ortofosfórico-fosfolidrolasa
Ejemplos	
3.2	Actúan sobre compuestos O-glicosídicos
3.2.1.	Hidrolizan las combinaciones O-glicosídicos
3.2.1.1	α -1,4-glucano-4-glucanohidrolasa (α -amitasa)
3.2.1.20	α -D-glucosido-glucosidrolasa (α -glucosidasa)
3.2.3.	Hidrolizan compuestos S-glicosidos
3.2.3.1	Tioglucoosido-glucohidrolasa (tioglucoosidasa)
3.3.	Actúan sobre los enlaces éter
3.4.	Actúan sobre el enlace péptido (péptido-hidrolasas)
Ejemplos	
3.4.11	α -aminoácilpéptido-hidrolasas
3.4.11.6	Arginin (lisin)-péptido-hidrolasa (Aminopéptidasa B)
3.4.12	Péptidilaminocidos o acilaminocidos-hidrolasas
3.4.12.1	Péptidil-L-aminoácido (L-prolina)-hidrolasa (Carboxipéptidasa C)
3.4.13	Dipéptido-hidrolasas
3.4.13.10	β -L-asparil-L-aminoácido-hidrolasa (β -asparil-dipéptidasa)
3.4.21	Sern-proteinasas
3.4.21.2	Quimotripsina C
3.4.22	SH-proteinasas
3.4.22.2.	Papaina
3.4.23	Proteinasas-ácidas
3.4.23.3	Pepsina C
3.5	Actúan sobre los enlaces carbono-nitrogeno, además de en los péptidos
Ejemplos	
3.5.1	En amidas lineales
3.5.1.5	Urea-amidohidrolasa (Ureasa)
3.5.3	En amidinas lineales
3.5.3.1	L-arginin-amidohidrolasa (arginasa)
3.6	Actúan sobre anhídridos ácidos
Ejemplos	
3.6.1	En anhídridos que contienen fosforo
3.6.1.3	ATP-fosfolidrolasa (ATP-asa)
3.7	Actúan sobre los enlaces carbono-carbono
3.8	Actúan sobre los enlaces con hidrogenos
3.9	Actúan sobre los enlaces fosforo-nitrogeno
3.10	Actúan sobre los enlaces azufre-nitrogeno
3.11	Actúan sobre los enlaces carbono-fosforo
4.	Liasas
4.1	Carbono-carbono-liasas
Ejemplos	
4.1.1	Carboxiliasas
4.1.1.1	2-cetoácido-carboxil-liasa (Piruvato-descarboxilasa)
4.1.2	Aldehído-liasas
4.12.13	D-fructosa-1,6-difosfato-D-gliceraldehido-3-fosfato-liasa (aldolasa)
4.1.3	Cetoácido-liasas
4.1.3.6	Citrato-oxalacetato-liasa (Citrato-liasa)

Tabla 2.1 Continuación.

4.2	Carbono-oxígeno-liasas
Ejemplos	
4.2.1	Hidro-liasas
4.2.1.3	Citrato (isocitrato)-hidro-liasa (Aconitato-hidratasa)
4.2.99	Otras carbono-oxígeno-liasas
4.2.99.3	Polí- α -1,4-D-galacturonido-liasa (Pectato-liasa, pectato-transeliminasa)
4.3	Carbono-nitrogeno liasas
Ejemplos	
4.3.1	Amoniaco-liasas
4.3.1.1	L-aspartato-amoniaco-liasa (Aspartasa)
4.4	Carbono-azufre-liasas
4.5	Carbono-halógeno-liasas
4.6	Fosforo-oxígeno-liasas
4.99	Otras liasas
5.	Isomerasas
5.1	Racemasas y epimerasas
Ejemplos	
5.1.2	Actúan sobre hidroxiaácidos y derivados
5.1.2.1	Lactato-racemasa
5.1.3	Actúan sobre hidratos de carbono y derivados
5.1.3.1	D-ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa
5.1.3.2	UDP-glucosa-4-epimerasa
5.2	Cis-trans-isomerasas
5.3	Oxidoreductasas intramoleculares
Ejemplos	
5.3.1	Transforman aldosas en cetosas y viceversa
5.3.1.1	D-gliceraldehído-3-fosfato-cetolisomerasa (triosafostato-isomerasa)
5.4	Transferasas intramoleculares
Ejemplos	
5.4.2	Transportan grupos fosfato
5.4.2.1	D-fosfoglicerato-2,3-fosfomutasa (Fosfoglicero-mutasa)
5.5	Liasas intramoleculares
5.99	Otras isomerasas
6.	Ligasas (sintetasas)
6.1	Forman enlaces carbono-oxígeno
Ejemplos	
6.1.1	Forman enlaces aminoacil-tRNA y análogos
6.1.1.16	L-cisteína: tRNA ^{Cys} -ligasa (con formación de AMP) (Cisteinil-tRNA-sintetasa)
6.2	Forman enlaces carbono-azufre
Ejemplos	
6.2.1	Acido-tiol-ligasas
6.2.1.4	Succinato: CoA-ligasa (con formación de GDP) (Succinil-CoA-sintetasa)
6.3	Forman enlaces carbono-nitrógeno
Ejemplos	
6.3.1	Acido-amoniaco-ligasas (Amido-sintetasas)
6.3.1.1	L-aspartato-amoniaco-ligasa (con formación de AMP) (Asparagin-sintetasa)
6.3.2	Acido-amoniaco-ligasas (Peptid-sintetasas)
6.3.2.3	γ -L-glutamil-L-cisteinglicil-ligasa (con formación de ADP) (Glutacion sintetasa)
6.3.4	Otras ligasas carbono-nitrógeno
6.3.4.1a	D-biotin-dioxido de carbono-ligasa (con formación de ADP) (Biotin-carboxilasa)
6.4	Forman enlaces carbono-carbono
6.5	Forman enlaces ester-fosfórico

Actualmente, la dependencia de muchas enzimas de sus cofactores ha sido -- una de las limitantes más fuertes para que se generalice su uso.

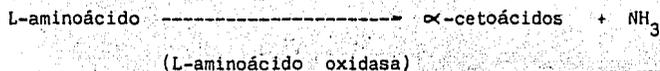
5. Especificidad

Una característica importante de las enzimas es su especificidad por un -- sustrato, sobre el que actúan con una reacción de un solo tipo, lo que da un solo producto sin la formación de subproductos indeseables, resultantes de reacciones laterales. Esto se debe en general a su estructura compleja, a las características especiales del centro activo y a la conformación espacial del sustrato.

El común de la enzima exhibe una especificidad por un grupo de compuestos, teniendo algunas de ellas afinidad por un solo sustrato llamada especificidad de grupo absoluta.

Quando la reacción que cataliza una enzima se extiende a un conjunto de -- compuestos similares relacionados funcionalmente, se dice que posee especificidad de grupo relativa. Las enzimas con especificidad absoluta o aquellas que no tienen ninguna especificidad o que actúan sobre sustratos no relacionados, son relativamente raras.

La especificidad puede ser expresada por algunas enzimas, adicionalmente - a lo anterior, sobre compuestos ópticamente activos (especificidad L-D), e.g., la L-aminoácido oxidasa, solo actúa sobre aminoácidos L:



Así mismo, otro tipo de enzimas (racemasas), catalizan el equilibrio en una mezcla entre isómeros L y D, e.g.,



y otros grupos de enzimas, solo actúan sobre compuestos con isomería geométrica - cis-trans.

Otro tipo de especificidad es la que se presenta por la relación de asimetría de enzima sustrato, que da como resultado que cuando se presenta una reacción de una enzima con un sustrato con estructura simétrica (Fig. 2.2), solo se lleva a cabo la reacción sobre alguno de los grupos simétricos de la molécula, -- e.g., en la conversión de glicerol a L-glicerol fosfato, solo es atacado uno de los grupos $-\text{CH}_2-\text{OH}$, debido a que la molécula de sustrato solo puede acoplarse en una forma específica a la enzima.

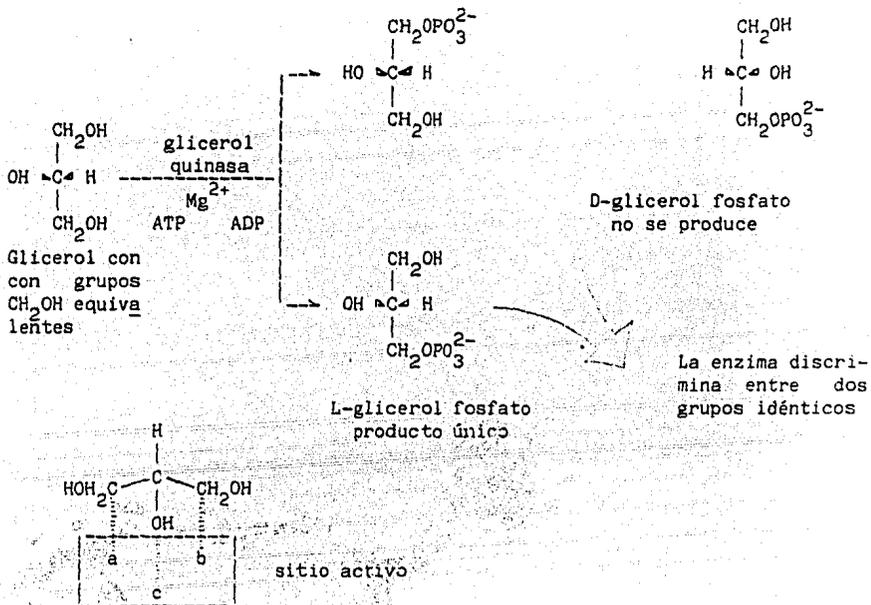


Fig. 2.2 Reacci\u00f3n de un sustrato sim\u00e9trico con una enzima. Este tipo de acci\u00f3n enzim\u00e1tica solo se lleva a cabo por la relaci\u00f3n de asimetr\u00eda enzim\u00e1tica-sustrato, por lo que solo uno de los grupos CH₂OH es atacado, debido a que el acoplamiento debe ocurrir apropiadamente, para que el enlace susceptible de ataque quede expuesto a la acci\u00f3n del sitio activo de la enzima.

6. Sitio Activo

El que una prote\u00edna tenga actividad catal\u00edtica, es decir enzim\u00e1tica, depende de su secuencia de amino\u00e1cidos que determina la conformaci\u00f3n de la cadena. Solamente unos cuantos amino\u00e1cidos de la enzima, que se sit\u00faan en el llamado sitio activo, son responsables de la cat\u00e1lisis. El centro activo se compone del centro catal\u00edtico y del centro de enlace (separados espacialmente); el primero es responsable de la naturaleza qu\u00edmica de la reacci\u00f3n (especificidad por el sustrato). Mientras que el primero puede ser relativamente inespec\u00edfico, la especificidad del centro de enlace es extremadamente alta, de tal forma que solo unas pocas sustancias de naturaleza qu\u00edmica muy parecida pueden ser empleadas como sustratos. El centro activo se encuentra en un "surco" o "cavidad" de la enzima estableci\u00e9ndose uniones por valencias secundarias entre los grupos reactivos y el sustrato, que conducen a la ruptura de uniones en el sustrato.

Una de las primeras teor\u00edas que dio cuenta de la forma en que se acoplan la enzima y el sustrato fue la hip\u00f3tesis de la "llave y cerradura", de E. Fisher (1894). Lo esencial de esta teor\u00eda era el reconocimiento de que el sustrato implicaba una compatibilidad estructural \u00fanica entre el sitio activo de la enzima y el sustrato. Obviamente, esta idea es bastante aplicable a las enzimas que exhiben especificidad absoluta. Sin embargo, la limitaci\u00f3n de la hip\u00f3tesis fue que implicaba que la enzima era r\u00edgida. Por lo tanto, no explicaba especificidad relativa (Fig. 2.3).

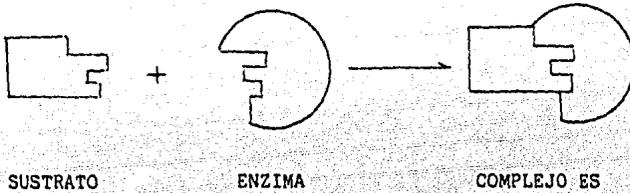


Fig. 2.3 Teoría de la "llave y cerradura", propuesta por E. Fisher en 1894, para explicar la especificidad de la acción de la enzima sobre el sustrato.

La insuficiencia de la teoría de Fisher, fue resuelta por D. Koshland con la teoría de "ajuste inducido". Esta teoría se basa en la premisa de que la estructura conformacional de la proteína es flexible, y sugiere que la interacción inicial de unión del sustrato promueve pequeñas alteraciones en la conformación de la enzima, produciendo la orientación óptima de los residuos aminoácidos del sitio activo para la máxima unión con el sustrato. En las enzimas que son dependientes de cofactores, este cambio puede inducirse por la unión inicial del cofactor, produciendo así la unión más probable del sustrato. Esta hipótesis explica en forma más adecuada el alto grado de especificidad relativa presentada por varias enzimas, puesto que sustratos similares pero diferentes podrían iniciar el desarrollo del sitio activo. (Fig. 2.4). La descripción de lo que ocurre en el sitio activo antes, durante y después de la reacción ha sido difícil de explicar, debido principalmente a que no existe un mecanismo universal de acción enzimática, por lo que cada caso debe ser estudiado en forma particular para poder conocer los pasos de la reacción, y a que muchos mecanismos involucran la formación de infinitud de enlaces y la reacción transcurre a través de muchas etapas - - (Fig. 2.5).

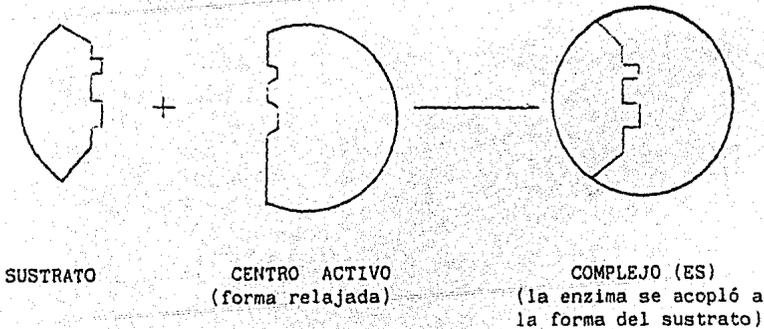


Fig. 2.4 Teoría del acoplamiento inducido, presentada por D. Koshland para solucionar algunas deficiencias de la teoría de E. Fisher.

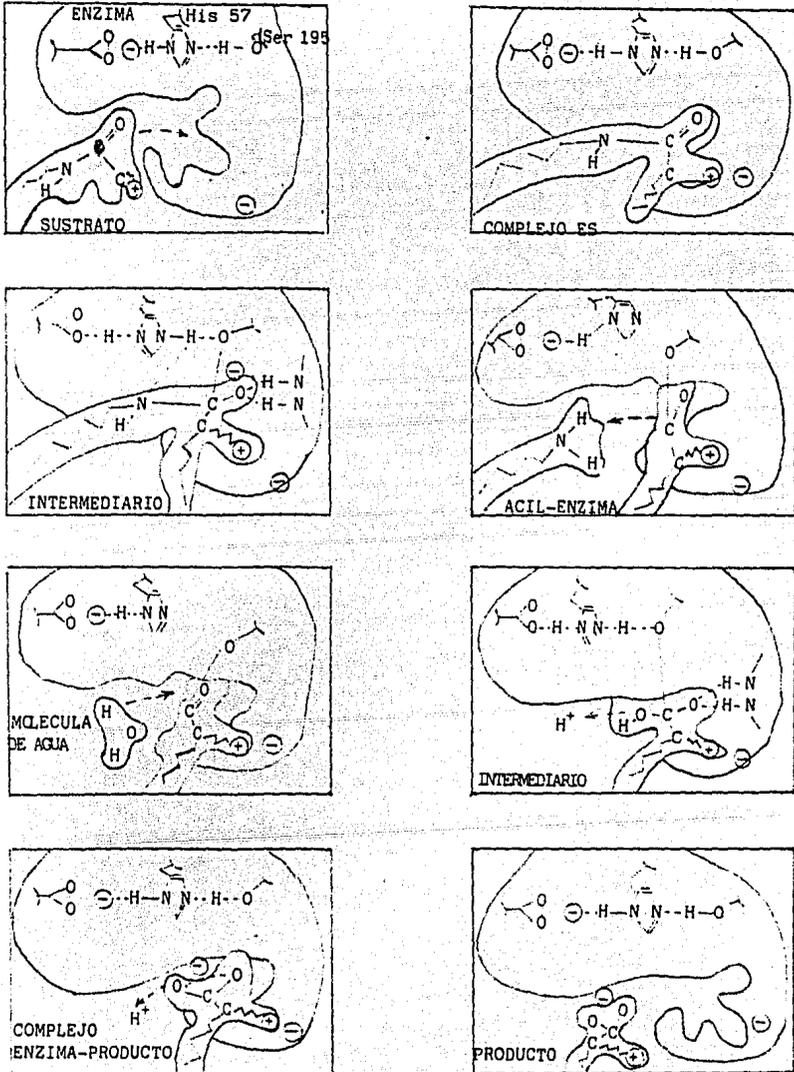


Fig. 2.5 Mecanismo propuesto para la degradación de una unión peptídica mediante tripsina.

7. Principios Termodinámicos

Desde el punto de vista termodinámico, las transformaciones químicas, su extensión y posibilidad de ocurrencia están gobernadas por el flujo de energía que pueda ocurrir. Estos conceptos son tratados por la primera y segunda ley de la Termodinámica, que permite conocer la dirección de las reacciones químicas. Los principios de la termodinámica son establecidos en función de parámetros que describen las transformaciones químicas y físicas de los sistemas, tal como la entalpía, entropía y energía libre, el último de los cuales, ha probado ser el más útil para entender los procesos bioquímicos, de los cuales las reacciones enzimáticas forman parte.

El primer principio de la termodinámica, que se refiere a la conservación de la energía, establece que aunque se trate con un sistema finito de moléculas dentro de un recipiente, es generalmente imposible obtener la magnitud U , o energía total del sistema. Pero si, al sistema se agrega energía en forma de calor Q , entonces:

$$Q = U + W \quad (2.1)$$

donde U es el cambio total de energía y W es el trabajo total, si es que hay y se ha desarrollado.

En muchos casos la adición de energía como calor Q al sistema, puede resultar en un cambio en volumen, cuando se mantiene la presión constante. Este cambio, PV , es en efecto una forma de trabajo, formándose entonces parte del término W en la ecuación (2.1). Sin embargo, este raramente es una forma útil de trabajo; por lo que se ha visto la conveniencia de cambiar este componente por $-W$ en el cambio de U , con lo cual se define un nuevo término, H , entalpía o contenido de calor. El cambio de entalpía en cualquier proceso, a presión constante, es:

$$H = U + P V \quad (2.2)$$

y la primera ley de la termodinámica se puede expresar como:

$$Q = H + W' \quad (2.3)$$

donde W' es entonces el trabajo útil que acompaña la introducción de una cierta cantidad de calor Q , al sistema.

La primera ley de la termodinámica según se estableció, constituye una descripción adecuada de un sistema ideal reversible, o sea, uno en el cual la energía utilizada para alterar el sistema, es liberada en igual cantidad y está disponible para realizar algún otro tipo de trabajo cuando el sistema regresa a su estado original. Sin embargo, tales casos de reversibilidad perfecta no ocurren. Parte del incremento en entalpía, resultante de la adición de energía al sistema, no está disponible cuando el sistema regresa a su estado original. Así se tienen experiencias comunes de que algunos procesos químicos y físicos ocurren espontáneamente solo en una dirección: p. ej., el agua corre cuesta abajo, o los iones hidróxilo y protones reaccionan, ambos con desprendimiento de energía. Sin embargo, el agua caliente no sube cuesta arriba o da por resultado la disociación en iones. Todos estos procesos pueden describirse en función del concepto de equilibrio. Los cambios espontáneos tienden al equilibrio, y no ha alejarse de él, lo cual representa una manera de establecer el segundo principio de la termodinámica. La manera simple de describir la segunda ley, es en términos de

otra cantidad termodinámica, la entropía (S), como aquella fracción de la entalpía que no puede ser utilizada para realizar trabajo útil, ya que, en muchos casos ha sido utilizada en incrementar el movimiento al azar de las moléculas en el sistema. El producto TS, representa la energía gastada en este concepto, en donde T es la temperatura. En términos de S, la segunda ley establece que, dada la oportunidad, cualquier sistema va a cambiar espontáneamente en la dirección que resulte en el incremento de la entropía. El equilibrio se alcanza cuando la entropía llega a un máximo; y no habrá cambios posteriores espontáneos a menos que se agregue energía desde el exterior.

Consideremos el caso de agregar calor al sistema. Ya que el calor representa la energía cinética del movimiento molecular al azar, la adición de calor incrementa la entropía. Si el sistema está en equilibrio, se tiene que

$$Q = T\Delta S \quad (2.4)$$

Si el sistema no está en equilibrio, de cualquier manera, ocurrirá un cambio espontáneo en el sistema que incrementará la entropía aún sin darle calor. Así en general, para sistemas que no están en equilibrio

$$T\Delta S > 0 \quad (2.5)$$

Si se combinan las ecuaciones (2.3) y (2.4), para un sistema en equilibrio, obtenemos

$$\Delta H = T\Delta S - W' \quad (2.6)$$

Sin embargo, rara vez se está interesado en el equilibrio, centrandose el interés en que las reacciones se lleven a cabo, según se pueda, en la dirección que lo permita el equilibrio y a una sola temperatura. Para tales casos, la ecuación (2.5) modifica lo establecido en la ecuación (2.6), por lo que se tiene que

$$\Delta H < T\Delta S - W' \quad (2.7)$$

Esto permite la introducción de un parámetro de gran importancia llamado -energía libre G. Que se define como

$$\Delta G = H - TS \quad (2.8)$$

En general, el cambio de energía libre, G, es la energía que está disponible para ser utilizada y llevar a cabo un trabajo; si así se quiere entender, es la forma en que un sistema llega al equilibrio, cuando la temperatura es constante, que sería el caso de un sistema enzimático que generalmente trabaja a temperatura constante.

Para un sistema que no está en equilibrio

$$\Delta G = -W' \quad (2.9)$$

Así, los sistemas que no estén en equilibrio procederán espontáneamente a ese estado en la dirección de un cambio de G negativo. Cuando el equilibrio se alcanza, no habrá más cambios espontáneos y la energía libre será igual a cero, por lo que para llevarlo a otro estado será necesario agregar energía al sistema.

8. Equilibrio Químico

En un sistema cerrado, las enzimas no son capaces de desplazar el equilibrio, y sólo actúan modificando la velocidad con que este se alcanza. Según se sabe los catalizadores y en especial las enzimas disminuyen la energía de activación necesaria para que se lleven a cabo las reacciones. Por ejemplo, para la reacción:



con una constante de equilibrio K, con

$$K = \frac{(C)(D)}{(A)(B)}$$

la reacción catalizada por una enzima, sólo podrá transcurrir si el cambio en energía libre ΔG , es menor a cero, o

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{(C)(D)}{(A)(B)}$$

y puesto que en el equilibrio, G es igual a cero, entonces

$$\Delta G^\circ = - RT \ln K$$

de donde se puede saber si la reacción tal como se escribió procede espontáneamente.

Para que la reacción $A \rightarrow P$ pueda llevarse a cabo, es necesario -- que cierta fracción de la población de moléculas de A, en cualquier instante, -- posea suficiente energía como para alcanzar un estado activo, llamado Estado de Transmisión; y la velocidad a la cual ocurrirá se haya directamente relacionado con la cantidad de energía que se debe suministrar antes de que A pueda convertirse en P. Según lo anterior, esta energía debe ser la suficiente para llevar y transponer la barrera de energía que existe entre reaccionantes y productos, -- la cual es denominada Energía Libre de Activación ΔG^\ddagger (Fig. 2.6)

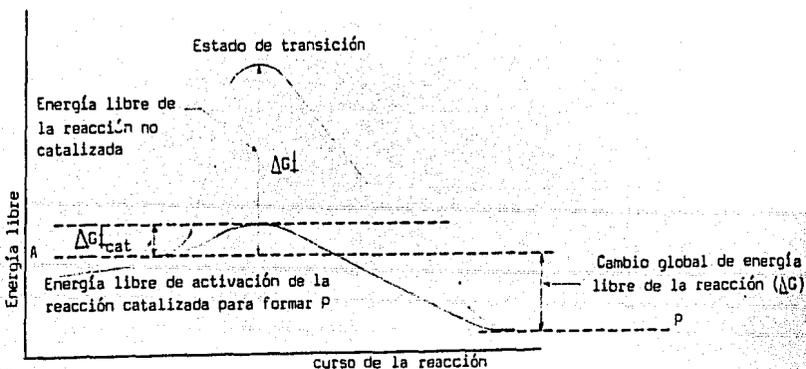


Fig. 2.6 Diagrama de energía libre para una reacción no catalizada y catalizada.

De acuerdo con lo anterior, si se agrega energía a la reacción (p. ej., - aumentando la temperatura), se provoca un incremento en el movimiento térmico - de las moléculas, con lo cual aumenta el número de ellas que son capaces de alcanzar el estado de transición, aumentando con esto la velocidad de reacción.

Por otro lado, si la reacción es llevada por otro camino, por el cual la energía de activación es disminuida para el paso de reactivos a productos, se puede lograr un aumento en la velocidad de reacción. Los catalizadores, y en especial las enzimas, son compuestos que tienen la capacidad de aumentar la velocidad de una reacción conduciéndola por un camino diferente al no catalizado, que da por resultado una disminución en la energía de activación sin intervenir en el equilibrio químico de ésta.

9. Cinética Química

A continuación se presentan los principios fundamentales de la cinética química como una introducción al estudio de la cinética enzimática.

9.1 Definición de Velocidad de Reacción.

La siguiente definición para la velocidad de reacción, se basa en resultados experimentales sobre un amplio rango de condiciones de operación. La velocidad neta de desaparición del componente A de una mezcla reaccionante dada, se define como:

$$r_A = \frac{\text{Moles de A que desaparecen}}{(\text{unidad de tiempo})(\text{unidad de volumen})} \quad (2.10)$$

Supongamos que la mezcla de reacción consiste de los componentes A, B, C y D, a una presión y temperatura dados. Entonces la velocidad de reacción se puede esperar que dependa de esos elementos, o

$$r_A = f(T, P, C_A, C_B, C_C, C_D) \quad (2.11)$$

La forma de esta función deberá ser determinada experimentalmente, a la cual se le llama simplemente expresión de velocidad. La forma de la función dependerá de como las moléculas participan en la reacción y es independiente del tipo de reactor usado. Si suponemos que, para el ejemplo mencionado, la estequiometría de la reacción está dada por:



La velocidad de reacción, se puede definir en función de la velocidad de desaparición de A o B, como r_A o r_B respectivamente, o bien en términos de aparición de los compuestos C y D, como r_C o r_D . La estequiometría de la reacción dice que b moles de B reaccionan cada vez que a moles de A reaccionan. Entonces B desaparece a un ritmo de b/a, más rápidamente que a, o

$$r_B = \frac{b}{a} r_A \quad (2.12)$$

y también, por cada a moles de A que reaccionan, se forman c moles de C y d moles de D, entonces

$$r_C = \frac{c}{a} r_A \quad \text{y} \quad r_D = \frac{d}{a} r_A$$

En general, no es posible el predecir el mecanismo de una reacción a partir de la estequiometría, por lo cual está y la forma de la expresión de velocidad (ec. 2.10), deberán ser determinadas experimentalmente. Por ejemplo, si se encuentra por este medio, que la expresión para la velocidad de reacción está dado por:

$$r_A = kc_A^{n_1} C_B^{n_2} C_C^{n_3} \quad (2.13)$$

entonces el orden N de la reacción se define como:

$$N = n_1 + n_2 + n_3 \quad (2.14)$$

Algunas veces, el orden es expresado en función de alguno de los participantes y para la reacción propuesta, ésta es de orden n_1 con respecto al componente A.

La constante kc es llamada constante de velocidad o velocidad de reacción específica y significa la velocidad de reacción cuando la concentración de los participantes es igual a la unidad.

La molecularidad de una reacción química se define como el número mínimo de moléculas que deben combinarse o interactuar, cuando la reacción ocurre en una dirección dada. En este punto la molecularidad y la ley de acción de masas están íntimamente ligadas. Por definición esta ley establece que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de cada uno de los reactantes, en donde cada reactante está elevado a la potencia expresada por el coeficiente estequiométrico de la sustancia en la expresión química que describe el proceso. Entonces, para las reacciones uni, bi y trimoleculares, las ecuaciones de velocidad pueden ser, de acuerdo al concepto anterior:

Unimoleculares: $A \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A \quad (2.15)$$

Bimoleculares: $2A \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A^2 \quad (2.16)$$

$A + B \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A C_B \quad (2.17)$$

Trimoleculares: $3A \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A^3 \quad (2.18)$$

$2A + B \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A^2 C_B \quad (2.19)$$

$A + B + C \longrightarrow$ productos

$$r_A = kc C_A C_B C_C \quad (2.20)$$

Aunque se usa el mismo símbolo k_c en cada una de las ecuaciones anteriores, este es diferente para cada caso. En estos casos k_c está definido con respecto al componente A. Si se deseara expresar con respecto a otro de ellos, - - p. eje., para B en la reacción $2A + B \rightleftharpoons$ productos,

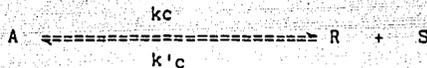
$$r_B = \frac{1}{2} r_A$$

por lo que:

$$r_B = \frac{1}{2} k_c C_A^2 C_B \quad (2.21)$$

donde k_c es la constante de velocidad con respecto al componente A y la constante con respecto a B será: $k_{cB} = \frac{1}{2} k_c$.

La molecularidad así como el orden son siempre establecidos para una sola reacción, en un solo sentido; así la molecularidad de la reacción inversa para una reacción reversible puede diferir de aquella en la dirección opuesta; en la reacción:

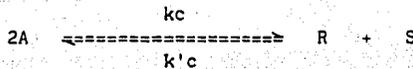


la reacción a la derecha es unimolecular y la reacción inversa es bimolecular.

Por otro lado, si la reacción se lleva a cabo como se escribe, el orden de reacción es igual a la molecularidad. Sin embargo, el caso contrario no necesariamente es cierto; esto es, una reacción puede ser de primer orden pero no necesariamente unimolecular. La reacción puede de hecho tener un mecanismo complejo, y tener una velocidad de reacción representada por una expresión empírica -- que dependa de la primera potencia de la concentración de alguno de los reactivos.

9.2 Reacciones reversibles y equilibrio termodinámico.

La velocidad de reacción como se definió en la ecuación (2.10), es igual a la velocidad neta de desaparición de A por medio de todas las reacciones que ocurren. Cuando ocurre una reacción reversible tal como:



la velocidad neta de reacción es igual a la reacción en el sentido de formación de productos menos la reacción contraria. Esto es, desaparece por la reacción



con una velocidad

$$r_{Ad} = k_c C_A^2 \quad (2.22)$$

y aparece por la reacción:



a una velocidad

$$r_{Ai} = k'_c C_R C_S \quad (2.23)$$

Entonces, r_A la velocidad neta de reacción de A está dada por

$$r_A = r_{Ad} - r_{A1} = kVc_A^2 - k'c_Rc_S \quad (2.24)$$

En el equilibrio termodinámico

$$r_A = 0 \quad (2.25)$$

y la ecuación (2.24) se puede expresar como:

$$Kc = \frac{kc}{k'c} = \frac{c_Rc_S}{c_A^2} \quad (2.26)$$

donde Kc , es la constante de equilibrio de la reacción.

En la literatura se puede encontrar que las expresiones de velocidad son termodinámicamente inconsistentes, p. ej., para la reacción



suponemos que la velocidad experimental de formación de R está representada por:

$$r_R = kc_Ac_B^3 - k'c_R \quad \text{Cuando } r_R = 0$$

$$\frac{k}{k'} = \frac{c_R}{c_Ac_B^3}$$

Para la reacción tal como se escribió, la constante de equilibrio Kc se define -- como

$$Kc = \frac{c_R^2}{c_Ac_B^3}$$

Comparando las expresiones k/k' y Kc , muestran una diferencia en la potencia de c_B . Así, la expresión de velocidad para R, se dice que es termodinámicamente inconsistente, por lo cual se debe tener cuidado de tratar de determinar alguna de las constantes de velocidad a partir de la constante de equilibrio de la reacción. Este hecho resulta de que la reacción no ocurre tal como se escribe, y en lugar de ser una sola reacción, el mecanismo puede estar formado -- por varias reacciones.

9.3 Efecto de la temperatura en las reacciones químicas.

La constante de velocidad kc , normalmente se puede expresar como una función de la temperatura, mediante la ecuación de Arrhenius, que es:

$$kc = A \exp\left(\frac{-E_A}{RT}\right) \quad (2.27)$$

donde: A = factor de frecuencia o constante de Arrhenius
 E = energía de activación
 R^A = constante universal de lo gases
 T = Temperatura

Como se puede observar de la ecuación anterior, se tendrá una variación de la constante con la temperatura. Esta ecuación es seguida por muchas enzimas en rangos moderados de temperatura, fuera de los cuales, se tienen severas desviaciones debido a efectos de desnaturalización.

10. Cinética Enzimática

Complejo Enzima-sustrato.

En 1902, A.J. Brown, en un experimento para medir la hidrólisis de la-sacarosa catalizada por la enzima invertasa, encontró que la velocidad se incrementaba a concentraciones bajas y moderadas de sustrato, pero que esta velocidad llegaba a un límite cuando la concentración de sustrato era elevada considerablemente, con respecto a la de la enzima. Cuando se grafican la velocidad inicial de reacción contra los valores usados de concentración de sustrato a una concentración constante de enzima, se obtiene una curva como la que se muestra en la - figura 2.7.

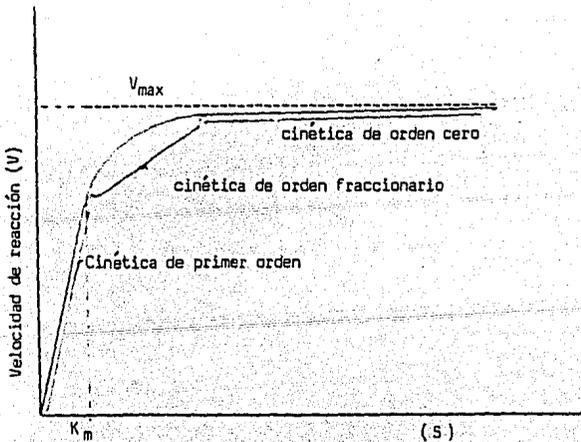
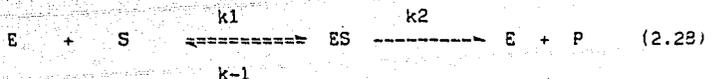


Fig. 2.7 Curva típica de reacción para el sistema enzima (E) sustrato (S).

A partir de este experimento Brown, propuso que la enzima y el sustrato debieran de formar un complejo antes de que la catálisis pudiera ocurrir. Lo anterior puede expresarse en un mecanismo de reacción del siguiente tipo:



en donde ES, es el complejo enzima-sustrato y P el producto de la reacción. En la gráfica de la figura 2.7, V_{max} , se conoce como velocidad de saturación y expresa la máxima velocidad de reacción para el sistema enzima-sustrato, cuando la concentración de la enzima se mantiene constante y la del sustrato se eleva considerablemente. Esto es un hecho que se ha relacionado con la formación del complejo. Este tipo de evidencias y algunas otras que se obtienen de experimentos en donde se detecta la presencia directa de los complejos, han corroborado esta teoría.

La forma de la curva de la figura 2.7, es la de una hipérbola rectangular y en ella se pueden distinguir claramente tres segmentos en el desarrollo de la reacción, con el aumento de la concentración de sustrato a una concentración constante de enzima. Primero, a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad es proporcional a la concentración de éste, siendo la reacción de primer orden con respecto al mismo. A continuación, el aumento de sustrato provoca una disminución de la velocidad inicial y el orden se convierte a mixto. A una concentración alta de sustrato, la velocidad se acerca asintóticamente a un valor constante (V_{max}) y la reacción es de orden cero con respecto al sustrato, en éste punto se dice que la enzima se haya saturada con el sustrato.

10.1 Velocidad de reacción para el sistema enzima-sustrato

El descubrimiento de la formación del complejo enzima-sustrato fue una de las contribuciones más importantes para el estudio de la cinética enzimática, por lo que ha conducido en parte a plantear los modelos de reacción enzimáticas con los que actualmente se trabaja.

Historicamente (Henri en 1901, Michaelis-Menten en 1913, Van Slyke Cu--- llen en 1914) se desarrollaron diversas ecuaciones de reacción para describir el mecanismo propuesto en la ecuación (2.28), que dieron por resultado la forma de ecuación que es comúnmente conocida como de Michaelis-Menten.

De la ecuación (2.28), se puede observar que el mecanismo consta de tres pasos elementales de reacción. Primero, la enzima E y el sustrato S se combinan en un paso bimolecular con una constante de velocidad k_1 , para formar el complejo enzima-sustrato ES. El segundo paso consiste de una disociación que puede tener lugar antes de que la catálisis haya ocurrido, regenerando la enzima y el sustrato, y por último, después de que ocurrió la catálisis, se forma el producto P y se regenera la enzima. Estos dos últimos pasos se llevan a cabo con una constante de velocidad de k_{-1} y k_2 respectivamente y que son monomoleculares en su naturaleza.

Desde un punto de vista práctico, las concentraciones de las especies E- y ES no son fácilmente determinables, por lo cual, como primera premisa para el planteamiento de la ecuación de velocidad del mecanismo propuesto, está debe expresarse en función de especies medibles en el transcurso del proceso, esto es, concentraciones de sustrato o producto.

$$V = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k_2 (ES) \quad (2.29)$$

Para eliminar el término (ES), se plantea un balance de materia para la enzima, la cual se distribuye como enzima libre E y enzima en forma de complejo-ES, que sumadas dan la concentración de enzima total (E_0), o:

en donde ES, es el complejo enzima-sustrato y P el producto de la reacción. En la gráfica de la figura 2.7, V_{max}, se conoce como velocidad de saturación y expresa la máxima velocidad de reacción para el sistema enzima-sustrato, cuando la concentración de la enzima se mantiene constante y la del sustrato se eleva considerablemente. Esto es un hecho que se ha relacionado con la formación del complejo. Este tipo de evidencias y algunas otras que se obtienen de experimentos en donde se detecta la presencia directa de los complejos, han corroborado esta teoría.

La forma de la curva de la figura 2.7, es la de una hipérbola rectangular y en ella se pueden distinguir claramente tres segmentos en el desarrollo de la reacción, con el aumento de la concentración de sustrato a una concentración constante de enzima. Primero, a concentraciones bajas de sustrato, la velocidad es proporcional a la concentración de éste, siendo la reacción de primer orden con respecto al mismo. A continuación, el aumento de sustrato provoca una disminución de la velocidad inicial y el orden se convierte a mixto. A una concentración alta de sustrato, la velocidad se acerca asintóticamente a un valor constante (V_{max}) y la reacción es de orden cero con respecto al sustrato, en éste punto se dice que la enzima se haya saturada con el sustrato.

10.1 Velocidad de reacción para el sistema enzima-sustrato

El descubrimiento de la formación del complejo enzima-sustrato fue una de las contribuciones más importantes para el estudio de la cinética enzimática, por lo que ha conducido en parte a plantear los modelos de reacción enzimáticas con los que actualmente se trabaja.

Historicamente (Henri en 1901, Michaelis-Menten en 1913, Van Slyke Cu---llen en 1914) se desarrollaron diversas ecuaciones de reacción para describir el mecanismo propuesto en la ecuación (2.28), que dieron por resultado la forma de ecuación que es comúnmente conocida como de Michaelis-Menten.

De la ecuación (2.28), se puede observar que el mecanismo consta de tres pasos elementales de reacción. Primero, la enzima E y el sustrato S se combinan en un paso bimolecular con una constante de velocidad k₁, para formar el complejo enzima-sustrato ES. El segundo paso consiste de una disociación que puede tener lugar antes de que la catálisis haya ocurrido, regenerando la enzima y el sustrato, y por último, después de que ocurrió la catálisis, se forma el producto P y se regenera la enzima. Estos dos últimos pasos se llevan a cabo con una constante de velocidad de k₋₁ y k₂ respectivamente y que son monomoleculares en su naturaleza.

Desde un punto de vista práctico, las concentraciones de las especies E y ES no son fácilmente determinables, por lo cual, como primera premisa para el planteamiento de la ecuación de velocidad del mecanismo propuesto, está debe expresarse en función de especies medibles en el transcurso del proceso, esto es, concentraciones de sustrato o producto.

$$V = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = k_2 (ES) \quad (2.29)$$

Para eliminar el término (ES), se plantea un balance de materia para la enzima, la cual se distribuye como enzima libre E y enzima en forma de complejo ES, que sumadas dan la concentración de enzima total (E₀), o:

$$(E_0) = (E) + (ES) \quad (2.30)$$

y si sabemos que la velocidad de cambio de (ES) con el tiempo debe ser igual a la diferencia entre los pasos en que se forma y aquellos en que desaparece, entonces

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_1 S (E) - k_{-1} (ES) - k_2 (ES) \quad (2.31)$$

despejando el valor de (E) de la ecuación (2.30), y sustituyendo en la ecuación anterior obtenemos

$$\begin{aligned} \frac{d(ES)}{dt} &= k_1 S ((E_0) - (ES)) - (k_{-1} + k_2) (ES) \\ &= k_1 S (E_0) - (k_1 S + k_{-1} + k_2) (ES) \end{aligned} \quad (2.32)$$

Si se despeja (ES) de esta ecuación, tenemos que

$$(ES) = \frac{k_1 S (E_0) - \frac{d(ES)}{dt}}{k_1 S + k_{-1} + k_2} \quad (2.33)$$

En el inicio de la reacción, el sustrato y la enzima son mezclados repentinamente y la formación de ES se inicia con una velocidad igual a $k_1 S (E_0)$, ya que la concentración de ES es prácticamente cero. Con el paso del tiempo, ES llega a un nivel de estado estacionario apropiado a las concentraciones iniciales de S y E, para que con el paso del tiempo, ES disminuya por la disminución de S a causa de la reacción. Si al inicio de la reacción $S \gg (E_0)$, esta disminución debida al cambio de concentración de S es relativamente lenta durante el estado estacionario, por lo que el valor de $d(ES)/dt$ es mucho menor que $k_1 S (E_0)$, a lo cual se le da el nombre de velocidad rápida de formación de ES en el inicio de la fase transitoria, por lo cual la ecuación (2.33) se puede simplificar a la forma

$$ES = \frac{k_1 S (E_0)}{k_1 S + k_{-1} + k_2} \quad (2.34)$$

Si se sustituye este valor de estado estable de ES en la ecuación (2.29), nos resulta la ley de estado estacionario para el mecanismo de la ecuación, (2.28), que fue propuesta por Briggs y Haldane en 1925:

$$V = \frac{k_2 k_1 S (E_0)}{k_1 S + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 S (E_0)}{S + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad (2.35)$$

Cuando S (E_0) , la enzima se satura con sustrato y prácticamente toda la enzima se encuentra en forma de ES, entonces se dice que la enzima trabaja a su máxima capacidad, por lo que la velocidad de reacción es máxima, y la ecuación (2.35) se convierte en

$$v = k_2(ES) \tag{2.36}$$

$$V_{max} = k_2(E_0) \tag{2.37}$$

Por otro lado, si todas las constantes de velocidad del denominador se agrupan en una sola constante K_M llamada constante de Michaelis-Menten, la ecuación (2.35) puede expresarse como

$$v = \frac{V_{max} S}{S + K_M} \tag{2.38}$$

Un caso especial de esta ecuación, lo constituye el hecho de que k_2 sea mucho menor que k_{-1} . Esto causaría que la formación del complejo a partir de la enzima y el sustrato alcanzará el equilibrio termodinámico, teniendose que

$$k_1 S(E) = k_{-1}(ES)$$

y eliminando k_2 de la ecuación (2.34), se obtiene

$$(ES) = \frac{k_1 S(E_0)}{k_1 S + k_{-1}} \tag{2.39}$$

que si se sustituye en la ecuación (2.29), daría finalmente

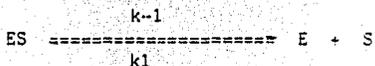
$$v = \frac{k_2 S(E_0)}{S + \frac{k_{-1}}{k_1}} \tag{2.40}$$

Esta ecuación llamada de quasi-equilibrio, difiere de aquella de velocidad de estado estacionario, en que k_2 se ha omitido. Esta ecuación fue propuesta inicialmente por Michaelis & Menten en 1911. Haciendo las sustituciones de V_{max} y K_M se obtiene

$$v = \frac{V_{max} S}{S + K_M} \tag{2.41}$$

con: $V_{max} = k_2(E_0)$ y $K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$

A partir de esta ecuación y de la definición de K_M se llega algunas veces a la conclusión errónea de que K_M es igual a la constante de disociación de la reacción enzimática.



que según se definió en la ecuación (2.35), nunca será cierto por el término k_2 .

Otro caso especial lo constituye el de Van Slyke y Cullen (1914) -- que proponía el caso de que $k_2 \gg k_{-1}$, difiriendo su expresión de la ley de estado estacionario que el término k_{-1} , que es eliminado de la constante de Michaelis-Menten.

10.2 Efecto de la Temperatura sobre la velocidad de reacción

Como todas las reacciones químicas, las enzimáticas se ven afectadas por la temperatura. Al aumento de la velocidad de reacción por causa de la temperatura, se sobrepone el efecto de desnaturalización térmica (Cap. I). Las enzimas presentan un punto óptimo de funcionamiento con respecto a la temperatura (fig.-2.8). En su primera etapa, esta curva puede ser descrita por la ley de Arrhenius y en la segunda, generalmente es posible ajustar modelos de desactivación de primer orden.

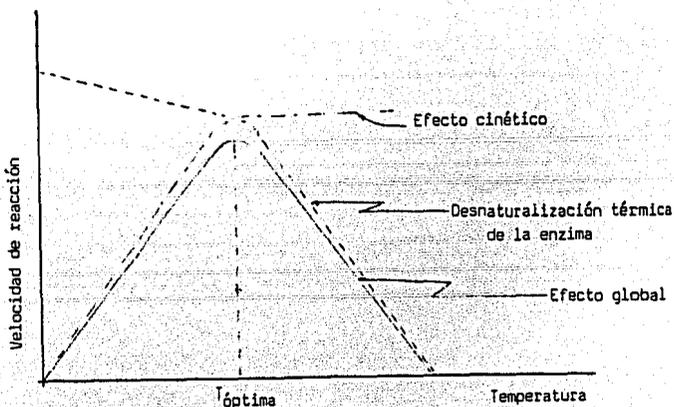


Fig. 2.8 Efecto de la temperatura sobre la velocidad en una reacción enzimática.

10.3 Efecto del pH

Ya que las enzimas son anfóteras, se puede esperar un pronunciado efecto del pH en la actividad enzimática. Lo que es de notar, es el reducido rango de pH en el cual las enzimas son activas. El comportamiento seguido por ellas es similar al descrito para la temperatura; este efecto puede ser debido a tres fenómenos independientes:

- Desnaturalización irreversible a pH extremos, debido a la pérdida de su estructura especial por ruptura de enlaces no covalentes.
- Ionización del sustrato si posee grupos polares.
- Estado de ionización de la enzima.

Hay que hacer notar que el pH al cual la enzima alcanza su máxima actividad, no necesariamente coincide con aquél al cual se observa su máxima estabilidad.

10.4 Efecto pH-Temperatura

Uno de los principales problemas en la creación de modelos de sistemas - enzimáticos, es la interacción entre las variables ambientales, tal como el pH - y la temperatura. Por ejemplo, si la temperatura cambia, provoca que el pH ópti - mo de la reacción también varíe. (Fig. 2.9)

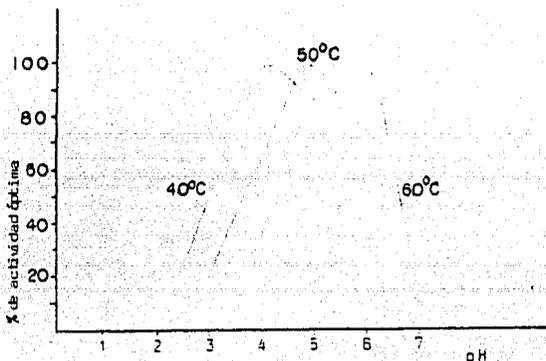


Fig. 2.9 Curva de actividad-pH para la alfa-amilasa en función de la -- temperatura (tomado de ... "The Kinetics of Biosystem", A. Review, A.E. Hum - phrey, Chemical Reaction Engineering, 1978).

10.5 Otros factores que modifican la velocidad de reacción.

Para muchas enzimas globulares (peso molecular de 10^5 ó mayor) que usual - mente constan de varias subunidades (estructura cuaternaria), su actividad se - ve afectada por la disociación de éstas. Por otro lado, esta actividad enzimática puede desaparecer si las unidades forman agregados (asociaciones), aunque esto es menos común.

Estos fenómenos que son comunes en las proteínas, pueden ocurrir por - efecto de la dilución o concentración de las soluciones, cambios de temperatura, pH y fuerza iónica. También pueden ocurrir por efecto de algunos agentes químicos como la urea, hidrocarburos y detergentes, entre otros. En general el fenó - meno de disociación es reversible cuando la causa es la dilución ó agentes quí - micos.

Para muchas enzimas, la asociación de dos o más subunidades idénticas o - diferentes es necesaria para su actividad y la asociación/disociación de estos - conglomerados es otro factor a considerar en el estudio y planteamiento de mode - los de reacciones catalizadas por enzimas.

10.6 Inhibición de las reacciones enzimáticas

Otro aspecto importante que se debe tomar en cuenta, es la existencia de una serie de "desviaciones" que algunas enzimas presentan con respecto al comportamiento de Michaelis-Menten, siendo el más común la inhibición de la reacción por exceso de sustrato. Existen varias explicaciones a este fenómeno, -- siendo la más aceptada el hecho de que la enzima se une al sustrato por varios enlaces, por lo que a altas concentraciones, dos moléculas de sustrato pueden ocupar un sitio activo, volviéndolo inactivo. El comportamiento cinético se muestra en la figura 2.10.



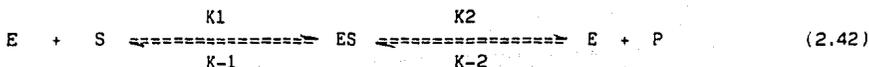
Fig. 2.10 Curva de velocidad para una reacción inhibida por exceso de sustrato.

Otro caso de desviación cinética, es el que se conoce como "Activación por el Sustrato", lo que supone la coexistencia en equilibrio de dos formas de la enzima, donde una de ellas presenta menor actividad (Fig. 2.11).



Fig. 2.11 Comportamiento cinético de una reacción enzimática en la que presenta "Activación por el Sustrato".

Por otro lado, aunque no podría considerarse específicamente como una desviación a la cinética de Michaelis-Menten, la reversibilidad de las reacciones ocasiona comportamientos no descritos por la ecuación (2.41). Supongamos que el mecanismo de una reacción enzimática es:



La ecuación de velocidad estaría dada por

$$v = \frac{SV_{max} \cdot S}{S + K_A (1 + P/K_B)} \quad (2.43)$$

donde:

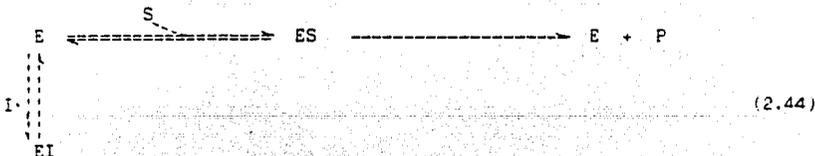
$$K = \frac{K-1 + K2}{K1} \quad y \quad K = \frac{K-1 + K2}{K-2}$$

S = concentración de sustrato
 P = concentración de producto

de donde se puede observar un cambio en el número de términos con respecto a la ecuación de Michaelis-Menten (ec. 2.41).

Por otro lado un gran número de sustancias son capaces, al combinarse -- con las enzimas, de impedir el desarrollo normal de las reacciones. Del estudio de dichas sustancias, conocidas como inhibidores, se ha desprendido la clasificación siguiente, que está dada de acuerdo a la forma en que actúan.

a). Inhibición competitiva. Sucede cuando se agregan sustancias que son semejantes al sustrato, estructuralmente y que se unen al centro activo de la enzima. El inhibidor y el sustrato concurren sobre el mismo centro formando un complejo del tipo enzima-sustrato (ES) o enzima-inhibidor (EI). No se forman complejos del tipo ESI. Este tipo de inhibición se suprime por completo -- elevando la concentración de sustrato; en ciertas reacciones los productos de -- las mismas provocan este tipo de inhibición también. El mecanismo de reacción -- propuesto para este caso es:



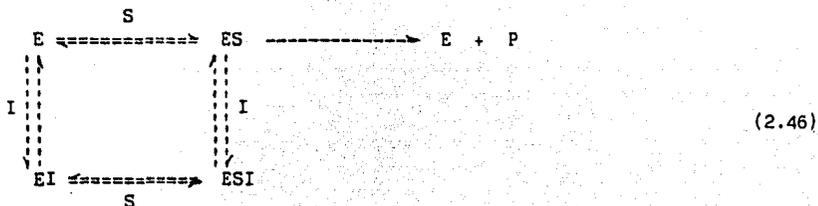
con una ecuación de velocidad

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i} \right) \frac{1}{S} \quad (2.45)$$

donde K_i , es la constante de equilibrio de la reacción $E + I$.

B). Inhibición no competitiva. Este caso ocurre cuando las sustancias inhibidoras se combinan con la enzima tanto como con el complejo enzima-sustrato. -- En estos casos se forman los tres tipos de complejos posibles (ES, EI y ESI), -- de los cuales solamente el complejo ES genera el producto. Este tipo de inhibi -- ción no se vence por completo aumentando la concentración del sustrato.

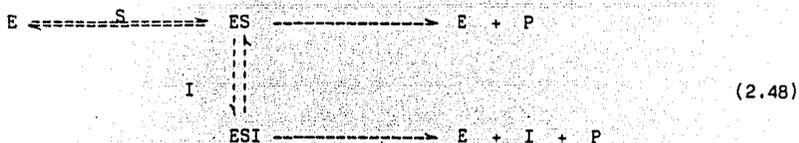
El mecanismo propuesto para este caso es



y una ecuación de velocidad presentada por

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{S}
 \tag{2.47}$$

C). Inhibición acompetitiva. Sucede cuando el inhibidor reacciona sólo con el complejo enzima sustrato y no con la enzima libre. En este caso se forman los complejos ES y ESI. Como en el caso anterior no se vence la inhibición por aumento de la concentración del sustrato. Se propone el mecanismo siguiente para este fenómeno

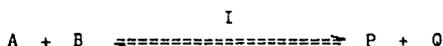


con una ecuación de velocidad

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \left(\frac{1}{S}\right)
 \tag{2.49}$$

D). Inhibición Mixta. Se le ha dado este nombre a aquellas reacciones de --inhibición que no pueden ser encuadradas en alguno de los tres casos anteriores y su acción es más bien una mezcla de ellas. En la figura 2.12 se muestran las gráficas correspondientes a los tres primeros incisos presentados para el fenómeno de inhibición.

El mismo fenómeno de inhibición se puede presentar cuando se tienen dos o más sustratos, siendo el efecto más difícil de observar como se puede apreciar en la tabla 2.2, en donde se muestran los diferentes tipos de inhibición que pueden resultar para una reacción del tipo.



donde A y B son dos sustratos, P y Q dos productos e I un inhibidor.

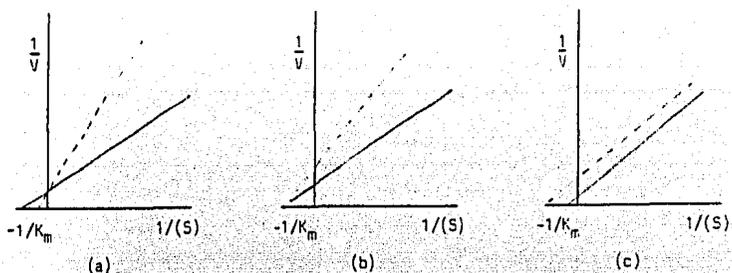


Fig. 2.12 Inhibición: a) competitiva, b) no competitiva c) acompetitiva.

(_____ sin y - - - - - con inhibición)

Sin embargo, no siempre el inhibidor es una sustancia ajena al sistema - reaccionante. Se presentan además, el caso de inhibición por sustrato y la - inhibición por exceso de producto, que son efectos que influyen la velocidad a la que se lleva a cabo las reacciones de los sistemas enzimáticos y que cambian la forma de la ecuación de velocidad. En la tabla 2.3 se presentan los tipos de inhibición por producto para sistemas con dos sustratos y dos productos, con diferente tipo de cinética.

TIPO DE INHIBICION OBSERVADA			
Con respecto A		Con respecto a B	
-----	-----	-----	-----
B no saturante	B saturante	A no saturante	A saturante
Competitiva	Competitiva	Mixta	Ninguna
Mixta	Ninguna	Competitiva	Ninguna
No competitiva	No competitiva	Competitiva	Competitiva
Mixta	No competitiva	No competitiva	No competitiva
Competitiva	Ninguna	Mixta	Mixta

Tabla 2.2 Algunos posibles efectos de inhibidores en reacciones enzimáticas con dos sustratos.

Todos los efectos que se mencionaron anteriormente que influyen el transcurso normal de una reacción enzimática (temperatura, pH e inhibición), difícil tan enormemente el estudio de estos sistemas y hacen que la ecuación de velocidad que se plantea para describir el proceso resulte muy compleja y difícil de manejar si se intenta incluir todos los efectos; pero por otro lado, no pueden ser simplificadas sin una base sólida, sin perder validez por no describir el fenómeno completo que se está llevando a cabo.

El resultado final que se obtenga del estudio cinético de un sistema en-

zimático, dependerá mucho del tipo de uso que se le quiera dar y de la necesidad de una expresión que describa o no el proceso completamente. En el siguiente capítulo se mostrará una metodología para la obtención de la ecuación de velocidad para un mecanismo propuesto, sin importar el tipo o número de componentes que intervengan en el mismo.

Tabla 2.3 Formas de inhibición por producto.

Tipo de cinética	Patrón de inhibición por producto					
	Con respecto a A			Con respecto a B		
	B no saturante	B saturante	A no saturante	A no saturante	A saturante	B saturante
1) $E \xrightarrow{A} E-A \xrightarrow{B} E-AB \xrightarrow{P} E-P$	P competitiva	Competitiva	Mixta	Mixta	Ninguna	Ninguna
2) $E \xrightarrow{A} E-A \xrightarrow{B} E-AB \xrightarrow{P} E-P$	Q mixta	No competitiva	Mixta	Mixta	Mixta	Mixta
3) $E \xrightarrow{A} E-A \xrightarrow{B} E-AB \xrightarrow{P} E-P$	Q mixta	Competitiva	Ninguna	Competitiva	Competitiva	Competitiva
	P Mixta	Ninguna	Ninguna	Competitiva	Competitiva	Competitiva
	Q competitiva	Competitiva	Mixta	Mixta	Mixta	Ninguna

11. Uso presente y futuro de las enzimas.

Como se mencionó en el punto 2 de este capítulo, la principal fuente de obtención de enzimas es la microbiana. De esta fuente se tienen dos casos que son: enzimas intracelulares y extracelulares.

11.1 Enzimas extracelulares

Muchas enzimas son sintetizadas por los microorganismos con fines de crecimiento, metabolismo y mantenimiento. Muchas de ellas operan dentro de la célula en un ambiente altamente estructurado y protegido (enzimas intracelulares), pero algunas son secretadas por la célula hacia su medio ambiente (enzimas extracelulares). Estas enzimas son únicas, si las consideramos como producto microbiano, ya que están hechas para trabajar en beneficio del microorganismo a distancia. Su función es hacer que el alimento este disponible para el microorganismo por hidrólisis, generalmente, de compuestos de alto peso molecular.

Ya que las enzimas extracelulares trabajan en el medio que rodea al microorganismo fuera de la membrana protectora, deben de poseer buena estabilidad a las variaciones de las propiedades físicas y químicas del ambiente. -- Más aún, por el gran volumen en el que las enzimas actúan es necesario que -- sean producidas en gran cantidad. Estos atributos hacen que las enzimas extracelulares sean adecuadas para su uso industrial.

En la actualidad son muchos los productores de enzimas extracelulares y se hayan distribuidos en todo el mundo. Algunos de los más importantes se mencionan en la tabla 2.4 y sus principales productos se enlistan en la tabla 2.5. La tabla 2.4 sólo contiene productores de Europa del Oeste y Estados Unidos, sin embargo, se sabe que también son producidas en la URSS y países de su influencia como Alemania Democrática, Checoslovaquia, Rumania, Hungría-Bulgaria. Además, existen muchas compañías que las producen para su uso interno. En la figura 2.13, se muestra un estimado de la producción mundial en 1976. En ese año, se estimó que las ventas de este tipo de enzimas alcanzó un valor de 150 millones de dolares. En la tabla 2.6 se muestra la distribución de su uso en la industria, de donde se puede observar que en las industrias del almidón y de los detergentes se presenta el mayor consumo; de hecho la industria de los detergentes es la única aplicación no alimenticia de importancia.

La tabla 2.8 muestra el costo del uso de enzimas en varios productos finales. Como se puede observar, el costo de la enzima es muy pequeño comparado con el valor agregado que se obtiene del proceso enzimático; por lo cual la calidad y disponibilidad son más importantes que un costo mínimo en un producto enzimático.

11.2 Enzimas intracelulares

Estas son las producidas por las células y que permanecen asociadas a éstas sin ser secretadas hacia el exterior. Muy pocas enzimas de este tipo son producidas en gran escala, y las ventas de estas representan un porcentaje muy bajo del total.

Tabla 2.4 Compañías productoras de enzimas extracelulares para uso industrial.

Dinamarca	1. Grindstedvaerket A/S, Brabrand
	2. Novo industri A/S, Bagsvaerd
Francia	3. Soc. Rapidase, Seelin (subsidiaria de la no. 8)
Alemania	4. Miles Kali-Chemie GmbH, Nienburg a.d. Weser (subsidiaria de la no. 20)
	5. Röhm GmbH, Darmstadt
Gran Bretaña	6. ABM, Stockport, Cheshire
	7. Glaxo, Greenford, Middlesex
Holanda	8. Gist Brocades NV, Delft
Japón	9. Amano, Nagoya
	10. Daiwa Kasei, Osaka
	11. Meiji Seika, Tokio
	12. Meito Sangyo, Nagoya
	13. Nagase, Osaka
	14. Sankyio, Tokio
	15. Shin Nippon, Tokio
	16. Yakult Biochemicals, Nishinomiya
Suecia	17. Swiss Ferment AG (subsidiaria de la no. 2)
	18. Schubert AG (subsidiaria de la no. 2)
Estados Unidos	19. GB Fermentation Industries, Kingstree, Carolina (subsidiaria de la no. 8)
	20. Miles, Elkhart, Indiana
	21. Novo Biochemical Industries, Frank Linton, Carolina
	22. Pfizer, Nueva York
	23. Rohm and Haas, Filadelfia

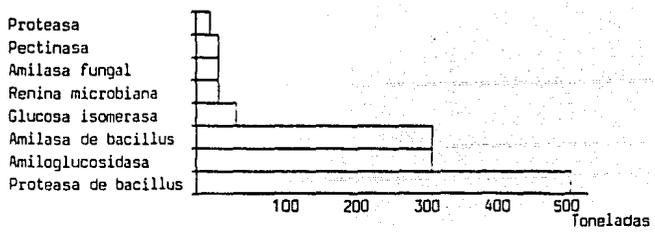


FIG. 2.13 Producción de enzima microbiana expresado en toneladas de proteína pura.

Tabla 2.5 Enzimas extracelulares comerciales, sus nombres comerciales y sus fuentes.

α-amilasa	-Aspergillus oryzae Fungamyl(2);MKC clarase(4);Veron(5);Amylozyme(6);Mylex(7);Fermex, Mylase, Mycolase(9);Asperzyme, Sanzyme, Takadiastasa(14);Clarase, Dextrinase(20); Mycozyme(22);Diestase, Rhozyme(23) -Bacillus amiloliquefaciens (B. subtilis) BAN, Aquazym(2);Rapidase(3);Optiamyl, Optimash, Optisize(4);Bacterase, Nervanase(6);Bactamyl, Maxamyl(8);Biokleistase, Kleistase, Diasmen(10); Biotex, Spitase(13);HT amylasa, Tenase(20) -Bacillus licheniformis Termamyl(2);Thermoase(10)
β-glucanasa	-Aspergillus sp. Glucanase GV(1);β-glucanasa 2000 D(6) -Bacillus amiloliquefaciens Cereflo(2)
Celulasa	-Aspergillus sp. Celulasa C(5);Cellase(8);Celulasa AP(9); Celluzyme(13) -Trichoderma reesei (T. viride) Celulasa(2);Mecelase(11);Celulasa onozuka(16) -Otras fuentes MKC celulasa(4);Celulasa P(5)
Dextranasa	-Penicilin sp. Dextrenasa(2)
Glucoamilasa	-Aspergillus niger (var.) AMC, SAN(2);Optidex, Optisprit(4);Ambazyme(6);Agidex(7);Amigase, Maxydrase(8); Diazyme(29) -Rhizopus sp. Gluzyme(9);Sumyzyme(15)
Hemicelulasa	-Aspergillus niger Galactomannanase(2);MKC Hemicelulasa(4)
Lactasa	-Aspergillus niger Lactasa LP(8)
Lipasa	-Aspergillus sp. Lipasa AP(9);Lipasa B(23) -Candida cylindraceae Lipasa MY(14)
Mutanasa	-Trichoderma sp. Mutanasa(2)
Pectinasa	-Aspergillus sp. Pectolase GV(1);MKC pectinasa, Opticlar(4);Meliovin, Pectinol D, Rohament R(5); Klerzyme (8);Pectinex(17);Ultrazym(18);Spark 1(20);Pectinil(23) -Aspergillus oryzae Veron P(5);Panazyme(6);Prozyme, Biozyme A(9);Sanzyme (14);Sumyzyme AP(15) -Bacillus amiloliquefaciens (B. subtilis) Neutraste(2);Rapidermase(3);Proteinase 18(6);Protin(10);Biopraxe, Nagase(16)
Renina microbiana	-Endothia parasitica Surecurd, Suparen(22)
Pululanasa	-Klebsiella aerogenes Pulluzyme(6)

Nota: los números entre parentesis se refieren a las compañías de la tabla 2.4

Tabla 2.6 Distribución de las ventas de enzimas a nivel mundial.

Enzima	Distribución (%)
Proteasa de bacillus	35
Amiloglucosidasa	14
Glucosa isomerasa	14
Amilasa de bacillus	10
Pectinasa	10
Renina microbiana	5
Amilasa fungal	4
Proteasa fungal	4
Otras	4

Tabla 2.7 Distribución de la utilización de las enzimas en las diferentes industrias.

Aplicación Industrial	Distribución (%)
Detergentes	35
Almidón	30
Frutas, vino	10
Derivados de leche	5
Destilación	5
Molidos, harina	5
Cervecería	4
Otros	6

Tabla 2.8 Costo directo de las enzimas en procesos enzimáticos.

Aplicación	Enzima	Unidades	Costo Enzima (Cts. US Dolls)
Lavado	Proteasa	1 Kg. de detergente	2 - 4
Almidón			
licuefacción	Amilasa	1 Kg. de almidón	0.2 - 0.5
sacarificación	Glucamilasa	1 Kg. de almidón	0.4 - 0.8
isomerización	Glucosa Isomerasa	1 Kg. de almidón	1.0 - 1.5
Manufactura de queso	Renina Microbiana	1 litro de leche	0.1
Manufactura de alcohol	Amilasa	1 litro de alcohol	0.2 - 0.5
	Glucamilasa		0.7 - 1.4
Cervecería	Amilasa	1 litro de cerveza	0.1
	Proteasa		
Repostería	Amilasa	1 Kg. de harina	0.01
	Proteasa		
Jugos	Pectinasas	1 litro de jugo	0.1 - 0.2
Vinos	Pectinasas	1 litro de vino	0.1 - 0.2
Eliminación de pelusa	Proteasas	1 m ² de cuero	1 - 5

Actualmente, la producción de estas enzimas es de gran importancia por el rápido avance en la tecnología enzimática, que permite su uso en forma inmovilizada (como enzimas o célula inmovilizada). Por ejemplo, los procesos comerciales para la producción de jarabes de alto contenido de fructosa-glucosa usando glucosa isomerasa y la acilación de la bencil penicilina por la penicilinacilasa, están bien establecidos. Las enzimas intracelulares son usadas ampliamente en el análisis clínico y su producción es vital para el desarrollo de la investigación bioquímica. Existen también muchos casos donde el objetivo es producir microorganismos que posean un alto nivel de producción de una o más enzimas y que lleven a cabo una bioconversión específica.

En la tabla 2.9 Se enlistan ejemplos de enzimas intracelulares de origen microbiano producidas a escala comercial. Los procesos de producción son de baja capacidad (en el orden de 3 a 30 m³) en comparación con otros -- procesos de la biotecnología, como las fermentaciones industriales (que están en el rango de 50 a 250 m³). En todos los casos el objetivo básico se centra en el paso de fermentación para maximizar la producción de la o de las enzimas deseadas, que lleve a un costo mínimo por unidad de peso de enzimas producidas.

11.3 Uso en tecnología de alimentos.

Actualmente las enzimas encuentran su principal uso directo en la tecnología de alimentos, generalmente en reacciones de hidrólisis. En esta industria son usadas desde tres enfoques diferentes. En primer lugar, el empleo de enzimas específicas en la preparación de alimentos que adquiere cada día mayor importancia. En la tabla 2.10 se dan algunos ejemplos de enzimas usadas con este fin y el efecto que de ellas se busca. En segundo lugar, además del empleo de preparados enzimáticos apropiados, es también importante conocer y dominar los efectos de las enzimas propias de las células animales y vegetales del material que constituye el alimento y que provocan en el transformaciones deseables e indeseables. Por último, es digno de mencionar el empleo de enzimas puras como medio de análisis en química y en alimentos, ya que gracias a ellas pueden ponerse de manifiesto, en las materias primas y en los productos, sustancias que de otro modo requerirían de complicados métodos químicos y físicos de separación. En la tabla 2.11 se dan algunos ejemplos de este uso.

11.4 Aplicaciones industriales en forma inmovilizada

Uno de los métodos que se ha encontrado como útil para alargar la vida de las enzimas ha sido su fijación a soportes sólidos que permitan el uso de las enzimas en forma repetida o continua con un mínimo de pérdida del catalizador o de su actividad.

La inmovilización de enzimas se reportó como factible desde 1916, sin embargo, solamente en los últimos 15 años, se realizaron investigaciones serias y trabajos de desarrollo que permitieron avances significativos en las técnicas de inmovilización aplicables a procesos industriales. Mucho de este trabajo se llevó a cabo por compañías que utilizaban procesos de conversión enzimática. Los principales incentivos han sido el desarrollo de nuevos productos y reducción en el costo de los productos existentes a través de un incremento en la vida de la enzima y su productividad.

Tabla 2.9 Algunos ejemplos de enzimas microbianas intracelulares producidas comercialmente.

Nombre	Fuente	Ejemplos de usos
L-Asparaginasa (3.5.1.1)	<i>Erwinia caratovora</i> <i>Escherichia coli</i>	Tratamiento de leucemia linfática aguda
Catalasa (1.11.1.6)	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminación de H_2O_2 después de la esterilización de leche
Colesterol oxidasa (1.1.3.6)	<i>Nocardia rhodochrous</i>	Análisis clínicos
β -Galactosidasa (3.2.1.23)	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Saccharomyces lactis</i>	Hidrólisis de lactosa en leche
Glucosa isomerasa (5.3.1.5)	<i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Producción de jarabes de glucosa con alto contenido de fructosa
Glucosa oxidasa (1.1.3.4)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium notatum</i>	Análisis clínicos Eliminación de oxígeno de los alimentos
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1.1.1.49)		Análisis clínicos
Invertasa (3.2.1.26)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dulcería
Penicilin acilasa (3.5.1.11)	<i>Escherichia coli</i>	Desacilación de bencilpenicilina

En la tabla 2.12 se presenta una lista de los sistemas más importantes de inmovilización enzimática disponibles por medio de compra o licenciamiento de tecnología. Como se puede observar de la tabla, la glucosa isomerasa es actualmente la aplicación más visible y más importante de las enzimas inmovilizadas. Al final de 1978, se tenía instalada en los Estados Unidos una capacidad de 5 billones de libras de jarabe de maíz de alto contenido de fructosa. Este uso logró en pocos años, que el 42% de los jarabes capturaran una importante proporción de el mercado industrial de edulcorantes en ese país.

El estado actual de la tecnología hace que las enzimas inmovilizadas sean más adaptables a procesos hidrolíticos continuos o de conversión en un solo paso. Esto frecuentemente pone a esta tecnología en competencia con procesos químicos de alto rendimiento de enzimas solubles. La expansión futura a sistemas enzimáticos múltiples, reuso de cofactores enzimáticos y la inmovilización de microorganismos en sí, permitirán que se expanda la aplicación e impacto económico de la inmovilización.

La tendencia generalizada es a la expansión del uso de la inmovilización de materiales biológicos activos (entre ellos las enzimas). El incremento en costos de energía junto con la necesidad de nuevas fuentes de ésta, incrementa el interés en procesos con menor consumo y en la conversión de desperdicios o recursos renovables de bajo costo en fuentes alternativas de su obtención. Además, los desajustes ambientales están presionando a las compañías al desarrollo de nuevas soluciones donde los desperdicios pueden ser procesados hacia productos útiles.

11.5 El futuro

A futuro se vislumbra el uso de las enzimas como medio para la síntesis de muchos productos. Este uso sin embargo, tiene el problema de que las enzimas que sintetizan algún producto en especial llevan consigo el uso de cofactores, hecho que complica el estudio de estos sistemas, ya que la tecnología aún no ha alcanzado el grado de desarrollo necesario para los problemas que plantea.

Otro uso se enfoca al creciente interés en la conversión de energía por sistemas biocatalíticos. In vivo los sistemas biológicos cuentan con mecanismos de conversión de energía muy sofisticados, y en el estado actual de la tecnología, se puede pensar en el uso de estos mecanismos in vitro. Actualmente se han investigado varios sistemas de conversión de energía de una manera limitada.

Estos incluyen lo siguiente:

- a). Recuperación y conversión microbiológica y bioquímica de varios combustibles, principalmente conversión de carbohidratos en hidrógeno, metano y alcoholes de bajo peso molecular.
- b). Conversión de energía solar a combustibles, usando enzimas y mecanismos fotosintéticos de plantas y bacterias, para desarrollar sistemas de fotodescomposición de agua en hidrógeno y oxígeno (biofotólisis de agua).
- c). Conversión de la energía química de combustibles en electricidad por catálisis enzimática de procesos de electrodo para acelerar la ionización de combustibles y oxidantes y el transporte de electrones a electrodos apropiados.

Tabla 2.10 Ejemplos de utilización de enzimas en la tecnología de alimentos.

Glucosa \rightarrow Gluconolactona + H_2O_2	Glucosa-oxidasa	Inhibe la reacción de Maillard (oscurecimiento) en el huevo (cascado), así como el enturbiamiento de la mayonesa
$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$	Catalasa	Sinergia con la glucosa oxidasa, conservación por consumo de O_2 , eliminación de H_2O_2 en la conservación de la leche
Glucosa \rightarrow Fructosa	Glucosa-6-epimerasa	Aumento del sabor dulce en los jarabes y bebidas
Lactosa \rightarrow Galactosa + glucosa	β -galactosidasa	Cambio de consistencia de los helados, su estabilidad de la leche para personas con deficiencia de lactasa
Sacarosa \rightarrow Glucosa + fructosa	β -fructofuranosidasa	Cambio de consistencia de la leche y los helados, así como de la crema para rellenar bombones
Naringina \rightarrow Naringina + naringenina + hidratos de carbono	"Naringinasa"	Aminorar el gusto amargo de los jugos cítricos
Grasas \rightarrow Glicerina + ac. grasos	Lipasa	Obtención de queso fresco, mejorar el aroma del queso, facilitar la preparación del queso, mejor coagulación de la clara de huevo
Almidón \rightarrow Dextrinas + maltosa	α -amilasa	Preparación de mosto de cervecera y malta de destilería, jarabe de almidón, auxiliares de panificación
Almidón \rightarrow Maltosa + Dextrina límite	β -amilasa	Preparación de mosto de cervecera y malta para las destilerías, jarabe de almidón, auxiliares de panificación
Almidón \rightarrow Glucosa	Glucosamilasa	Preparación de glucosa y malta de destilería
Celulosa \rightarrow Glucosa	"Celulasa"	Preparación de alimentos, mejorar extracción de especies degradación de desechos
Pectinmetiléster \rightarrow Pectín COOH + CH_3 OH	Pectina-esterasa	Separación de la celulosa de pectina fibras vegetales, eliminación de turbidez en los zumos de frutas, preparación de pures de frutas y verduras (sinérgicas con la celulasa), preparación de mermelada y jalsas, clarificación de la malta en las destilerías
Pectinmetiléster \rightarrow Restos galacturónicos	Poligalacturonasa	
Pectin-OOH \rightarrow Restos galacturónicos	Pectato-lyasa (Trans-eliminasa)	
Pectinmetiléster \rightarrow Restos galacturónicos $\Delta 4,5$ insaturados		
Hidrólisis de hemicelulosas	Hemicelulasas	Eliminación de la envoltura de hemicelulosa en fibras vegetales
Hidrólisis de enlaces peptídicos	Proteinasas	Mejora de la calidad de la carne (ablandar), preparación de alimentos infantiles, preparación de salsas shoyu, miso y Worcester, separación de las proteínas acompañantes de las grasas, impedir el enturbiamiento de la cerveza por el frío, preparación de harinas ricas en proteínas, limpieza de aparatos en la industria de la alimentación (por ejemplo filtros de las destilerías), agotar los desechos de pescado
Hidrólisis de pocos enlaces de la caseína	Enzimas coagulantes de la leche	Preparación de la cuajada
Pre-arcos del aroma \rightarrow aroma	Enzimas descoloridas	Aromatización de alimentos desecados, preparación de zumos de frutas y hielos

Tabla 2.11 Análisis enzimático en la química de los alimentos.

Reacciones	Enzima	Sustancia determinable
$\text{Etanol} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Acetaldehído} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Alcohol-deshidrogenasa	Etolol
$\text{L-Asparagina} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{L-Aspartato} + \text{NH}_3$	L-Asparaginasa	L-Aspartato
$\text{L-Aspartato} + \text{Acido } \alpha\text{-cetoglútidico} \rightleftharpoons \text{oxalacetato} + \text{L-glutamato}$	Glutamato-oxalacetato-transaminasa	L-Asparagina
$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Malato} + \text{NAD}^+$	Malato-deshidrogenasa	
$\text{Citrato} \rightleftharpoons \text{oxalacetato} + \text{acetato}$	Citrato-lyasa	
$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-malato} + \text{NAD}^+$	Malato-deshidrogenasa	Citrato
$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-lactato} + \text{NAD}^+$	Lactato-deshidrogenasa	
$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P} + \text{ADP}$	Hexoquinasa	Glucosa
$\text{Fructosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Fructosa-6-P} + \text{ADP}$	Hexoquinasa	Fructosa
$\text{Glucosa-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Glucosa-6-P-deshidrogenasa	
$\text{Fructosa-6-P} \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P}$	Fructoglucosa-6-P-epimerasa	
$\beta\text{-Galactosa} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Galactosa-6-fosfato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Galactosa-deshidrogenasa	Galactosa
$\text{Lactosa} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Glucosa} + \text{galactosa}$	β -galactosidasa	Lactosa
$\text{D-gluconato} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Gluconato-6-P} + \text{ADP}$	Gluconato-quinasa	D-gluconato
$\text{Gluconato-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{D-fructosa-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{CO}_2$	6-fosfogluconato-deshidrogenasa	D-gluconolactona
$\text{L-Glutamato} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cetoglútidico} + \text{NADH} + \text{NH}_3$	Glutamato-deshidrogenasa	L-glutamato
$\text{Glicerina} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glicerina-1-P} + \text{ADP}$	Glicero-quinasa	Glicerina
$\text{ADP} + \text{Fosfoenolpiruvato} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{piruvato}$	Piruvato-quinasa	
$\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Lactato} + \text{NAD}^+$	Lactato-deshidrogenasa	
$\text{L-lactato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	L-lactato-deshidrogenasa	L-lactato
$\text{D-lactato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	D-lactato-deshidrogenasa	D-lactato
$\text{L-malato} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Oxalacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Malato-deshidrogenasa	L-malato
$\text{Maltosa} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2 \text{ Glucosa}$	α -glucosidasa	Maltosa
$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P} + \text{ADP}$	Hexoquinasa	
$\text{Glucosa-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Gluconato-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Glucosa-6-P-deshidrogenasa	
$\text{Rafinosa} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Galactosa} + \text{sacarosa}$	α -galactosidasa	Rafinosa
$\text{Galactosa} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Galactonolactona} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Galactosa-deshidrogenasa	
$\text{Sacarosa} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Glucosa} + \text{Fructosa}$	β -fructosidasa	Sacarosa
$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P} + \text{ADP}$	Hexoquinasa	
$\text{Glucosa-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Gluconato-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Glucosa-6-P-deshidrogenasa	
$\text{D-sorbita} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Fructosa} + \text{NADH} + \text{H}^+$	Sorbita-deshidrogenasa	Sorbita
$\text{Almidón} + (n-1) \text{H}_2\text{O} \longrightarrow n \text{ Glucosa}$	Amiloglucosidasa	Almidón
$\text{Glucosa} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Glucosa-6-P} + \text{ADP}$	Hexoquinasa	
$\text{Glucosa-6-P} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{Gluconato-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	Glucosa-6-P-deshidrogenasa	

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Compañía	Enzima								
	Glucosa isomerasa	Glucosa amilasa	Lactasa	Invertasa	Penicilin amidasa	Amino-acilasa	Aspartasa	Fumarasa	Hidantoinasa
Car-Mi	*								
Clinton Corn Processing	*								
Corning Glass Works	*	o	o	o		o			
Diamond Shamrock			o						
Gist-Brocades	*	o	o	o					
ICI	*								
Novo	*								
Snamprogetti	o	o		o	*	u		o	*
Taniabe-Seiyako					*	x	x	x	

Significado de simbolos: * = Escala industrial
 o = Escala laboratorio o planta piloto
 x = Escala industrial pero no disponible por licenciatura de tecnología

CAPITULO III

ECUACIONES DE VELOCIDAD PARA SISTEMAS ENZIMATICOS

En este capítulo, se considera el problema de plantear ecuaciones de velocidad que describan a los mecanismos propuestos para una reacción enzimática. La principal dificultad para obtener un resultado proviene o bien del tratamiento demasiado simplificado de un problema que pueda llevar al desperdicio de buenos resultados experimentales, o a un tratamiento demasiado elaborado que pudiera llegar a ser incomprensible, por lo que el esfuerzo empleado en plantearlo pudiera perderse si los resultados experimentales no fueron obtenidos o tratados adecuadamente. Por lo que, se deberá tener siempre en mente la finalidad que se persigue y los medios con que se cuenta antes de iniciar una tarea de esta índole.

1. Nomenclatura

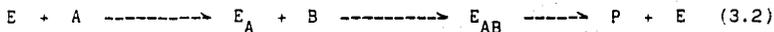
La terminología comúnmente usada en la literatura para nombrar los diferentes tipos de reacción enzimática se basa en un método propuesto por Cleland en 1963.

Según el sistema de Cleland, el número de sustratos o productos en una reacción enzimática se designa con los vocablos uni, bi, ter, etc., numerando siempre primero a los sustratos. Así, a una reacción del tipo



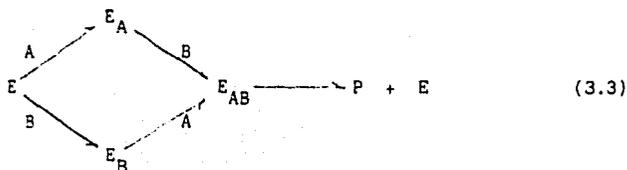
se le da el nombre de uni-bi. De la misma manera se pueden nombrar reacciones bi-bi, bi-ter, para designar reacciones de dos sustratos y tres productos respectivamente. Esta simbología es adecuada para representar mecanismos más complejos, por ejemplo, la nominación bi-bi-uni-uni, designa un mecanismo en el que dos sustratos interactúan para formar dos productos, con una posterior adición de otro sustrato y una liberación final de un tercer producto.

La clasificación de las reacciones puede hacerse, de acuerdo al orden en que se lleva a cabo la interacción de los sustratos y la liberación de los productos. Si la adición de los sustratos y la liberación de los productos son en un orden definido, por ejemplo, si sólo hay un camino de reacción, ésta es llamada Ordenada. Como ejemplo considérese la reacción siguiente:



En esta reacción de dos sustratos (A y B) y un producto (P), sólo hay una manera de formar el complejo E_{AB} , que es: la enzima reacciona con A para formar el complejo E_A , que reacciona con B para dar E_{AB} . La reacción se denomina, por lo tanto, ordenada Bi-Uni.

Por otro lado, si no hay un orden específico en la forma en que los sustratos entran a la reacción o en que se liberan los productos, ésta se puede nombrar como reacción "al azar". Por ejemplo, considérese la reacción:

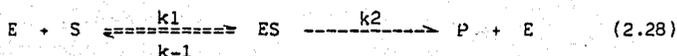


Como se puede observar, hay dos maneras para formar el complejo enzimático E_{AB} , uno en el que A se une con E para dar E_A que reacciona con B para formar el complejo E_{AB} y otro en el que B primero reacciona con E para formar E_B que al interactuar con A también forma E_{AB} , el cual al descomponerse, forma el producto P y libera a la enzima. Según lo mencionado, esta reacción será llamada al azar - Bi-Uni.

Además, los mecanismos pueden ser divididos en dos tipos: secuenciales y ping-pong. Esto es, cuando en un mecanismo todos los sustratos deben interactuar con la enzima antes de que se liberen los productos, son llamados secuenciales y los ping-pong son aquellos en que ocurre una liberación de producto antes de que todos los sustratos se hayan unido a la enzima.

2. Derivación de Ecuaciones de Velocidad.

En el planteamiento de ecuaciones de velocidad para sistemas enzimáticos, se han tomado muchos puntos de partida como base para su obtención, como se vió en el Capítulo II. Uno de éstos, es el método de Michaelis-Menten, que presupone que una parte de la reacción se encuentra en equilibrio termodinámico. Esto es, en la reacción



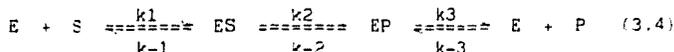
$k_2 \ll k-1$, y el complejo Es se encuentra en equilibrio con S y E.

Pero casi nunca, la suposición de un equilibrio rápido es válida, ya que se requiere que solo la primera parte de la reacción esté en equilibrio, de tal manera que si esto no ocurre, la ecuación de velocidad obtenida por este método carecerá de sentido.

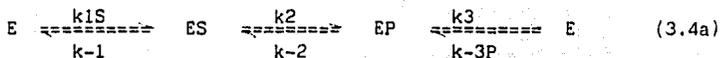
Por otro lado, el método de Briggs y Haldane que da por resultado la ecuación (2.35) y que se basa en la suposición de estado estacionario para el mecanismo (2.28) es muy restrictivo, aún para el caso de un sustrato, ya que el paso de formación del producto es irreversible. Además, cuando el mecanismo que se propone es complejo, el método de estado estable tal como se presenta en el Capítulo II, se complica enormemente.

2.1 Método Sistemático

Se han propuesto muchos métodos para resolver el problema de plantear ecuaciones de velocidad para mecanismos enzimáticos complejos. Uno de éstos, sistemático en su naturaleza se describe a continuación para una reacción termodinámicamente reversible de un solo sustrato. En este caso, la enzima debe promover la reacción en ambas direcciones. Por lo cual, es necesario incluir en el mecanismo explícitamente los complejos enzima-sustrato y enzima-producto, o sea



o bien,



En este mecanismo hay seis pasos de reacción, cada uno representado por una flecha, que conectan las tres especies enzimáticas E, ES y EP. La probabilidad de reacción de cada paso molecular está dado por su constante de velocidad k, y de los pasos bimoleculares por su constante de velocidad multiplicada por la concentración de las especies no enzimáticas, en este caso S y P. De esta forma la velocidad de cambio de cada especie enzimática es igual a la diferencia entre los pasos en que se forma y aquellos en que desaparece. El método de estado estable postula que esta velocidad de cambio es despreciable con respecto a la velocidad de cada paso elemental, por lo que

$$\frac{d(E)}{dt} = - (k1S + k-3P) (E) + k-1(ES) + k3(EP) = 0$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k1S(E) - (k-1 + k2)(ES) + k-2(EP) = 0 \quad (3.5)$$

$$\frac{d(EP)}{dt} = k-3P(E) + k2(ES) - (k-2 + k3)(EP) = 0$$

en general se tendrán n ecuaciones con n incógnitas (una para cada especie enzimática).

Por otro lado el balance de la enzima será igual a

$$(E)_o = (E) + (ES) + (EP) \quad (3.6)$$

o bien,

$$\frac{(E)_o}{(E)_o} = \frac{(E)}{(E)_o} + \frac{(ES)}{(E)_o} + \frac{(EP)}{(E)_o} = 1 \quad (3.6a)$$

Las ecuaciones (3.5) y (3.6) se pueden resolver por el método de los determinantes. Para usar este método, se debe construir un determinante, o bien, cada especie enzimática se coloca en forma de matriz. El determinante, o término de distribución, para E puede ser calculado a partir de los coeficientes anteriores (ec. 3.5), después de eliminar la columna de E. Para un mecanismo con n especies enzimáticas, sólo es necesario conocer n-1 ecuaciones, ya que la otra queda determinada por el balance de la enzima (ec. 3.6). Así, si eliminamos el renglón de d(E)/dt, podremos escribir

$$E = \begin{vmatrix} -(k_1 - 1 + k_2) & k - 2 \\ k_2 & -(k - 2 + k_3) \end{vmatrix}$$

Aplicando la misma técnica para ES y EP, obtenemos

$$ES = \begin{vmatrix} -(k_1 S + k_3 P) & k_3 \\ k - 3P & -(k - 2 + k_3) \end{vmatrix}$$

y

$$EP = \begin{vmatrix} -(k_1 S + k_3 P) & k_1 \\ k_1 S & -(k - 1 + k_2) \end{vmatrix}$$

que resulta de eliminar la columna de ES y el segundo renglón y de eliminar la columna de EP y el tercer renglón respectivamente. El resultado final se obtiene de aplicar el método de Cramer a cada determinante en especial; para el presente ejemplo se tiene que:

$$\begin{aligned} \Delta E &= (k - 1 - k - 2) + (k_2 k - 2) + (k - 1 k_3) + (k_2 k_3) - (k_2 k - 2) \\ &= (k - 1 - k - 2) + (k - 1 k_3) + (k_2 k_3) \\ \Delta ES &= (k_1 S k - 2) + (k_1 S k_3) + (k - 2 k - 3P) + (k_3 k - 3P) - (k_3 k - 3P) \\ &= (k_1 S k - 2) + (k_1 S k_3) + (k - 2 k - 3P) \quad (3.7) \\ \Delta EP &= (k_1 S k - 1) + (k_1 S k_2) + (k - 1 k - 3P) + (k_2 k - 3P) - (k_1 S k - 1) \\ &= (k_1 S k_2) + (k - 1 k - 3P) + (k_2 k - 3P) \end{aligned}$$

Puesto que la concentración relativa de las especies enzimáticas es proporcional a sus determinantes, entonces

$$\begin{aligned} \frac{(E)}{(E)_0} &= \frac{\Delta E}{\Delta E + \Delta ES + \Delta EP} \\ \frac{(ES)}{(E)_0} &= \frac{\Delta ES}{\Delta E + \Delta ES + \Delta EP} \quad (3.8) \\ \frac{(EP)}{(E)_0} &= \frac{\Delta EP}{\Delta E + \Delta ES + \Delta EP} \end{aligned}$$

Las ecuaciones (3.8) son llamadas ecuaciones de Distribución ya que expresan la concentración de cada especie con respecto al total de enzima (E)₀.

La ecuación de velocidad para la ecuación (3.4), en términos de aparición del producto P, es

$$v = \frac{dp}{dt} = (\text{velocidad de aparición de P}) - (\text{velocidad de desaparición de P})$$

$$= k_3(EP) - k_{-3}P(E) \quad (3.9)$$

Despejando de la ecuación (3.8) el resultado obtenido para (E) y (EP), y sustituyendo en la ecuación (3.9), obtenemos

$$v = \frac{k_3 \Delta EP - k_{-3} P \Delta E}{\Delta E + \Delta ES + \Delta EP} (E)_o \quad (3.10)$$

Si sustituimos la expresión para cada uno de los determinantes de las -- ecuaciones (3.7), en la ecuación anterior, obtenemos la expresión final de velocidad.

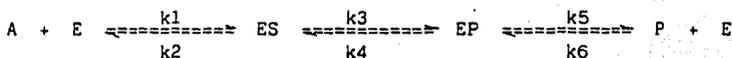
$$v = \frac{((k_1 k_2 k_3 S) - (k_{-1} k_{-2} k_{-3} P) (E)_o)}{(k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3 + k_2 k_3 + k_1 k_{-2} S + k_1 k_3 S + \dots + k_{-2} k_{-3} P + k_1 k_2 S + k_{-1} k_{-3} P + k_2 k_{-3} P)} \quad (3.11)$$

Para mecanismos enzimáticos más complejos, el método es largo, ya que la expresión del determinante genera gran número de términos positivos y negativos iguales, que desaparecen de la expresión final por cancelación, que si no se realiza con cuidado puede conducir a cometer graves errores.

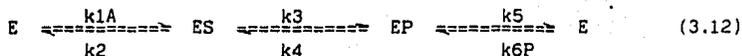
2.2 Método Esquemático de King y Altman.

Afortunadamente, existe un método esquemático para derivar ecuaciones de velocidad. E.L. King y C. Altman desarrollaron un método gráfico que resuelve -- este problema para cualquier mecanismo catalizado por enzimas, independientemente del número de especies enzimáticas intermedias.

La técnica de cálculo se desarrollará con el siguiente mecanismo, (3.4), utilizándolo para demostrar su validez:



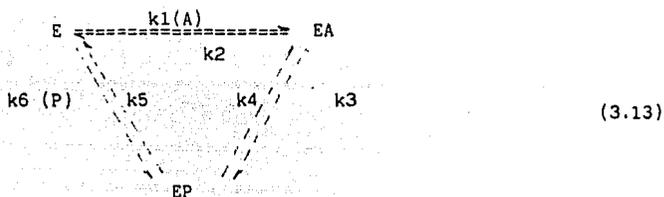
Ya que los sustratos son adicionados en los pasos de formación y los productos son liberados en los pasos contrarios, escribimos el mecanismo como:



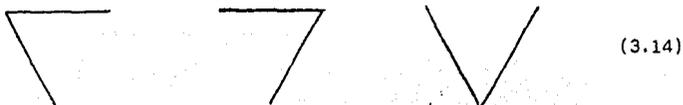
Nótese que la línea o flecha en que se encuentran el sustrato o el producto coinciden con la dirección en que se usan en la reacción. El sustrato A entra en el paso entre E y EA, con una constante de velocidad k1. Igualmente P -- entra para reaccionar con E para formar EP, con una constante de velocidad k6. -- En otras palabras, P es liberado en la reacción inversa. A menos que se especifique otra cosa, esta notación de los mecanismos de reacción será usada de ahora en adelante.

El Método de King-Altman, se resume a:

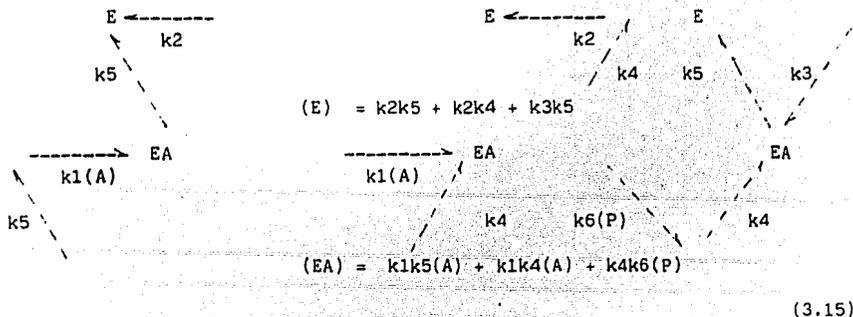
1. Simplificar el mecanismo combinando las especies enzimáticas iguales, - de tal manera que formen una gráfica cerrada o figura geométrica, con las especies enzimáticas como nodos o vértices y los pasos de reacción como líneas que conecten los nodos. Para el ejemplo, la figura que se forma es un triángulo, como

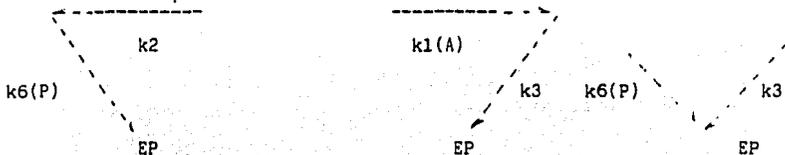


2. Se dibujan todos los caminos con n-1 líneas que conecten todas las especies enzimáticas o vértices de la figura geométrica que se haya formado y -- no contenga un ciclo cerrado. Para el caso en que se haya formado una figura con dos ciclos cerrados los caminos tendrán n-2 líneas, y así sucesivamente, - n es el número de especies enzimáticas. El resultado para el ejemplo es 3 caminos o patrones de King-Altman, como se muestra a continuación, ya que ninguno de estos forman un ciclo y además se conectan las tres especies enzimáticas (E, EA, EP).



3. La concentración de cada especie enzimática será la suma del producto de las constantes de velocidad (y cualquier concentración de especies no enzimáticas) pertenecientes a cada paso de reacción en la dirección de la especie enzimática buscada, de cada uno de los patrones de King-Altman.





$$(EP) = k_2k_6(P) + k_1k_3(A) + k_3k_6(P)$$

En cada uno de estos casos, existe otra combinación de dos líneas, por ejemplo, para el caso de (E), una de las líneas de ese patrón parte de (EA) y otra sale de (EP), con las constantes k_3 y k_4 . Sin embargo, son inaceptables - ya que las líneas forman un ciclo cerrado y además ninguna converge en (E).

Si a cada una de las ecuaciones (1.15) se les divide entre (E)_o, la concentración total de la enzima, se obtienen las ecuaciones de distribución - en la misma forma que las ecuaciones (3.8).

4. Se escribe la expresión de velocidad para la especie enzimática que se desee conocer (p.ej., para la formación del producto).

$$v = \frac{d(P)}{dt} = k_5(EP) - k_6(P)(E) \quad (3.16)$$

5. Se escribe la ecuación de balance de enzima.

$$(E)_o = (E) + (EA) + (EP) \quad (3.17)$$

6. Se divide y multiplica el lado derecho de la ecuación (3.16) por (E)_o:

$$v = \frac{(k_5(EP) - k_6(P)(E))(E)_o}{(E) + (EA) + (EP)} \quad (3.18)$$

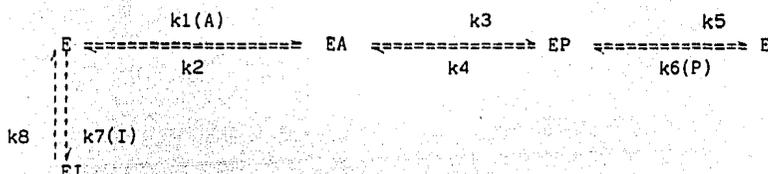
7. Se sustituye la expresión de concentración para cada especie enzimática (ecuaciones 3.15) en la ecuación anterior, para obtener la expresión final que describe la formación del producto:

$$v = \frac{(k_5k_2k_6(P) + k_1k_3k_5(A) + k_3k_5k_6(P) - k_2k_5k_6(P) - k_2k_4k_6(P))}{(E) + (EA) + (EP)} (E)_o$$

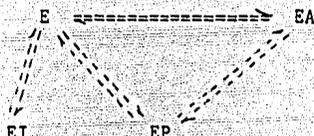
$$v = \frac{(k_1k_3k_5(A) - k_2k_4k_6(P))}{k_2k_5 + k_2k_4 + k_3k_5 + (k_1k_5 + k_1k_4 + k_1k_3)(A) + (k_4k_6 + k_2k_6 + k_3k_6)(P)} (E)_o \quad (3.19)$$

que el mismo resultado que se obtuvo con el método del determinante (mecanismo 3.4 y ecuación 3.11).

En el caso de que uno o varios intermediarios enzimáticos no sean parte del ciclo, no afectará el número de patrones de King-Altman ya que sólo se necesitan considerar los ciclos del mecanismo para plantear los patrones. Por ejemplo, la adición de un inhibidor competitivo, I, al sistema que se trató anteriormente, resultará en el mismo número de patrones, esto es, para el mecanismo:



la forma cíclica se representa como:

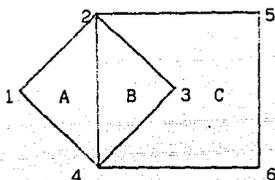


y los patrones o árboles válidos que conectan n-1 especies enzimáticas (4) son:



de donde se puede deducir de la misma forma como se hizo anteriormente la concentración de cada especie.

Como se puede observar del ejemplo anterior, el dibujar los caminos o árboles, como se conocen comúnmente, resultó muy sencillo y fue fácil deducir los patrones que son válidos (paso No. 2 del método). Sin embargo, cuando el mecanismo es complicado o contiene varios ciclos, resulta difícil el conocer -cuantos son los árboles o patrones válidos, por lo que deberá hacerse el cálculo para evitar el olvidar alguno. Para ejemplificar los casos que pueden ocurrir en el cálculo, consideremos el siguiente esquema.



(3.20)

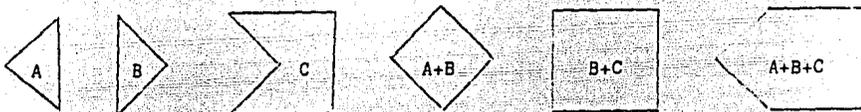
El número total de patrones con n-1 líneas, está dado por:

$$\text{árboles} = \frac{m!}{(n-1)! (m-n+1)!} \quad (3.21)$$

en donde, m= número de líneas en la figura geométrica completa y n= número de especies o vértices en la figura. Por lo que el número de patrones o árboles con n-3 ramas, de la figura con 8 líneas (m) y seis especies (n) es

$$\text{árboles} = \frac{8!}{(6-1)! (8-6+1)!} = \frac{8!}{5! 3!} = 56$$

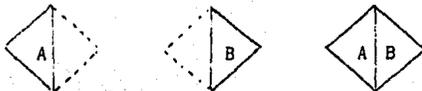
Este número, sin embargo, incluye patrones que contienen los siguientes ciclos, que deben ser restados del total.



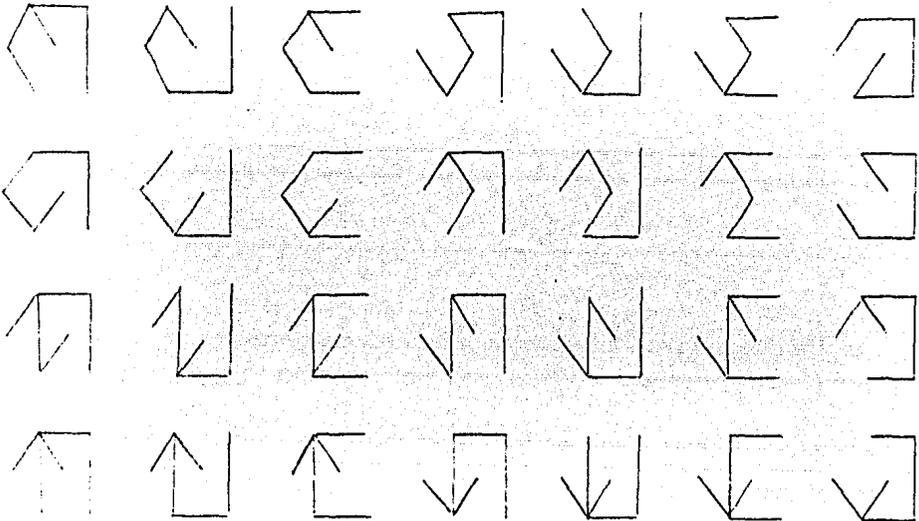
Y el número de patrones para un ciclo con r líneas está dado por

$$\frac{(m-r)!}{(n-1-r)! (m-n+1)!} \quad (3.22)$$

Por lo que, según esta ecuación, para los ciclos A y B, r = 3; se tienen 10 patrones para cada uno; para los ciclos A+B y B+C, r = 4, se tienen cuatro patrones para cada uno; y para los ciclos C y A+B+C, r = 5, tenemos un patrón para cada uno. Con lo que el total de patrones que hay que restar es de 30. Sin embargo, uno de ellos aparece tres veces en los cálculos anteriores, que sólo deberá aparecer una sola vez; esto incluye tanto al ciclo A como al B (que se muestra con línea continua y que representa al ciclo al -- que dan lugar).



Así que el número que hay que restar es 28, y el número total de árboles válidos es: 56 - 28 = 28. Los 28 árboles válidos con 5 líneas son:



Como se puede observar, el método resulta demasiado largo y tedioso. Sin embargo se han desarrollado un conjunto de fórmulas que permiten el cálculo del número de árboles válidos en forma directa. Cada una de estas fórmulas es aplicable a un arreglo geométrico en particular. Para una figura que consista de tres subfiguras como el esquema (3.20), la fórmula para calcular el número exacto de patrones válidos de King-Altman, es:

$$\mathcal{N} = a \cdot b \cdot c - (1_{AB}^2 \cdot c + 1_{BC}^2 \cdot a) \quad (3.23)$$

donde a, b, y c son el número de líneas en las subfiguras A, B, y C; y 1_{AB} y 1_{BC} son el número de líneas en la frontera común entre A y B, y entre B y C, respectivamente. Para el ejemplo anterior: a = 3, b = 3, c = 5, $1_{AB} = 1$, y $1_{BC} = 2$, por lo que:

$$\begin{aligned} \mathcal{N} &= 3 \cdot 3 \cdot 5 - (1^2 \cdot 5 + 2^2 \cdot 3) \\ &= 45 - (5 + 12) \\ &= 28 \end{aligned}$$

Para el caso de dos subfiguras A y B, que comparten una frontera común como se muestra en la siguiente figura

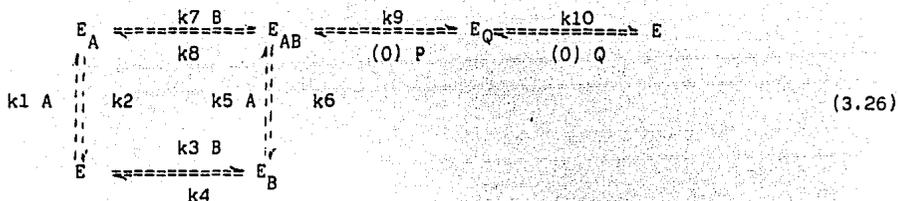


la fórmula para calcular el número de patrones válidos es:

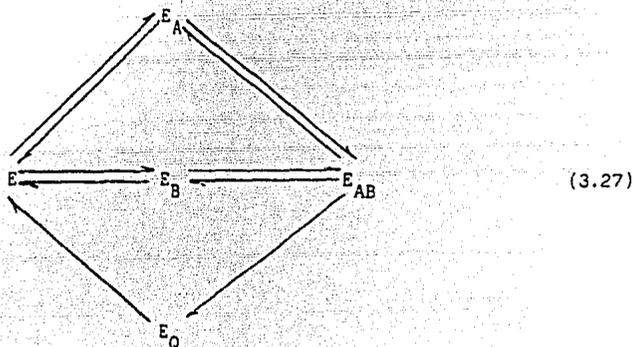
$$\mathcal{N} = a \cdot b - 1_{AB}^2 \quad (3.25)$$

Aunque las ecuaciones anteriores dan el número de patrones válidos -- exactos para un mecanismo enzimático dado, existe el problema de saber cuales son esos patrones y aunque se pueden conocer cubriendo las líneas de la figura para obtener los patrones, el método resulta muy largo y puede conducir a errores. Afortunadamente F. Lam y G. Priest aplicando la teoría de gráficas lineales, propusieron un método para calcular el número y forma de los patrones válidos de King-Altman.

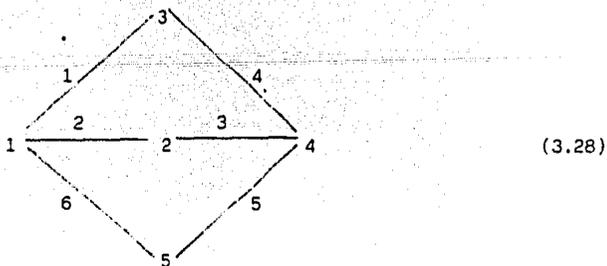
El método se ilustra con la ayuda del siguiente esquema que representa una reacción al azar Bi-ordenada Bi.



Nótese que los pasos de formación de productos son irreversibles (indicados con una constante de velocidad igual a cero). Según el método de King y Altman, el primer paso es conectar las especies iguales para formar la figura geométrica que se muestra a continuación:



y cuya representación como gráfica lineal es:



Las especies enzimáticas se representan por nodos (o vértices) y los pasos de reacción por líneas que los conectan, sin tomar en cuenta que sean o no reversibles (los pasos irreversibles serán obtenidos automáticamente durante el desarrollo). Cada nodo se denota por un número y el número de línea que conecta a los nodos (o ramas) de la gráfica, es el número de paso de reacción. No es necesario que se inicie la numeración de nodos con el número (1) y que estos sean secuenciales, tal y como se presenta en (3.28). De hecho se pueden usar cualquier clase de símbolos, pero con el fin de evitar confusiones, se usarán los números tal como se escribieron para presentar el método.

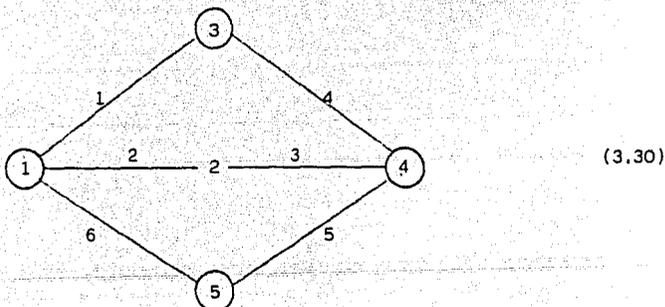
Según el sistema, los patrones válidos de King-Altman para una reacción enzimática, son los árboles de una gráfica lineal. Un árbol es una subgráfica que contiene todos los vértices de la gráfica (3.28), interconectados entre sí, pero que no contiene ningún ciclo cerrado. El método se fundamenta en el algebra de J.T. Wang, que establece que la suma o producto de dos o más contantes - (o símbolos) idénticos es igual a cero, esto es:

$$\sum_{i=1}^n C = 0, \text{ para } n \geq 1 \tag{3.29}$$

$$\prod_{i=1}^n C = 0, \text{ para } n \geq 1$$

El procedimiento, paso a paso, para generar los patrones de King-Altman para el mecanismo (3.26), según este método, es:

1. Representar el mecanismo como una gráfica lineal con cada nodo y cada rama numerados secuencialmente, pero en forma separada (3.28).
2. Dibujar círculos en n-1 nodos, donde n es el número total de nodos, El resultado será independiente del nodo que ha sido ignorado. Para el ejemplo:



3. Para cada nodo marcado, enlistar las ramas que cortan el círculo.

Para el nodo	1: (1,2,6)	
	3: (1,4)	
	4: (3,4,5)	
	5: (5,6)	(3.31)

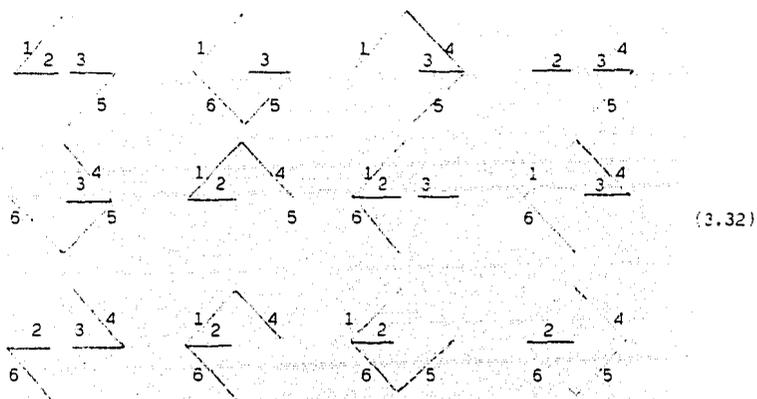
4. Usando los principios del algebra de Wang, se multiplican alfanuméricamente las listas obtenidas en el paso anterior. La multiplicación alfanumérica de 2 y 4 es igual a 24 y no 8. Es importante aplicar el álgebra de Wang en todo el proceso de multiplicación. Por ejemplo, el resultado de multiplicar - - (C1,C2)*(C1,C2,C3) es: C1C1 + C1C2 + C1C3 + C2C1 + C2C2 + C2C3. Los términos C1C1 y C2C2 se descartan por el principio de multiplicación del álgebra de Wang. Para nuestro caso, el resultado de multiplicar entre sí a las ramas que cortan los nodos es:

$$\begin{aligned}
 (1,2,6) \cdot (1,4) &= (11,12,16,14,24,46) \\
 (12,16,14,24,46) \cdot (3,4,5) &= (123,136,134,234,346,124,146,144,244,446,125,156,- \\
 &\quad 145,245,456) \\
 (123,136,134,234,346,124,146,125,156,145,245,456) \cdot (5,6) &= \\
 = (1235,1356,1345,2345,3456,1245,1456,1255,1556,1455,2455,4556,1236,1366,1346, \\
 &\quad 2346,3466,1246,1466,1256,1566,1456,2456,4566)
 \end{aligned}$$

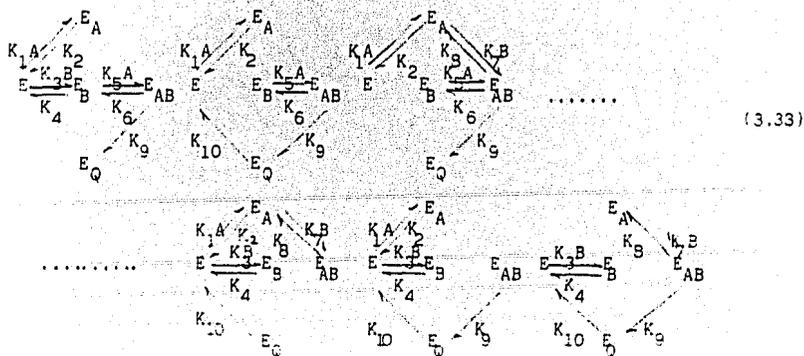
Los términos que resultan, constituyen los árboles de la gráfica y son:

$$\begin{array}{cccccc}
 1235 & 1356 & 1345 & 2345 & 3456 & 1245 \\
 1236 & 1346 & 2346 & 1246 & 1256 & 2456
 \end{array}$$

Como se puede observar, este procedimiento no requirió referirse a ningún árbol en especial. Para demostrar la validez del resultado, se dibujan los doce términos obtenidos de donde se puede ver que todos ellos son patrones válidos.



A los patrones resultantes (3.32), se les anexa toda la información que correspondiera a cada línea que los forma, tomando como base la figura geométrica original (3.27), con el fin de conocer la concentración de las especies enzimáticas que nos interesan para obtener la ecuación de velocidad del mecanismo propuesto.



La concentración de cada especie enzimática estará determinada por la suma del producto de constantes de velocidad y concentración de especies no enzimáticas (si existen), de las líneas que se dirijan a la especie enzimática buscada, por ejemplo, para la especie E del mecanismo (3.26), o nodo 1 de (3.28), la concentración contribuyente debida al patrón 1356 de (3.32) será $k_2k_{10}k_9k_5$ (A). Sin embargo, para aquellos patrones que no tienen un paso de reacción -- (Segmentos irreversibles), en la dirección de la especie enzimática de interés, la contribución es cero, p. ej., el patrón 1235 no contribuye a la concentración de E, porque el paso de reacción 5 es irreversible hacia E y no existe una línea que se dirija hacia E. El proceso anterior se repite con cada uno de los patrones para determinar la concentración total de la especie enzimática -- buscada.

El resultado para cada una de las especies enzimáticas del mecanismo -- (3.26) es:

$$\begin{aligned} (E) &= k_2k_5(A)k_9k_{10} + k_5(A)k_7(B)k_9k_{10} + K_2k_4k_6k_{10} + k_2k_5(A)k_8k_{10} + \\ &= k_2k_4k_6k_{10} + k_2k_4k_9k_{10} + (k_2k_5k_9k_{10} + k_2k_5k_8k_{10}) (A) + \\ &= (k_4k_6k_7k_{10} + k_4k_7k_9k_{10}) (B) + k_5k_7k_9k_{10} (A) (B) \end{aligned} \quad (3.34a)$$

$$\begin{aligned} (E_A) &= k_1(A)k_5(A)k_9k_{10} + k_1(A)k_5(A)k_8k_{10} + k_1(A)k_4k_6k_{10} + \\ &= (k_1k_4k_6k_{10} + k_1k_4k_8k_{10} + k_1k_4k_9k_{10}) (A) + (k_1k_5k_9k_{10} + \\ &= k_1k_5k_8k_{10}) (A) + k_3k_5k_8k_{10} (A) (B) \end{aligned} \quad (3.34b)$$

$$\begin{aligned} (E_B) &= k_2k_3(B)k_6k_{10} + k_1(A)k_6k_7(B)k_{10} + k_3(B)k_6k_7(B)k_{10} + \\ &= k_2k_3(B)k_8k_{10} + k_2k_3(B)k_9k_{10} + k_3(B)k_7(B)k_9k_{10} \\ &= (k_2k_3k_6k_{10} + k_2k_3k_8k_{10} + k_2k_3k_9k_{10}) (B) + (k_3k_6k_7k_{10} + \\ &= k_3k_7k_9k_{10}) (B) + k_1k_6k_7k_{10}(A) (B) \end{aligned} \quad (3.34c)$$

$$\begin{aligned} (E_{AB}) &= k_3(B)k_5(A)k_{10}k_2 + k_1(A)k_5(A)k_7(B)k_{10} + k_3(B)k_5(A)k_7(B)k_{10} + \\ &= (k_2k_3k_5k_{10} + k_1k_4k_7k_{10}) (A) (B) + k_1k_5k_7k_{10}(A) (B) + \\ &= K_3k_5k_7k_{10}(A) (B) \end{aligned} \quad (3.34d)$$

$$\begin{aligned} (E_Q) &= k_2k_3(B)k_5(A)k_9 + k_1(A)k_5(A)k_7(B)k_9 + k_3(B)k_5(A)k_7(B)k_9 + \\ &= (k_2k_3k_5k_9 + k_1k_4k_7k_9) (A) (B) + k_1k_5k_7k_9(A) (B) \\ &= k_3k_5k_7k_9(A) (B) \end{aligned} \quad (3.34e)$$

Si la expresión de velocidad la planteamos en función de la formación del producto P, obtenemos

$$-\frac{dp}{dt} = v = k_9 (E_{AB}) \quad (3.35)$$

Por otro lado la expresión de conservación de la enzima es:

$$(E)_o = (E) + (E_A) + (E_B) + (E_{AB}) + (E_Q) \quad (3.36)$$

Si multiplicamos y dividimos la expresión de velocidad por $(E)_o$, tenemos

$$v = \frac{k_9 (E_{AB}) (E)_o}{(E) + (E_A) + (E_B) + (E_{AB}) + (E_Q)} \quad (3.37)$$

Sustituyendo la expresión de (E_{AB}) obtenida anteriormente en la ecuación anterior y reacomodando términos, obtenemos la expresión final para el mecanismo (3.26), que expresa la formación de P como una función del tiempo.

$$v = \frac{dP}{dt} = \frac{k_9(E)_o (k_{11}(A)(B) + k_{12}(A)^2(B) + k_{13}(A)(B)^2)}{(E) + (E_A) + (E_B) + (E_{AB}) + (E_Q)} \quad (3.38)$$

en donde:

- k11 = k2k3k5k10 + k1k4k7k10
- k12 = k1k5k7k10
- k13 = k3k5k7k10

En el Apéndice I, se presenta un programa de computadora para obtener los patrones válidos según el método que se describió anteriormente. El programa sólo da las líneas o ramas que forman los patrones o árboles de King-Altman. El resultado de este programa para el mecanismo (3.26) se presenta en la Fig. 3.1.

HAY 12 ARBOLES PARA ESTA GRAFICA

ESTOS ARBOLES SON LISTADOS A CONTINUACION

LAS RAMAS QUE LO FORMAN SON:

ARBOL	1	QUE TIENE LAS RAMAS	3	4	5	6
ARBOL	2	QUE TIENE LAS RAMAS	1	3	5	6
ARBOL	3	QUE TIENE LAS RAMAS	1	3	4	6
ARBOL	4	QUE TIENE LAS RAMAS	2	4	5	6
ARBOL	5	QUE TIENE LAS RAMAS	2	3	4	6
ARBOL	6	QUE TIENE LAS RAMAS	1	2	5	6
ARBOL	7	QUE TIENE LAS RAMAS	1	2	4	6
ARBOL	8	QUE TIENE LAS RAMAS	1	2	3	6
ARBOL	9	QUE TIENE LAS RAMAS	2	3	4	5
ARBOL	10	QUE TIENE LAS RAMAS	1	2	3	5
ARBOL	11	QUE TIENE LAS RAMAS	1	3	4	5
ARBOL	12	QUE TIENE LAS RAMAS	1	2	4	5

Fig. 3.1 Patrones válidos de King-Altman para el mecanismo (3.26), resultantes del programa del Apéndice I.

2.2.1 Comprobación del número de patrones válidos.

El problema de saber si el número de patrones obtenidos por el método algebraico descrito anteriormente es el correcto, se puede solucionar calculando este valor por otro método. Esta alternativa se describe a continuación.

Primero se forma una matriz de corte A, a partir de la representación gráfica dirigida del mecanismo propuesto. Una gráfica dirigida es aquella que tiene una dirección asignada arbitrariamente en cada rama. La asignación del sentido también es arbitraria, siendo necesario otorgar la dirección para obtener la matriz apropiada.

Los elementos de la matriz de corte, A se definen como:

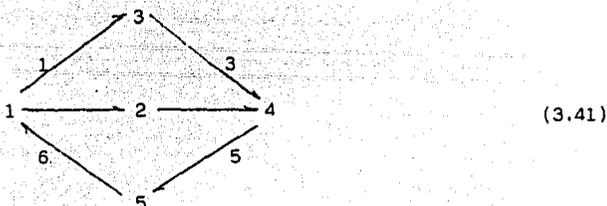
$$\begin{aligned}
 a_{ij} &= 1, \text{ si la rama } j \text{ entra al nodo } i \\
 a_{ij} &= -1, \text{ si la rama } j \text{ abandona el nodo } i \\
 a_{ij} &= 0, \text{ para cualquier otro caso}
 \end{aligned}
 \tag{3.39}$$

donde: $i = 1, 2, 3, \dots, n-1$ nodos
 $j = 1, 2, 3, \dots, m$ ramas de la gráfica

Para un mecanismo enzimático que tenga n especies enzimáticas y m pasos de reacción, la matriz de corte A, tiene $n-1$ renglones y n columnas. El número de patrones válidos se obtiene de resolver el determinante que resulta de multiplicar la matriz de corte A, por su transpuesta A' , por lo que:

$$\text{Número de patrones válidos} = A \cdot A' \tag{3.40}$$

Para el mecanismo (3.26), la gráfica dirigida será



y la matriz de corte correspondiente será, ignorando el nodo 3:

número de nodo		número de rama					
		1	2	3	4	5	6
1		-1	-1	0	0	0	1
2		0	1	0	-1	0	0
4		0	0	1	1	-1	0
5		0	0	0	0	1	-1

y su transpuesta es

$$A' = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

de donde $A \cdot A'$ será:

$$A \cdot A' = \begin{pmatrix} -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & -1 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 3 & -1 & 0 & -1 \\ -1 & 2 & -1 & 0 \\ 0 & -1 & 3 & -1 \\ -1 & 0 & -1 & 2 \end{pmatrix}$$

que puede ser resuelta, por ejemplo, por medio de la regla de los menores para -
determinantes, para obtener el número de patrones válidos. Realizando el proce-
dimiento el resultado es:

$$\begin{aligned}
 & 3 \begin{vmatrix} 2 & -1 & 0 \\ -1 & 3 & -1 \\ 0 & -1 & 2 \end{vmatrix} - (-1) \begin{vmatrix} -1 & -1 & 0 \\ 0 & 3 & -1 \\ -1 & -1 & 2 \end{vmatrix} - (-1) \begin{vmatrix} -1 & 2 & -1 \\ 0 & -1 & 3 \\ -1 & 0 & -1 \end{vmatrix} = 3 \left\{ \begin{vmatrix} 3 & -1 \\ 2 & -1 \end{vmatrix} \right. \\
 & (-1) \begin{vmatrix} -1 & -1 \\ 0 & 2 \end{vmatrix} \left. \right\} - \left\{ -1 \begin{vmatrix} 3 & -1 \\ -1 & 2 \end{vmatrix} - (-1) \begin{vmatrix} 0 & -1 \\ -1 & 2 \end{vmatrix} \right\} + \\
 & \left\{ -1 \begin{vmatrix} -1 & 3 \\ 0 & -1 \end{vmatrix} + (-1) \begin{vmatrix} 2 & -1 \\ -1 & 3 \end{vmatrix} \right\} \\
 & = 3(2(6-1) + (-2)) - ((-6-1) + (-1)) + ((-1)(1) - 1(6-1)) = 24 - 6 - 6 = 12
 \end{aligned}$$

Este resultado corrobora el obtenido por medio del método algebraico visto en la sección anterior. En el Apéndice II, se presenta un programa para la solución de este problema. El programa está escrito en lenguaje FORTRAN. En la figura 3.2, se muestran los resultados de este programa, junto con los datos que se alimentaron.

DATOS DESCRIPTIVOS DEL MECANISMO

NUMERO DE RAMAS = 6

NUMERO DE NODOS-1 = 4

- RAMA# 1: NODO DE ORIGEN= 1, NODO DE ARRIBO= 3
- RAMA# 2: NODO DE ORIGEN= 1, NODO DE ARRIBO= 2
- RAMA# 3: NODO DE ORIGEN= 2, NODO DE ARRIBO= 4
- RAMA# 4: NODO DE ORIGEN= 3, NODO DE ARRIBO= 4
- RAMA# 5: NODO DE ORIGEN= 4, NODO DE ARRIBO= 5
- RAMA# 6: NODO DE ORIGEN= 5, NODO DE ARRIBO= 1

NUMERO DE PATRONES = 12.

Fig. 3.2. Resultados del programa del Apéndice II.

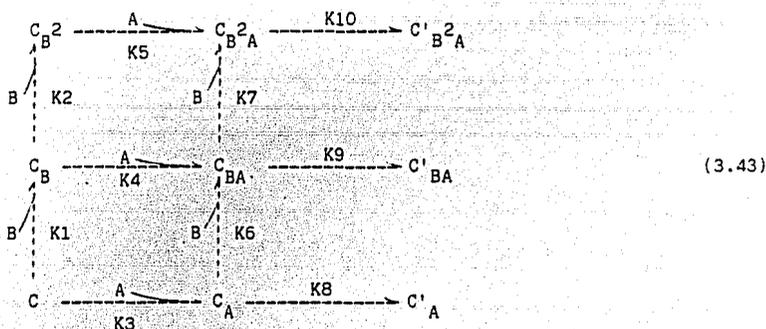
3. Ecuaciones de restricción

Según hemos descrito, el objetivo principal de los estudios cinéticos es el de elucidar el mecanismo de reacción, incluyendo la estimación de las constantes de velocidad del modelo propuesto y comprobar además la exactitud de los valores generados, con referencia a valores obtenidos experimentalmente. Sin embargo, para que estas constantes puedan ser estimadas, es necesario cumplir con ciertas restricciones que son debidas al principio del balance detallado (también conocido como la ley de microrreversibilidad) que estipula que "el producto de las constantes de velocidad en una dirección de la reacción, debe ser ---

igual al producto de las constantes de velocidad en la dirección opuesta cuando la reacción es cíclica". Con modelos enzimáticos simples, como los ping-pong o mecanismos secuenciales, el principio anterior puede ser ignorado, ya que estos no contienen ciclos; pero con mecanismos del tipo "unión al azar", puede existir uno o varios ciclos y en consecuencia el principio del balance detallado no debe ser ignorado, por lo que las constantes de velocidad deben satisfacer ciertas relaciones matemáticas que están determinadas por el método en sí.

Adicionalmente a lo antes expuesto, se ha demostrado también que para cualquier reacción química, el producto de las constantes de equilibrio en un ciclo es igual a uno, por lo que este tipo de ecuaciones, llamadas de restricción, limitan severamente el valor de las constantes de velocidad, así como de las constantes de equilibrio y de las llamadas constantes cinéticas.

La derivación de las ecuaciones de restricción se demostrará con el siguiente modelo de transporte.



En el que C es un transportador en la membrana de la célula y A y B son sustratos que serán introducidos al interior de la célula a través de la membrana por C. Si consideramos que los pasos de transformación en la membrana son los pasos limitantes de velocidad, los pasos de reacción fuera de la membrana están en equilibrio.

A partir de la definición de las constantes de disociación podemos definir las siguientes relaciones

$$K1 = \frac{(B)(C)}{(C_B)} \quad \delta \quad (C_B) = \frac{(B)(C)}{K1} \quad (3.44)$$

$$K2 = \frac{(B)(C_B)}{(C_B^2)} \quad \delta \quad (C_B^2) = \frac{(B)(C_B)}{K2} \quad (3.45)$$

que con el valor de C_B de (3.44), se convierte en

$$(C_B^2) = \frac{(B)(B)(C)}{K1 K2} \quad (3.46)$$

$$K3 = \frac{(A) (C)}{(C_A)} \quad \text{ó,} \quad (C_A) = \frac{(A) (C)}{K3} \quad (3.47)$$

$$K4 = \frac{(A) (C_B)}{(C_{BA})} \quad \text{o bien,} \quad (C_{BA}) = \frac{(A) (C_B)}{K4} \quad (3.48)$$

que sustituyendo el valor de C_B de (3.44), obtenemos

$$(C_{BA}) = \frac{(A) (B) (C)}{K1 K4} \quad (3.49)$$

$$K5 = \frac{(A) (C_{B^2})}{(C_{B^2}^A)} \quad \text{ó,} \quad (C_{B^2}^A) = \frac{(A) (C_{B^2})}{K5} \quad (3.50)$$

Si sustituimos (3.46) en la ecuación anterior tendremos

$$(C_{B^2}^A) = \frac{(A) (B) (B) (C)}{K1 K2 K5} \quad (3.51)$$

$$K6 = \frac{(B) (C_A)}{(C_{BA})} \quad \text{ó,} \quad (C_{BA}) = \frac{(B) (C_A)}{K6} \quad (3.52)$$

que después de sustituir el valor de C_A de (3.47), obtenemos

$$(C_{BA}) = \frac{(A) (B) (C)}{K3 K6} \quad (3.53)$$

$$K7 = \frac{(B) (C_{BA})}{(C_{B^2}^A)} \quad \text{ó,} \quad (C_{B^2}^A) = \frac{(B) (C_{BA})}{K7} \quad (3.54)$$

Si usamos el valor de (3.49) que se obtuvo de C_{BA} , obtendremos

$$(C_{B^2}^A) = \frac{(A) (B) (B) (C)}{K1 K4 K7} \quad (3.55)$$

Como se puede observar, las ecuaciones (3.49) y (3.53) son dos expresiones diferentes que describen la concentración del mismo complejo C_{BA} . Igualando ambas expresiones y simplificando, se obtiene lo que se conoce como ecuación de restricción, o:

$$K1 K4 = K3 K6 \quad (3.56)$$

Si nos referimos al mecanismo (3.43), se podrá observar que los pasos que contienen las constantes $K1$, $K4$, $K3$ y $K6$, forman un ciclo cerrado (1-4-6-3).

Lo mismo sucede con las ecuaciones (3.51) y (3.55), por lo que procediendo de igual manera, obtendremos la segunda ecuación de restricción del sistema:

$$K2 K5 = K4 K7 \quad (3.57)$$

que en el mecanismo (3.43), también forma un ciclo cerrado (2-5-7-4). Además se puede observar que si eliminamos el paso con la constante K4, se obtiene el ciclo (1-2-5-7-6-3), por lo que una tercera ecuación de restricción se puede obtener de combinar las dos anteriores ecuaciones de restricción, (3.56) y (3.57) lo que resultará en

$$K1 K2 K5 = K3 K6 K7 \tag{3.58}$$

Estas tres ecuaciones de restricción (3.56, 3.57 y 3.58), corresponden a los tres ciclos que contiene el mecanismo (3.43). Con este ejemplo se demuestra la existencia de las ecuaciones de restricción en un mecanismo con ciclos cerrados que sean reversibles, haciendo mención que a cada ciclo corresponde una ecuación de restricción. Sin embargo, se deberá tener cuidado para reconocer los ciclos reales de aquellos que no lo son, p. ej., aquellos en los que se unen especies enzimáticas iguales son ilegítimos, en lo que se refiere a la obtención de estas ecuaciones, como es el caso de las gráficas que se plantearon, para conocer las ramas de los patrones de King-Altman, usando el álgebra de Wang, ecuación (3.27), en el que se unen especies enzimáticas semejantes para aplicar el método, pero que de ninguna manera son una representación del modelo que se plantea.

Para un mecanismo dado, puede haber más de un ciclo, por lo que habrá más de una ecuación de restricción y en algunos casos será difícil identificar todos los ciclos de un mecanismo por la simple inspección del mismo; además, en otros casos, el número de ciclos y por ende el de ecuaciones de restricción, podría ser mayor al número de parámetros a estimar, p. ej., de constantes de velocidad o cinéticas, lo que resultaría en un problema de sobrespecificación que no tendría solución, sin mencionar el de la estimación misma de los parámetros. Afortunadamente, de todos los ciclos solamente algunos son independientes, por ejemplo, del mecanismo (3.43), la ecuación (3.56) puede ser obtenida al dividir la ecuación (3.58) entre la (3.57). Cuando los ciclos independientes se encuentran y son satisfechos, los dependientes son satisfechos automáticamente, por lo que sólo es necesario obtener los primeros.

Para explicar la generación de ciclos independientes, usaremos el mecanismo de la figura 3.3 y su representación gráfica de la figura 3.4, que se muestran a continuación.

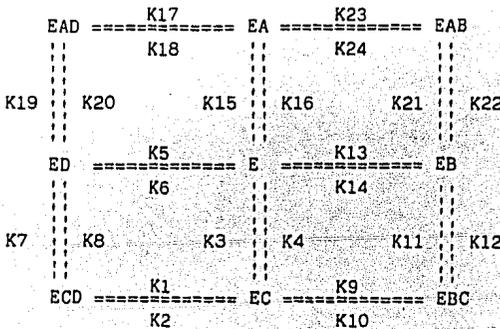


Fig. 3.3 Mecanismo para ejemplificar la generación de ciclos independientes en mecanismos enzimáticos

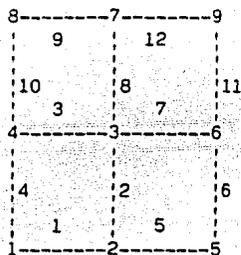


Fig. 3.4. Gráfica lineal que representa el mecanismo de la figura 3.3.

Primero se escribe una matriz de interconexión para $n-1$ nodos de la figura 3.4, donde n es el número total de nodos de la gráfica. Las columnas de C se forman usando los números de las ramas y los renglones, el número de nodo. Los elementos de C serán entonces

$$C_{ij} = 1, \text{ la rama que conecte al nodo } i = 1, 2, 3, \dots, n-1$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, m$$

$$= 0, \text{ para los otros casos}$$

y donde m es el número de ramas. Para el ejemplo, la matriz C de interconexión quedará de la siguiente manera:

número de nodo	número de rama											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
4	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
7	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

En esta matriz C , se elimino el nodo número 8.

El siguiente paso es el de arreglar las columnas de C , en dos submatrices de tal manera que la primera de ellas tenga columnas que correspondan a un árbol de la gráfica (3.4). En este caso un árbol se define como aquel que conecte todos los nodos y no contenga ciclos cerrados. Por lo que, según lo anterior, será un patrón de King-Altman. Uno de estos patrones es el que se muestra en la figura 3.5, que consiste de las ramas 1,2,3,5,6,8,10 y 11.

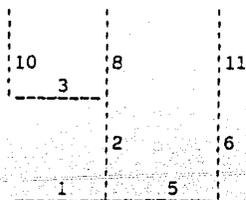


Fig. 3.5. Patrón de King-Altman de la figura 3.4, en el que todos los nodos están interconectados y no se forma un ciclo cerrado.

Por lo que la matriz reacomodada es

$$C^* = \begin{array}{c|cccccccc|cccc} & \text{ramas del patrón 3.6} & & & & & & & & \text{ramas restantes} & & & & & & & & \\ & 1 & 2 & 3 & 5 & 6 & 8 & 10 & 11 & 4 & 7 & 9 & 12 & & & & & \\ \hline 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\ 2 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\ 3 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & & & & & \\ 4 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\ 5 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & & & & & \\ 6 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & & & & & \\ 7 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & & & & & \\ 9 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & & & & & \end{array}$$

que podemos definir como:

$$C^* = (C_{11} | C_{12}) \tag{3.59}$$

Se puede demostrar que C_{11} es no singular y que los ciclos independientes pueden ser obtenidos de:

$$C_I = ((C_{11}^{-1} \cdot C_{12})' | U) \tag{3.60}$$

Donde U es la matriz unitaria de tamaño $m-n+1$.

Dado que la matriz que se formó está en base 2 (o binario), es necesario seguir ciertas reglas para llevar a cabo las operaciones para obtener C_I .

1) La inversa de una matriz en base 2 es igual al valor absoluto de la inversa ordinaria de la matriz. Por ejemplo, dado A , la inversa en base 2 será:

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ entonces, } A^{-1} = \begin{bmatrix} 1 & -1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ en base 2, } A^{-1} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$$

2) Las operaciones aritméticas entra dos matrices en base 2, siguen las siguientes reglas:

- a) $1 \times 1 = 1$
- b) $1 \times 0 = 0$
- c) $1 + 1 = 0$
- d) $1 + 0 = 1$

Por otro lado, para el mecanismo propuesto, existen cuatro ciclos independientes ($m - n + 1 = 12 - 9 + 1 = 4$), de donde U , la matriz unitaria, es de orden 4, y el valor de C_I será:

$$C_I = \left[\begin{array}{c} \left[\begin{array}{cccccccc} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right] \cdot \left[\begin{array}{cccc} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right] \cdot \left[\begin{array}{c} | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \\ | \end{array} \right] U \end{array} \right]$$

$$C_I = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \left[\begin{array}{l} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{array} \right]$$

$$((C_{11})^{-1} \cdot (C_{12})) \quad (U)$$

$$C_I = \begin{bmatrix} 1 & 2 & 3 & 5 & 6 & 8 & 10 & 11 & 4 & 7 & 9 & 12 \\ 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Cada renglón de C_I representa un ciclo independiente que consiste de aquellas ramas que tengan un "valor de 1" en la columna j . Estas ramas, abandonan un nodo en particular, A, y entran a otro nodo, B. Otra rama presente en el vector, debe abandonar el nodo B y entrar a otro nodo. El ciclo es completado cuando la última rama entra al nodo A. Las ramas no necesariamente se conectan en el orden en que aparecen en el vector, su conexión depende de los nodos que abandonan y conectan, lo cual puede visualizarse refiriéndose a los datos de la gráfica del mecanismo (para este ejemplo ver la figura 3.4). Así, los cuatro ciclos independientes de la figura 3.3, son:

- (1, 2, 3, 4)
- (2, 5, 6, 7)
- (3, 8, 9, 10)
- (2, 5, 6, 8, 11, 12)

aunque deberá notarse que existen más de un conjunto de ciclos independientes, p. ej., (1,2,3,4), (3,8,9,10), (2,5,6,7) y (7,8,11,12), es otro conjunto posible. Sin embargo, no todos los conjuntos de cuatro ciclos son independientes. Y ya que hay doce ciclos (figura (3.6)), para la gráfica de la figura 3.4, habrá un total de 495 maneras de escoger cuatro ciclos o sea:

$$C_4^{12} = 495$$

pero sólo 288 de ellos son independientes. Esto se debe a que existen 288 patrones de King-Altman para esta gráfica y cada conjunto de ciclos independientes -- corresponde a uno de estos patrones. Por fortuna sólo es necesario un conjunto de ciclos fundamentales para un estudio cinético.

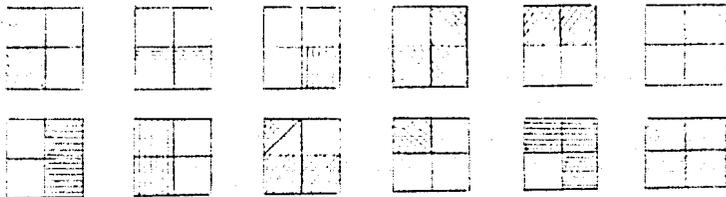


Fig. 3.6 Ciclos posibles de la figura 3.4.

La generación de las ecuaciones de restricción a partir de los ciclos fundamentales y en general de todos los ciclos presentes en el sistema, se basa en el hecho de que a cada rama se asocian dos constantes de velocidad, una para cada una de las direcciones de la reacción. Para cada rama, por lo tanto, se establece una relación de la constante de velocidad en un sentido, entre la constante en el sentido contrario. El producto de las relaciones de todas las ramas del ciclo forman la ecuación de restricción. Para el ejemplo anterior, el ciclo (1-2-3-4) formará la ecuación de restricción

$$\frac{K_1 K_3 K_5 K_7}{K_2 K_4 K_6 K_8} = 1$$

haciendo notar que las constantes de velocidad en el numerador se dirigen en un sentido del ciclo y las del denominador se encuentran en sentido contrario en el mismo ciclo.

Después de que las ecuaciones de restricción resultantes de los ciclos fundamentales han sido planteadas, los otros ciclos pueden ser identificados y las ecuaciones de restricción correspondientes son generadas, comprobando que se han violado las reglas de formación por medio de los valores de las constantes de velocidad de los ciclos fundamentales. El conjunto de ecuaciones de restricción derivadas de los ciclos fundamentales es usado para restringir los valores de las constantes de velocidad y el conjunto de ecuaciones derivadas de todos los ciclos se usa para comprobar, al final del proceso de estimación, el valor de las constantes de velocidad para saber si cumplen con el principio del balance detallado.

4. Combinación de las ecuaciones de velocidad y de restricción.

En el ajuste de un modelo de ecuación de velocidad a los datos experimentales, generalmente se usa el procedimiento de mínimos cuadrados, que sería por ejemplo, la suma de las diferencias al cuadrado entre la velocidad calculada y la de los datos experimentales, que matemáticamente se expresaría como:

$$\text{Mínimo de } R = \sum_{i=1}^n (\text{cal}_i - \text{obs}_i)^2$$

donde n sería igual al número de puntos o datos de que se disponga. Cuando se tiene que satisfacer la igualdad de las ecuaciones de restricción y al mismo tiempo minimizar el residuo R, que se expresa en la ecuación anterior, se pueden usar los multiplicadores de Lagrange o alguna de las técnicas de optimización con restricción. Sin embargo, el uso del método de Lagrange aumenta el número de parámetros a ajustar por el número de restricciones. Para un mecanismo complejo, habría muchos ciclos fundamentales, lo que incrementaría el número de constantes de velocidad que sería necesario estimar, además de que sería necesaria la diferenciación analítica. Por otro lado, la optimización con restricción resulta mucho más difícil que la que no contiene restricciones, aunque cuando existen igualdades en las restricciones, el problema de optimización con restricción puede ser convertido en uno sin restricciones, por medio de la sustitución analítica. Usando las igualdades en las restricciones, algunos parámetros pueden ser resueltos en términos de otros y ser sustituidos en la función objetivo; pero, debido a la interrelación de las constantes de velocidad en los ciclos fundamentales, algunas de ellas aparecerán en más de una de las ecuaciones de restricción, por lo que surge la pregunta: ¿Cuál será la constante de velocidad que se deberá usar como independiente para hacer la estimación de las restantes?

Por ejemplo, una ecuación de restricción puede alterar una constante de velocidad que fue usada para evaluar otra constante de velocidad, por lo que es necesario un proceso iterativo que garantice que los nuevos valores estimados sean estables para todas las ecuaciones de restricción. A continuación se presentan cuatro ecuaciones de restricción del mecanismo de la figura 3.3.

$$\frac{K1}{K2} \frac{K3}{K4} \frac{K6}{K5} \frac{K8}{K7} = 1$$

$$\frac{K3}{K4} \frac{K10}{K9} \frac{K12}{K11} \frac{K13}{K14} = 1$$

$$\frac{K4}{K3} \frac{K9}{K10} \frac{K11}{K12} \frac{K16}{K15} \frac{K21}{K22} \frac{K24}{K23} = 1$$

$$\frac{K6}{K5} \frac{K16}{K15} \frac{K17}{K18} \frac{K19}{K20} = 1$$

Estas ecuaciones pueden ser rearrregladas de la siguiente forma:

$$K4 = K3 \frac{K1}{K2} \frac{K8}{K7} \frac{K6}{K5}$$

$$K11 = K12 \frac{K13}{K14} \frac{K3}{K4} \frac{K10}{K9}$$

$$K15 = K16 \frac{K21}{K22} \frac{K11}{K12} \frac{K9}{K10} \frac{K4}{K3} \frac{K24}{K23}$$

$$K5 = K6 \frac{K17}{K18} \frac{K19}{K20} \frac{K16}{K15}$$

La constante K5 de la última de estas ecuaciones podría no satisfacer a la primera de ellas. Pero, si cada ecuación de restricción es escrita en términos de una constante de velocidad que no aparezca en ninguna de las otras, p. ej., aquellas constantes que son únicas en las ecuaciones de restricción, entonces el proceso iterativo no se requiere. Afortunadamente, para cada ciclo fundamental existe una rama que no aparece en ninguno de los otros, lo que ocurre debido a la matriz unitaria de C_t . Entonces, arreglando de tal manera que:

$$K2 = K1 \frac{K8}{K7} \frac{K6}{K5} \frac{K3}{K4}$$

$$K14 = K13 \frac{K13}{K4} \frac{K10}{K9} \frac{K14}{K13}$$

$$K22 = K21 \frac{K11}{K12} \frac{K9}{K10} \frac{K4}{K3} \frac{K16}{K15} \frac{K24}{K23}$$

$$K18 = K17 \frac{K19}{K20} \frac{K6}{K5} \frac{K16}{K9}$$

los valores de K_2 , K_{14} , K_{22} y K_{18} , siempre satisfacen las ecuaciones de restricción, ya que estas cuatro constantes aparecen y se relacionan a las ramas 1, 7, 9 y 11 del árbol 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, de la figura (3.4). - Nótese que si las ecuaciones de velocidad fueran expresadas en términos de constantes cinéticas y las ecuaciones de restricción en términos de constantes de equilibrio, sería muy difícil el combinar las ecuaciones de velocidad con las de restricción.

5. Derivación de ecuaciones de velocidad para mecanismos en estado estacionario con equilibrio rápido.

Las ecuaciones de velocidad derivadas con la suposición de estado estacionario pueden ser muy complejas en comparación con la suposición de equilibrio. Sin embargo, la suposición de equilibrio no se justifica para muchas reacciones. Por otro lado, existen reacciones que contienen algunos pasos en equilibrio y otros en estado estacionario.

Para un sistema general de estado estacionario con algunos segmentos en equilibrio, el método desarrollado por S. Cha, de factores de concentración fraccional, puede ser usado para la derivación de la ecuación de velocidad. En los pasos en equilibrio la velocidad de reacción es mucho más rápida que aquellos en estado estacionario, por lo que se pueden expresar como si existieran nuevas especies enzimáticas. El mecanismo de transporte que se encuentra en la figura 3.7, se usará para ilustrar el procedimiento de Cha.

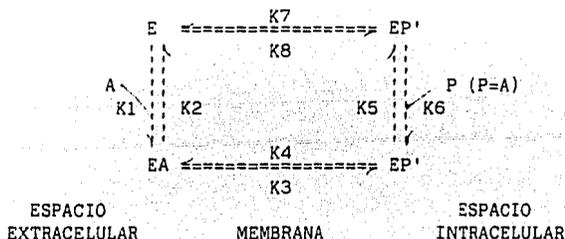


Fig. 3.7 Mecanismo de transporte para ejemplificar el método de factores de concentración fraccional.

La E se usa para denominar un transportador que se une con el sustrato A, en el espacio extracelular para formar EA en la superficie externa de la membrana. Entonces EA se transpone y libera el producto (que aún es A) dentro del espacio intracelular. La enzima libre (transportador) en el espacio intracelular-membrana, necesita transponerse nuevamente hacia el espacio extracelular antes de que pueda combinarse con el sustrato A otra vez.

Se supone que los pasos de adición de sustrato y liberación de producto son mucho más rápidos que la isomerización (transposición) del complejo transitorio (EA-EA') y el de enzima libre (E-E'). Así, E y EA están en equilibrio rápido, así como también lo están E' y EP'.

Si nombramos los segmentos de equilibrio rápido E-E_A como X y -- E' - EP' como X' el mecanismo de la figura 3.7, resulta ser:



donde f3, f4, f7 y f8 son las concentraciones fraccionales.

Estas representan la porción relativa de los segmentos de equilibrio rápido que están involucradas en la reacción.

Por ejemplo, f3 = (EA)/(X), f4 = (EP')/(X'), f7 = (E')/(X'), y f8 = (E)/(X). Específicamente para el segmento de equilibrio rápido - (E-EA), las concentraciones fraccionales son:

$$\begin{aligned}
 f3 &= \frac{(EA)}{(X)} = \frac{(EA)}{(E) + (EA)} \\
 &= \frac{K1(A)/K2}{1 + (K1(A)/K2)} = \frac{K1(A)}{K2 + K1(A)}
 \end{aligned}
 \tag{3.62}$$

$$\begin{aligned}
 f8 &= \frac{(E)}{(X)} = \frac{(E)}{(E) + (EA)} \\
 &= \frac{1}{1 + (K1(A)/K2)} = \frac{K2}{K2 + K1(A)}
 \end{aligned}
 \tag{3.63}$$

De igual manera, para el segmento de equilibrio rápido (EP'-EP'), obtendremos

$$f4 = \frac{K6(P)/K5}{1 + (K6(P)/K5)} = \frac{K6(P)}{K5 + K6(P)}
 \tag{3.64}$$

$$f7 = \frac{1}{1 + (K6(P)/K5)} = \frac{K5}{K5 + K6(P)}
 \tag{3.65}$$

Nótese que: f3 + f8 = 1 y f4 + f7 = 1.

La ecuación de velocidad puede entonces ser derivada. Los patrones de King-Altman para (3.61), son:

Las especies enzimáticas asociadas con estos patrones son:

$$\begin{aligned} (X) &: K7f7 + K4f4 \\ (X') &: K8f8 + K3f3 \end{aligned} \quad (3.66)$$

y si definimos $E = (X) + (X')$, entonces la ecuación de velocidad en términos de las concentraciones fraccionales será:

$$\begin{aligned} v &= K3f3(X) - K4f4(X') \\ &= \frac{(K3f3(X) - K4f4(X')) (E_T)}{(X) + (X')} \end{aligned} \quad (3.67)$$

Si sustituimos las ecuaciones (3.62), (3.63), (3.64), (3.65) y (3.66) en la ecuación (3.67), el resultado será:

$$\frac{v}{(E_T)} = \frac{(K1K3K5K7(A) - K2K4K6K8(P))}{(K1K5K7 + K1K3K5)(A) + (K2K4K6 + K2K6K8)(P) + (K1K4K6 + K1K3K6)(A)(P)} \quad (3.68)$$

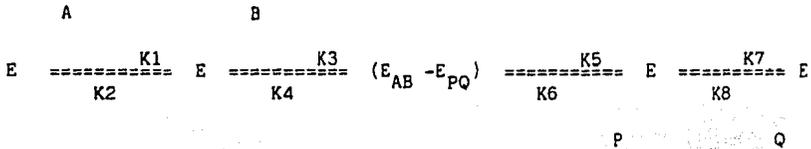
La misma ecuación de velocidad puede ser derivada, usando el método estacionario. Por ejemplo, bajo las condiciones de estado estable la ecuación de velocidad para el mecanismo de la figura 3.7, es:

$$\begin{aligned} v/(E_T) &= (K1K3K5K7(A) - K2K4K6K8(P)) / ((K7 + K8)(K2K5 + \\ &(K2K4 + K3K5) + K1(K3K5 + K3K7 + K4K7 + \\ &K5K7)(A) + K6(K2K4 + K2K8 + K3K8 + K4K8)(P) + \\ &K1K6(K3 + K4)(A)(P)) \end{aligned} \quad (3.69)$$

Si $K3$, $K4$, $K7$ y $K8$ de la ecuación anterior, se supone que son mucho más pequeñas que las otras constantes de velocidad ($K1$, $K2$, $K5$ y $K6$), entonces la ecuación de estado estacionario (ecuación 3.69), se reduce a una con equilibrio rápido (ecuación 3.68). Así, la ecuación de velocidad para un mecanismo de equilibrio rápido puede ser obtenida tratando el mecanismo como si fuera de estado estacionario, obteniéndose la ecuación completa y eliminando aquellos términos que son relativamente pequeños por suposición de equilibrio rápido. En el ejemplo anterior, con la suposición de equilibrio rápido, $K3$, $K4$, $K7$ y $K8$ son mucho más pequeñas que $K1$, $K2$, $K5$ y $K6$; pero, por ejemplo, en el coeficiente de A , en el denominador de (3.69), no todos los términos se eliminan, aunque cada uno de ellos contiene $K3$ y/o $K7$. Esto es porque el producto de un número pequeño y uno grande es mucho mayor que el producto de dos números pequeños. Así, $K3K7$ y $K4K7$ son menores que $K3K5$ y $K5K7$, por lo que solamente los dos primeros se descartarán. Siguiendo el mismo procedimiento, una ecuación de equilibrio rápido, como (3.68), puede ser obtenida de una ecuación de estado estacionario, como (3.69).

6. Forma de la ecuación de velocidad

En la literatura casi todas las ecuaciones de velocidad se expresan en términos de constantes cinéticas que resultan de la combinación de constantes de velocidad. Por ejemplo, para el mecanismo ordenado Bi-Bi siguiente



la ecuación de velocidad, suponiendo que no hay producto, es:

$$v = \frac{\text{K1K3K5K7(A)(B)(E}_r)}{\text{K2K7(K4 + K5) + K1K7(K4 + K5)(A) + K1K3(K5 + K7)(A)(B) + K3K5K7(B)} \quad (3.70)$$

Si se combinan las constantes de velocidad, se obtiene una ecuación en forma de coeficiente, como la que se muestra a continuación

$$v = \frac{c_1 (A) (B) (E_r)}{c_2 + c_3(A) + c_4(B) + c_5(A)(B)} \quad (3.71)$$

Si en la ecuación anterior se divide entre c_5 tanto al numerador como al denominador, se obtiene

$$v = \frac{v_f (A) (B) (E_r)}{\text{K}_{\text{AB}} + \text{K}_A(A) + \text{K}_B(B) + (A) (B)} \quad (3.72)$$

Otra manera sería separando la constante K_{AB} en dos constantes, lo que resultaría:

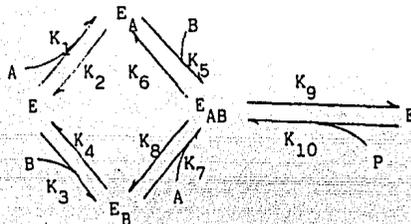
$$v = \frac{v_1 (A) (B)}{\text{Kia Kb} + \text{Kb(A)} + \text{Ka(B)} + (A) (B)} \quad (3.73)$$

La forma de la ecuación de velocidad que se obtenga, dependerá del método utilizado para la combinación de constantes. Lo anterior, nos lleva a preguntarnos: ¿Cuál será la mejor forma de ecuación?. Algunos autores están en favor de combinar constantes de velocidad en constantes cinéticas, que pueden ser determinadas experimentalmente (p. ej., V_{max} , K_m y K_i de la ecuación de Michaelis-Menten). Sin embargo, es una suposición errónea, ya que esas constantes sólo pueden ser determinadas gráficamente y no experimentalmente como postulan. Por ejemplo K_m de la ecuación de Michaelis, es una constante aparente de afinidad, que usualmente no tiene un significado físico. Por lo contrario, algunas constantes de velocidad pueden ser medidas por medio de técnicas experimentales.

Esta situación se presenta debido a que tradicionalmente se han usado constantes cinéticas en lugar de constantes de velocidad. Según se vio anteriormente, Michaelis & Menten derivaron la ecuación de velocidad para un mecanismo con un sólo sustrato en términos de constantes cinéticas, por lo que, desde entonces han sido usadas. Pero por las diferentes maneras que existen

de combinar constantes de velocidad, las constantes cinéticas no son únicas. - Más aún, en detrimento de esta situación, está el hecho de que la relación entre unas y otras no es lineal, o una a una. Así, no todas las constantes de velocidad pueden ser calculadas a partir de las constantes cinéticas. Por otro lado, si los valores de las constantes de velocidad son conocidos, el valor de cualquier constante cinética puede ser calculado de manera única.

Como ejemplo, consideremos un mecanismo al azar Bi-Uni como el que se muestra a continuación.



de donde se puede deducir la ecuación de velocidad, que en su forma de coeficientes, resulta ser

$$v/(E_T) = \frac{(C_1(A)(B) + C_2(A)^2(B) + C_3(A)(B)^2 - C_4(P) - C_5(A)(P) - C_6(B)(P))}{(C_7 + C_8(A) + C_9(B) + C_{10}(A)(B) + C_{11}(A)^2 + C_{12}(B)^2 + C_{13}(A)^2(B) + C_{14}(A)(B) + C_{15}(P) + C_{16}(A)(P) + C_{17}(B)(P) + C_{18}(A)(B)(P))} \quad (3.74)$$

en donde

- C1 = K₁K₄K₅K₉ + K₂K₃K₇K₉
- C2 = K₁K₅K₇K₉
- C3 = K₃K₅K₇K₉
- C4 = K₂K₄K₆K₉ + K₂K₄K₈K₁₀
- C5 = K₂K₆K₇K₁₀
- C6 = K₄K₅K₈K₁₀
- C7 = K₂K₄K₆ + K₂K₄K₈ + K₂K₄K₁₀
- C8 = K₁K₄K₆ + K₁K₄K₈ + K₁K₄K₉ + K₂K₆K₇ + K₂K₇K₉
- C9 = K₂K₃K₆ + K₂K₃K₈ + K₂K₃K₉ + K₄K₅K₇ + K₄K₅K₉
- C10 = K₁K₄K₅ + K₂K₃K₇ + K₁K₅K₉ + K₃K₆K₇ + K₅K₇K₉
- C11 = K₁K₆K₇ + K₁K₇K₉
- C12 = K₃K₅K₈ + K₃K₅K₉
- C13 = K₁K₅K₇
- C14 = K₃K₅K₇
- C15 = K₂K₄K₁₀ + K₂K₈K₁₀ + K₄K₆K₁₀
- C16 = K₂K₇K₁₀ + K₆K₇K₁₀
- C17 = K₄K₅K₁₀ + K₅K₈K₁₀
- C18 = K₅K₇K₁₀

En este caso, existen 18 parámetros desconocidos en términos de los coeficientes C₁, ..., C₁₈, pero sólo existen 10 constantes de velocidad por conocer. Más aún, si suponemos velocidad inicial con una concentración de producto igual a cero, existen 11 coeficientes c desconocidos, comparados con 9 -

constantes de velocidad por conocer ($K_{10} = 0$). Suponiendo que uno pudiera estimar las 11 constantes cinéticas, sería difícil obtener las nueve constantes de velocidad, ya que hay más ecuaciones que incógnitas. Pero, si uno pudiera estimar experimentalmente o matemáticamente las 9 constantes de velocidad, --cualquier forma de las constantes cinéticas podría ser calculada exactamente.

Para demostrar esto, simplifiquemos aún más la ecuación anterior,

$$\frac{v}{(E_T)} = \frac{C1(A)(B) + C2(A)^2(B) + C3(A)(B)^2}{C7 + C8(A) + C9(B) + C10(A)(B) + C11(A)^2 + C12(B)^2 + C13(A)^2(B) + C14(A)(B)^2} \quad (3.75)$$

y para el segundo caso ($(A) = (B) = 0$), la ecuación de velocidad será

$$\frac{v_b}{(E_T)} = \frac{C4(P)}{C7 + C15(P)} \quad (3.76)$$

La anterior ecuación puede ser expresada en la forma tradicional de la ecuación de Michaelis-Menten.

$$v_b = \frac{V_{max}(P)}{K_m + (P)} \quad (3.77)$$

donde

$$V_{max} = \frac{C4(E_T)}{C15} = \frac{(K2K4K6K10 + K2K4K8K10)(E_T)}{K2K4K10 + K2K8K10 + K4K6K10}$$

y

$$K_m = \frac{C7}{C15} = \frac{K2K4K6 + K2K4K8 + K2K4K10}{K2K4K10 + K2K8K10 + K4K6K10}$$

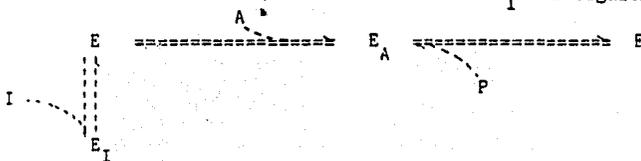
Por otro lado, la ecuación, en el sentido de formación de producto, -no puede ser simplificada a la forma tradicional de la ecuación de Michaelis-Menten, ya que hay términos de grado superior con respecto a A y B.

Considerando los inconvenientes mencionados de expresar las ecuaciones de velocidad en términos de constantes cinéticas y el hecho de que los mecanismos de reacción se expresan en términos de constantes de velocidad, es más lógico desarrollar las ecuaciones de velocidad en términos de estas últimas. Con esto en mente, sólo es necesario un método para manejar cualquier tipo de mecanismo. Más aún, esta forma de ecuación facilita la combinación de ecuaciones de velocidad con las ecuaciones de restricción vistas anteriormente.

7. Derivación de la ecuación de velocidad para estudios de inhibición.

Como se mencionó anteriormente, un inhibidor es un compuesto químico, -que disminuye la velocidad de reacción de una enzima. Generalmente, un inhibidor compete con un sustrato "normal" de la reacción, por la unión con alguna de las especies enzimáticas, disminuyendo la concentración de éstas y por lo tanto, limitando su cantidad disponible para la reacción normal. La acumulación de producto de una reacción, tiene la tendencia a forzar la reacción en sentido contrario (buscando un punto de equilibrio) y por lo tanto disminuyendo la velocidad de reacción. Este tipo de reacción es llamada "inhibición por producto". Un inhibidor total es aquél que se une con cualquier especie enzimática, incluyendo a la enzima libre, formando un complejo que no es ca--

talíticamente funcional, como en el caso de E_I del siguiente mecanismo.



El comportamiento de los inhibidores puede ser clasificado en cuatro tipos: competitivo, acompetitivo, no competitivo y mixto. Los estudios de inhibición pueden ser usados para identificar el orden de formación de productos o de adición de sustratos.

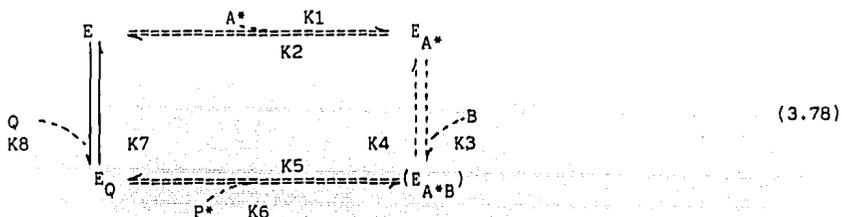
Ya que un inhibidor es un compuesto químico involucrado en la reacción, funcionalmente puede ser tratado como un sustrato. Así, las técnicas discutidas en las secciones anteriores para derivar ecuaciones de velocidad pueden ser seguidas sin modificación. Por ejemplo, la ecuación de velocidad para inhibición de producto, puede ser obtenida de la ecuación de velocidad total del mecanismo, haciendo que la concentración de otros productos sea igual a cero.

8. Derivación de ecuaciones de velocidad en estudios de intercambio de isótopos.

Además de los estudios de velocidad de estado estacionario inicial e inhibición, los de intercambio de isótopos es otra técnica disponible para conocer la cinética de las reacciones. Este tipo de investigaciones involucran el marcado de un reactivo con un isótopo radioactivo. Usando reacciones marcadas, la velocidad en cualquier dirección puede ser medida.

El intercambio de isótopos puede ser usado también para identificar o descubrir pasos de reacción opacados por los pasos principales. Este método es tan importante que puede ser usado para confirmar el mecanismo derivado por otro medio. El uso de la técnica supone que el isótopo tiene el mismo efecto o función que el sustrato no marcado.

El método para derivar ecuaciones de velocidad de intercambio de isótopos, utiliza el sistema de King-Altman. En el mecanismo de reacción, el reactivo marcado y las especies enzimáticas que lo contengan son marcadas con un asterisco y los pasos de reacción entre dos especies sin marcar, son señaladas con líneas más gruesas. Para ilustrar la metodología, se usa el mecanismo de dos sustratos y dos productos con A y P marcados, representándose el mecanismo en la siguiente forma.

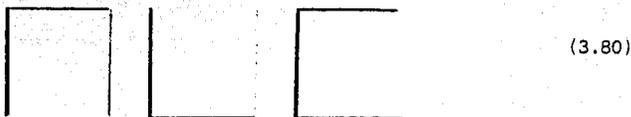


La velocidad de formación de P', asumiendo velocidad inicial es:

$$v = \frac{d(P')}{dt} = K_5(E_{A'B})$$

$$= K_5 \frac{N(E_{A'B})}{D} \quad (3.79)$$

Los términos del denominador D, son evaluados de los patrones de King y Altman, que incluyen todas las líneas gruesas. Para el presente ejemplo sólo existe una línea gruesa, y los patrones válidos son tres (aunque en total son cuatro patrones):



Los términos del denominador de la ecuación, serán igual a la suma -- del producto de las constantes de velocidad, por la concentración de los reactivos involucrados en cada paso en la dirección de las especies enzimáticas no -- marcadas. Para los propósitos de derivación de ecuaciones de velocidad de reacciones de intercambio iónico, las constantes de velocidad y concentración de -- reactivos de aquellos pasos con línea más gruesa, se suponen como igual a uno , esto es, son ignorados.

Así, para el mecanismo (3.78), D es igual a

$$D = K_2K_4 + K_2K_5 + K_3K_5(B) \quad (3.81)$$

Los términos del numerador son derivados del mismo subconjunto de patrones de King-Altman. Sólo aquellos patrones que contienen pasos con reactivos - marcados (con la especie enzimática no marcada) hacia la especie enzimática marcada $N_{x'}$ (de la ecuación 3.79) son usados.

Cada patrón contribuye a un término y cada término es igual a el producto de la constante de velocidad y la concentración del reactivo del paso de -- reacción en la dirección de formación de la especie enzimática X'. Otra vez, - las constantes de velocidad y las concentraciones de los reactivos de los pasos con línea gruesa son igual a uno. Así, solamente las líneas sencillas contribuyen a los términos del numerador. Para el mecanismo (3.78), solamente hay una especie enzimática marcada en el numerador ($E_{A'}$). De los patrones de (3.79), - el primero es el único que contiene un camino que convierte A', con E, en $E_{A'}$. Así los términos del numerador son:

$$N_{(E_{A'})} = (E)K_1(A')K_3(B)$$

La ecuación de velocidad resultante es:

$$v = \frac{K_1K_3K_5(A')(B)(E)}{K_2K_4 + K_2K_3 + K_3K_5(B)} \quad (3.82)$$

ción de las concentraciones de los sustratos bajo condiciones de equilibrio o de estado estacionario. Bajo condiciones en que los reactivos no marcados están en equilibrio, (E) se obtiene a partir del mecanismo (3.78)

$$(E_A) = \frac{K_1(A)(E)}{K_2} \quad (3.83)$$

$$(E_{A'B}) = \frac{K_1(A)K_3(B)}{K_2K_4} \quad (3.84)$$

$$(E_Q) = \frac{K_8(Q)(E)}{K_7} \quad (3.85)$$

Sustituyendo las tres ecuaciones anteriores en la ecuación de conservación

$$(E_T) = (E) + (E_{A'B}) + (E_Q)$$

se obtiene, después de resolver para (E) y sustituir en (3.82),

$$v = \frac{K_1K_3K_5(A)(A)(E_T)}{(K_2K_4 + K_2K_5 + K_3K_5(B))} \left(1 + \frac{K_1(A)}{K_2} + \frac{K_8}{K_7}(Q) + \frac{K_1K_3(A)(B)}{K_2K_4} \right)$$

El mismo procedimiento puede ser seguido, cuando se obtiene la concentración de E en condiciones de estado estacionario.

En el siguiente capítulo, se describirá la obtención de ecuaciones de velocidad y de restricción para cualquier mecanismo propuesto, por medio de un programa de computadora, usando los principios de King-Altman y generación de ecuaciones de restricción, según lo visto en este capítulo.

C A P I T U L O I V

GENERACION DE ECUACIONES DE VELOCIDAD POR COMPUTADORA

Cualquier estudio fundamental de la función catalítica debe estar basado en mediciones cuantitativas de velocidad de reacción. Al variar las condiciones en que se lleva a cabo la reacción, se pueden hacer inferencias sobre el mecanismo de acción enzimática. Idealmente, tales estudios cinéticos deben llevarse a cabo conjuntamente con estudios químicos y estructurales de la enzima con el fin de obtener un cuadro definitivo del proceso, pero esto sólo es posible si la enzima se tiene en forma pura. Actualmente muchas enzimas no han sido purificadas y los estudios cinéticos son el único medio disponible para llevar a cabo esta tarea.

Existen muchos factores que influyen el progreso de las reacciones, por lo que es difícil derivar ecuaciones cinéticas que las describan. El método con que se cuenta para evitar interferencias de los diferentes factores, es el de hacer mediciones de velocidad de reacción inicial, manteniendo todas las condiciones que afectan constantes, excepto una para medir su influencia, con lo cual se pueden descartar aquellos factores que no interfieren en el curso de la reacción de una manera definitiva, con el fin de que la ecuación de velocidad que se plantea no sea demasiado complicada e incluya aquellos factores que realmente deban aparecer.

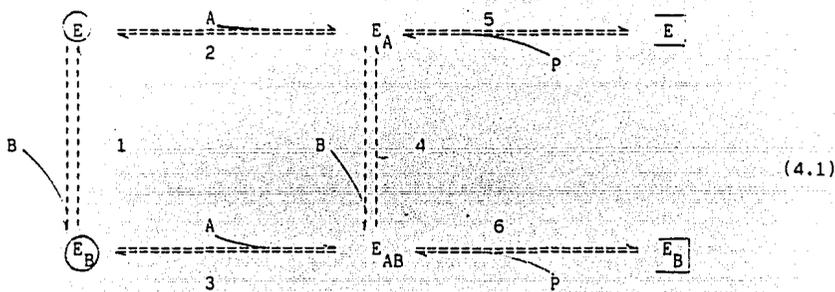
El uso del método de King-Altman para obtener ecuaciones de velocidad simplifica la tarea, sin embargo, la obtención de la ecuación de velocidad final, sería el objetivo principal sin tener que detenerse en pasos intermedios.

El programa de computadora que genera ecuaciones de velocidad para cualquier mecanismo propuesto, se presenta en el apéndice III. El programa está escrito en lenguaje PL/I, y a diferencia de los apéndices I y II, tanto las ecuaciones de velocidad como las de restricción son generadas. La ecuación de velocidad generada es automáticamente almacenada e insertada en el programa siguiente destinado a la estimación de parámetros (ver Capítulo V). Por supuesto, las ecuaciones generadas pueden ser grabadas en otro archivo ahorrando tiempo en usos posteriores, especialmente si el mecanismo será estudiado repetidamente, tal como en la estimación de parámetros, ya que la ecuación de velocidad no cambia para un mismo mecanismo, aunque el valor de los parámetros sea diferente.

En términos generales, el programa revisa los datos de entrada para las direcciones de los pasos que se dirigen al nodo de interés, descartando aquellos que son irreversibles hacia ese nodo, con lo cual se pueden generar ecuaciones de velocidad para mecanismos con pasos irreversibles; posteriormente, haciendo uso de la teoría de King-Altman de patrones válidos (de la misma manera que el programa del Apéndice I) deriva la ecuación de velocidad apropiada a partir de ellos. A continuación, identifica los ciclos independientes para generar las ecuaciones de restricción, las cuales, son derivadas y arregladas en función de las constantes de velocidad inversas (de productos a reactivos) de las ramas únicas. Estas ecuaciones de restricción son confrontadas con la ecuación de velocidad, en el programa que estima las constantes de velocidad. Las constantes de velocidad inversas son escogidas por conveniencia según se vió en el Capítulo III. Las ecuaciones de restricción son expresadas como el producto de relaciones de constantes, de todas las ramas del ciclo en lugar del producto de constantes de velocidad en una dirección, entre el producto de constantes en sentido contrario, para evitar errores de sobre especificación durante el cálculo de constantes.

1. Descripción del mecanismo a la computadora

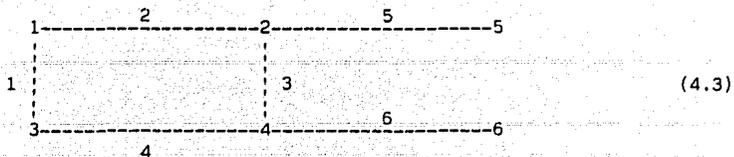
Según se mencionó anteriormente, se deberá tener cuidado para identificar los ciclos en un mecanismo, ya que algunos de ellos son usados para generar los patrones válidos de King-Altman, por lo que se les puede considerar como artificiales y ajenos al mecanismo que se estudia. Así, puede haber dos gráficas para un mecanismo: una con el propósito de generar patrones de King Altman y otra para generar ecuaciones de restricción; por ejemplo, considérese el siguiente mecanismo



Las especies enzimáticas encerradas en un cuadro, son las especies regeneradas en comparación con las especies "frescas" o especies libres encerradas en círculos. Una gráfica lineal para generar patrones válidos de King-Altman, agrupa especies enzimáticas iguales en un mismo nodo; así, con este propósito, el mecanismo anterior se convierte en

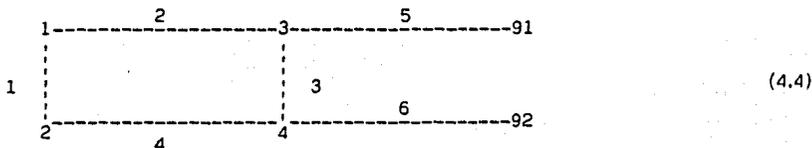


De la gráfica anterior, se observa que existen tres ciclos: 1-2-1, 1-2-4-3-1 y 3-4-3. Sin embargo, sólo hay un ciclo en el mecanismo original, que es: 1-2-4-3-1. Este ciclo resulta de los dos caminos existentes para producir E_{AB} , uno por medio de E_A y otro por medio de E_B . Por lo que, para el propósito de generar ecuaciones de restricción, la gráfica lineal será



Para evitar la confusión que existe, causada por las dos formas de presentar el mecanismo, solamente la gráfica que representa el mecanismo exacto

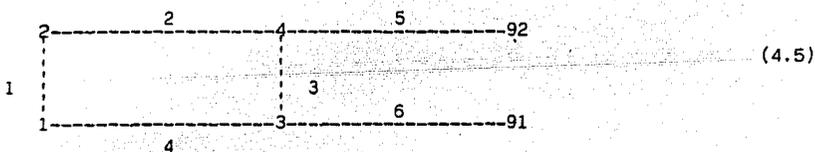
to será usada para describir los datos a la computadora, para generar las ecuaciones de velocidad y de restricción. Así para el programa del Apéndice-III, la gráfica lineal se representará como se muestra a continuación



Nótese que los nodos y ramas de la gráfica anterior corresponden exactamente a las especies enzimáticas y pasos de reacción del mecanismo original (4.1). Cada nodo tiene un número de identificación distinto. Los nodos que corresponden a las especies enzimáticas libres, E y E_B en este caso, son numerados consecutivamente empezando con el número 1, de esta manera, se les asigna un número de nodo único y los nodos correspondientes a las especies enzimáticas libres regeneradas son numeradas de tal manera que el número corresponda a la especie enzimática fresca + 90. Para nuestros propósitos, las especies enzimáticas libres son aquellas formas que aparecen en un mecanismo de reacción más de una vez, una de las cuales, es al inicio de la reacción. Las especies enzimáticas libres regeneradas son las especies enzimáticas resultantes al final de la reacción, siendo igual siempre al número de especies libres frescas. En este ejemplo E_B es una especie enzimática libre (y regenerada), más que una intermedia, ya que al final de la reacción ésta no se convierte en E . En este mecanismo, el sustrato B actúa como inhibidor y parte de la enzima libre E es usada para formar E_B , dando por efecto una inhibición de la reacción.

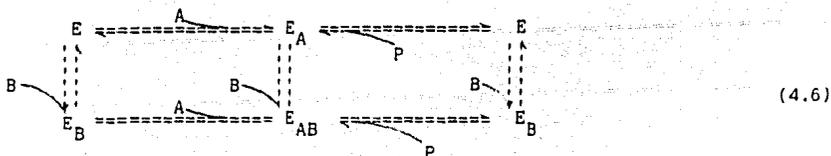
De acuerdo a las reglas anteriores, las especies enzimáticas E y E_B son designadas como 1 y 2 respectivamente (pueden ser 2 y 1). A la especie enzimática regenerada E , correspondiente a la especie enzimática libre E se le asigna el número de nodo 91 (o sea $90 + 1$), y a la regenerada E_B se le asignará el número 92 ($90 + 2$).

Otra manera de numerar la gráfica sería:

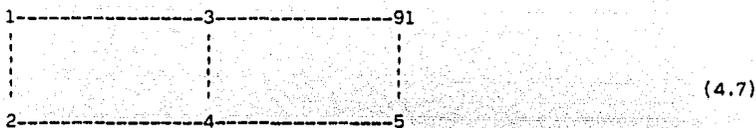


Es obligatorio para hacer una buena descripción del mecanismo a la computadora, que las especies regeneradas reciban el mismo número que las especies libres correspondiente + 90.

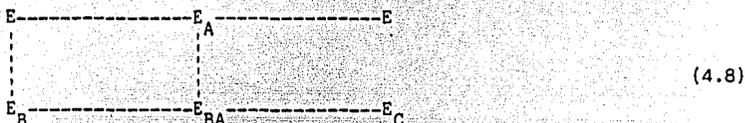
Si la especie enzimática regenerada E_B en el mecanismo (4.1) se convierte a E liberando B como se muestra a continuación



entonces la representación gráfica con los números de nodo correctos, sería:



Por otro lado, si la especie enzimática regenerada E_B del mecanismo (4.1) fuera E_C , como se muestra a continuación



entonces la gráfica apropiada sería



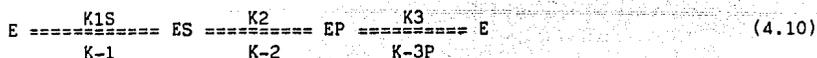
Durante el proceso de generación de ecuaciones de velocidad, por la computadora, los valores de aquellos nodos que tengan número de nodo mayor a 90, serán restados de 90. Así, para la computadora, el nodo 92 de la gráfica (4.4) será el mismo que el nodo 2 y el nodo 91 será el mismo que el nodo 1, para fines de ecuación de velocidad. Esto en esencia, dirige el curso de la reacción de tal manera que conecta el nodo 4 al nodo 2; similarmente, el -- paso de reacción 5 es dirigido con el fin de conectar el nodo 3 al nodo 1, - con lo cual los patrones de King-Altman son generados según se describió en el Capítulo III. Durante el proceso de generación de ecuaciones de restricción, el número de nodo (incluyendo aquellos con número mayor a 90) no serán cambiados, por lo que solamente los ciclos legítimos serán identificados y usados para la formación de las ecuaciones de restricción respectivas.

2. Resultados

El programa del Apéndice III fue probado con diferentes mecanismos y las ecuaciones de velocidad y de restricción resultantes fueron comparadas - contra las publicadas en la literatura. Los resultados fueron:

a) Mecanismo reversible de un sustrato

Este mecanismo es el más simple que puede ser resuelto con el programa. Representa una reacción de un sustrato, termodinámicamente reversible, - en el que se incluyen explícitamente los complejos enzima-sustrato y enzima-producto. El mecanismo propuesto es:



cuya ecuación de velocidad reportada es:

$$v = \frac{(K1SK2K3 - K-1K-2K-3P)(Eo)}{K-1K-2 + K-1K3 + K2K3 + K1SK-2 + K1SK-3 + K-2K-3P + K1SK2 + K-1K-3P + K2K-3P} \quad (4.11)$$

Con el fin de describir a la computadora el mecanismo (4.10) se modifíco a la siguiente notación:

$$E \xrightleftharpoons[K(2)]{K(1)S(1)} ES \xrightleftharpoons[K(4)]{K(3)} EP \xrightleftharpoons[K(6)S(2)]{K(5)} E \quad (4.12)$$

Los datos alimentados al programa, son los que se muestran en la figura 4.1 y los resultados se muestran en la figura 4.2.

```

3 3 1
1 1 2 K( 1 ) S(1) K( 2)
2 2 3 K( 3 )      K( 4)
3 3 91 K( 5 )      K( 6) S(2)
S(2)
    
```

Fig. 4.1 Datos descriptivos del mecanismo (4.10) para el programa del Apéndice III.

El resultado del programa es el mismo que el reportado, si se simplifica y se hace S(1)=S, S(2)=P, K(1)=K1, K(2)=K-1, K(3)=K2, K(4)=K-2, K(5)=K3 y K(6)=K-3.

El único detalle que hay que tener en cuenta siempre, es que el programa genera la relación de velocidad inicial entre la concentración total de enzima (Vi/(E) o).

DESCRIPCION TOPOLOGICA DEL MECANISMO ENZIMATICO

NUM DE RAMAS = 3

NUM DE NODOS= 3

1	1	2	K(1)	S(1)	K(2)
2	2	3	K(3)		K(4)
3	3	21	K(5)		K(6) S(2)

*****RESULTADOS*****

‡ DE ENZIMAS LIBRES = 1
 ‡ DE PATRONES POR EL METODO DEL DETERMINANTE= 3
 ‡ DE PATRONES POR EL METODO POLINOMIAL= 3

PATRONES VALIDOS DE KING-ALTMAN

PATRON ‡	RAMAS QUE COMPONEN EL PATRON		
1	2	3	
2	1	3	
3	1	2	

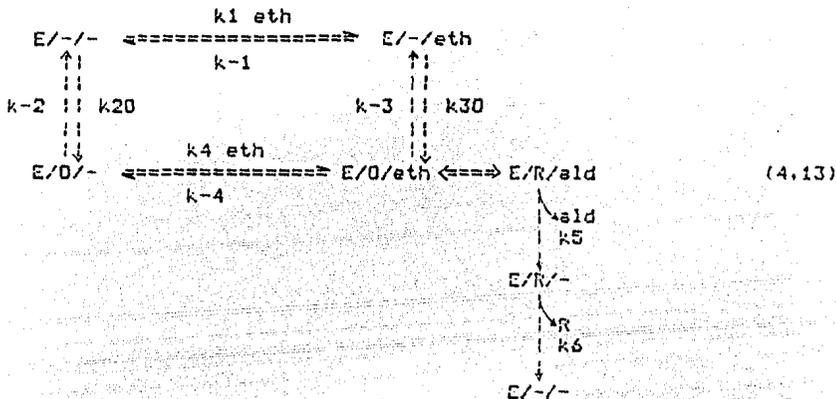
ECUACION DE VELOCIDAD

$NODO(01)=NODO(01)*K(3)*K(5)*K(2)*K(5)*K(2)*K(4);$
 $NODO(02)=NODO(02)*K(4)*K(6)*S(2)*K(1)*S(1)*K(5)*K(1)*S(1)*K(4);$
 $NODO(03)=NODO(03)*K(3)*K(6)*S(2)*K(2)*K(6)*S(2)*K(1)*S(1)*K(3);$
 $DENOM=DENOM+NODO(01)+NODO(02)+NODO(03);$
 $NUMER=NUMER+NODO(03)*K(5)-NODO(01)*K(6)*S(2);$
 $VELOC=NUMER/DENOM;$

Fig. 4.2 Resultados del Programa del Apéndice III para el mecanismo reversible de un sustrato.

b) Alcohol deshidrogenasa de hísado

El mecanismo para la oxidación de etanol por la alcohol deshidrogenasa de hísado de caballo, a concentraciones no excesivas de etanol y en ausencia de productos de reacción, fue establecida por Hanes et. al como:



donde (eth) = etanol, (ald) = acetaldehído, (O) = NAD y (R) = NADH. La ecuación de velocidad reportada es:

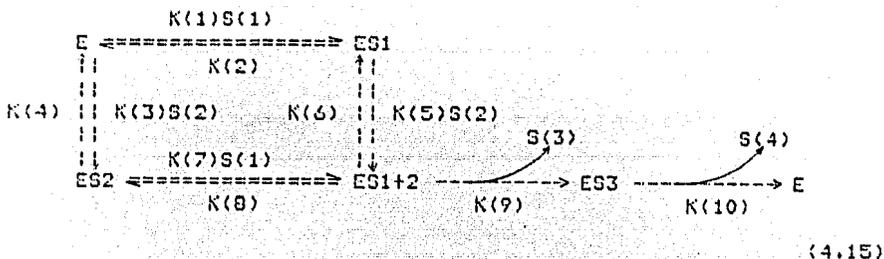
$$v_f = \frac{\text{NUMERADOR}}{\text{DENOMINADOR}} \quad (4.14)$$

donde v_f = velocidad inicial/concentración total de enzima y

$$\text{NUMERADOR} = k_1 k_3 k_4 k_5 k_6 (\text{eth}) (\text{NAD}) + k_2 k_3 k_4 k_5 k_6 (\text{eth}) (\text{NAD}) + (k_1 k_3 - 2k_3 + k_1 k_2 k_4) k_5 k_6 (\text{eth}) (\text{NAD})$$

$$\begin{aligned}
 \text{DENOMINADOR} = & k_1 k_3 k_4 (k_5 + k_6) (\text{eth}) (\text{NAD}) + k_1 k_4 k_6 (k_3 + k_5) (\text{eth}) + k_2 k_3 k_4 (k_5 + k_6) (\text{eth}) (\text{NAD}) + (k_1 k_3 (k_3 - 2k_5 + k_3 - 2k_6 + k_3 - 4k_6) + k_1 k_2 k_4 (k_5 + k_6) + k_4 k_6 (k_2 k_3 - 3 + k_3 k_5)) (\text{eth}) (\text{NAD}) + (k_1 k_3 - 2k_3 (k_3 + k_4 + k_5) + k_1 k_4 k_6 (k_3 - 3 + k_5)) (\text{eth}) + k_2 k_3 k_6 (k_4 + k_5) (\text{NAD}) + (k_1 k_2 k_6 (k_3 - 3 + k_4 + k_5) + k_2 k_3 k_6 (k_4 + k_5)) (\text{NAD}) + k_1 k_2 k_6 (k_3 + k_4 + k_5)
 \end{aligned}$$

El mecanismo se representó con fines de descripción a la computadora como:



Los datos descriptivos del mecanismo y los resultados se presentan en las figuras 4.3 y 4.4.

6	5	1
1	1	3 K(1) S(1) K(2)
2	1	2 K(3) S(2) K(4)
3	2	4 K(7) S(1) K(8)
4	3	4 K(5) S(2) K(6)
5	4	5 K(9) 0 S(3)
6	5	91 K(10) 0 S(4)

S(2)

Fig. 4.3 Datos descriptivos del mecanismo (4.13) para el Programa del Apéndice III.

Para este mecanismo se generó una ecuación de restricción que fue:

$$K(2) = K(1) * (K(4) / K(3)) * (K(8) / K(7)) * (K(5) / K(6))$$

debido a que el mecanismo tiene un ciclo cerrado y que cada paso de reacción en el mismo es reversible.

DESCRIPCION TOPOLOGICA DEL MECANISMO ENZIMATICO

NUM DE RAMAS = 6

NUM DE NODOS= 5

```

1  1  3 K( 1) S(1) K( 2)
2  1  2 K( 3) S(2) K( 4)
3  2  4 K( 7) S(1) K( 8)
4  3  4 K( 5) S(2) K( 6)
5  4  5 K( 9)          0 S(3)
6  5  91 K(10)         0 S(4)
    
```

*****RESULTADOS*****

```

# DE ENZIMAS LIBRES = 1
# DE PATRONES POR EL METODO DEL DETERMINANTE= 12
# DE PATRONES POR EL METODO POLINOMIAL 12
    
```

PATRONES VALIDOS DE KING-ALTMAN

PATRON # RAMAS QUE COMPONEN EL PATRON

```

1  3  4  5  6
2  1  3  5  6
3  1  3  4  6
4  2  4  5  6
5  2  3  4  6
6  1  2  5  6
7  1  2  4  6
8  1  2  3  6
9  2  3  4  5
10 1  2  3  5
11 1  3  4  5
12 1  2  4  5
    
```

ECUACIONES DE RESTRICCIÓN Y ASPECTOS RELACIONADOS

```

T(01)=(K( 1)/K( 2))*K( 5)/K( 6))*K( 8)/K( 7))*K( 4)/K( 3));
NVC=01;
NCON=01;
IPK( 2)=1;
K( 2)=K( 1)*K( 4)/K( 3))*K( 8)/K( 7))*K( 5)/K( 6));
    
```

Fig. 4.4 Resultados del programa del Apéndice III del mecanismo de oxidación de etanol por la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo.

ECUACION DE VELOCIDAD

```

NODO(01)=NODO(01)+K( 7)*S(1)*K( 5)*S(2)*K( 7)*K(10)+K( 2)
*K( 7)*S(1)*K( 9)*K(10)+K( 2)*K( 7)*S(1)*K( 6)*K(10)+K( 4)
*K( 5)*S(2)*K( 9)*K(10)+K( 4)*K( 8)*K( 5)*S(2)*K(10)+K( 2)
*K( 4)*K( 9)*K(10)+K( 2)*K( 4)*K( 6)*K(10)+K( 2)*K( 4)
*K( 8)*K(10);
NODO(02)=NODO(02)+K( 1)*S(1)*K( 8)*K( 5)*S(2)*K(10)+K( 3)*S(2)
*K( 5)*S(2)*K( 9)*K(10)+K( 3)*S(2)*K( 8)*K( 5)*S(2)*K(10)
+K( 2)*K( 3)*S(2)*K( 9)*K(10)+K( 2)*K( 3)*S(2)*K( 6)*K(10)
+K( 2)*K( 3)*S(2)*K( 8)*K(10);
NODO(03)=NODO(03)+K( 1)*S(1)*K( 7)*S(1)*K( 9)*K(10)+K( 1)*S(1)
*K( 7)*S(1)*K( 6)*K(10)+K( 3)*S(2)*K( 7)*S(1)*K( 6)*K(10)
+K( 1)*S(1)*K( 4)*K( 9)*K(10)+K( 1)*S(1)*K( 4)*K( 6)*K(10)
+K( 1)*S(1)*K( 4)*K( 8)*K(10);
NODO(04)=NODO(04)+K( 1)*S(1)*K( 7)*S(1)*K( 5)*S(2)*K(10)
+K( 3)*S(2)*K( 7)*S(1)*K( 5)*S(2)*K(10)+K( 1)*S(1)*K( 4)
*K( 5)*S(2)*K(10)+K( 2)*K( 3)*S(2)*K( 7)*S(1)*K(10);
NODO(05)=NODO(05)+K( 3)*S(2)*K( 7)*S(1)*K( 5)*S(2)*K( 7)
+K( 2)*K( 3)*S(2)*K( 7)*S(1)*K( 9)+K( 1)*S(1)*K( 7)*S(1)
*K( 5)*S(2)*K( 9)+K( 1)*S(1)*K( 4)*K( 5)*S(2)*K( 9);
DENOM=DENOM+NODO(01)+NODO(02)+NODO(03)+NODO(04)+NODO(05);
NUMER=NUMER+NODO(01)*K( 3)*S(2)-NODO(02)*K( 4)+NODO(03)*K( 5)
*S(2)-NODO(04)*K( 6);
VELOC=NUMER/DENOM;
    
```

Fig. 4.4 Continuación.

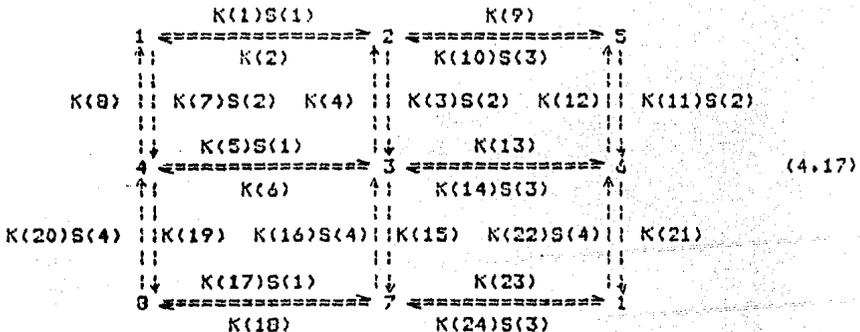
La ecuación de restricción reportada debido a la reversibilidad microscópica es:

$$k_{1k}3k-2k-4 = k-1k-3k.2k4 \tag{4.16}$$

Una vez más se puede demostrar por comparación, haciendo los cambios debidos en la notación, que el resultado del programa es igual al reportado en la literatura.

c) Mecanismo hipotético

El siguiente mecanismo se planteó para demostrar la técnica de generación de ecuaciones de restricción.



Los datos de entrada al programa y los resultados se presentan en las figuras 4.5 y 4.6, respectivamente

12	8				
1	1	2	K(1)	S(1)	K(2)
2	2	3	K(5)	S(1)	K(4)
3	4	3	K(5)	S(1)	K(6)
4	1	4	K(7)	S(2)	K(8)
5	2	5	K(9)		K(10) S(3)
6	5	6	K(11)	S(2)	K(12)
7	3	6	K(13)		K(14) S(3)
8	3	7	K(15)		K(16) S(4)
9	8	7	K(17)	S(1)	K(18)
10	4	8	K(19)		K(20) S(4)
11	6	9	K(21)		K(22) S(4)
12	7	9	K(23)		K(24) S(3)

Fig. 4.5 Datos descriptivos del mecanismo 4.17 para el programa del Apéndice III.

En este caso se generaron el mismo número de ecuaciones de restricción, esto es 12, que es el valor reportado. Cabe mencionar que el programa también determina las ecuaciones de restricción fundamentales y las separa del total de ecuaciones obtenidas. Para este ejemplo resultaron 4, que son las últimas que se muestran en la figura 4.6 y que están en función de K(2), K(14), K(18) y K(22).

```

T(01)=(K( 1)/K( 2))*K( 3)/K( 4))*K( 6)/K( 5))*K( 8)/K( 7));
T(02)=(K( 1)/K( 2))*K( 9)/K(10))*K(11)/K(12))*K(14)/K(13));
T(02)=T(02)*K( 6)/K( 5))*K( 8)/K( 7));
T(03)=(K( 3)/K( 4))*K(13)/K(14))*K(12)/K(11))*K(10)/K( 9));
T(04)=(K( 1)/K( 2))*K( 9)/K(10))*K(11)/K(12))*K(21)/K(22));
T(04)=T(04)*K(24)/K(23))*K(16)/K(15))*K( 6)/K( 5))*K( 8)/
K( 7));
T(05)=(K(13)/K(14))*K(21)/K(22))*K(24)/K(23))*K(16)/K(15));
T(06)=(K( 3)/K( 4))*K(15)/K(16))*K(23)/K(24))*K(22)/K(21));
T(06)=T(06)*K(12)/K(11))*K(10)/K( 9));
T(07)=(K( 1)/K( 2))*K( 3)/K( 4))*K(15)/K(16))*K(18)/K(17));
T(07)=T(07)*K(20)/K(19))*K( 8)/K( 7));
T(08)=(K( 1)/K( 2))*K( 9)/K(10))*K(11)/K(12))*K(14)/K(13));
T(08)=T(08)*K(15)/K(16))*K(18)/K(17))*K(20)/K(19))*K( 8)/
K( 7));
T(09)=(K( 1)/K( 2))*K( 9)/K(10))*K(11)/K(12))*K(21)/K(22));
T(09)=T(09)*K(24)/K(23))*K(18)/K(17))*K(20)/K(19))*K( 8)/
K( 7));
T(10)=(K( 5)/K( 6))*K(13)/K(14))*K(21)/K(22))*K(24)/K(23));
T(10)=T(10)*K(18)/K(17))*K(20)/K(19));
T(11)=(K( 3)/K( 4))*K( 6)/K( 5))*K(19)/K(20))*K(17)/K(18));
T(11)=T(11)*K(23)/K(24))*K(22)/K(21))*K(12)/K(11))*K(10)/
K( 9));
T(12)=(K( 5)/K( 6))*K(15)/K(16))*K(18)/K(17))*K(20)/K(19));
NUC=12;
NCON=04;
IPK( 2)=1;
IPK(14)=1;
IPK(22)=1;
IPK(18)=1;
K( 2)=K( 1)*K( 8)/K( 7))*K( 6)/K( 5))*K( 3)/K( 4));
K(14)=K(13)*K( 3)/K( 4))*K(10)/K( 9))*K(12)/K(11));
K(22)=K(21)*K(11)/K(12))*K( 9)/K(10))*K( 6)/K( 5));
K(16)=K(15)*K(24)/K(23));
K(18)=K(17)*K(19)/K(20))*K( 6)/K( 5))*K(16)/K(15));

```

Fig. 4.6 Ecuaciones de restricción del mecanismo 4.17 generadas por el Programa del Apéndice III.

Los resultados del programa para generar ecuaciones de velocidad y de restricción son idénticos a los reportados en la literatura en los ejemplos citados. Esto es cierto, siempre y cuando, los datos de entrada describan exactamente el mecanismo bajo consideración, ya que de otra manera se generan ecuaciones incorrectas que no describen el fenómeno, o bien, el programa envía mensajes de que los datos de entrada son incorrectos.

C A P I T U L O V

CONSTANTES DE VELOCIDAD

La descripción cinética de un mecanismo enzimático, demanda no solamente el establecimiento de la topología de interconversiones entre las especies enzimáticas, sino también la evaluación de las constantes de velocidad elementales para esas interconversiones. Sin el completo conocimiento de las constantes de velocidad elementales, el mecanismo de reacción puede ser discutido en términos de varias especies enzimáticas y su química de proteínas, pero nunca cuantitativamente. En este capítulo se examinarán las tres formas experimentales para la evaluación de constantes de velocidad: Cinética de estado transitorio, Cinética de relajación, y Cinética de estado estable.

Un aspecto importante a considerar en la determinación de constantes de velocidad, es el hecho de que varía con cambios de los factores ambientales, especialmente con la temperatura y el pH. Se considerará también la influencia de tales factores en las constantes de velocidad.

En la segunda parte del capítulo se describen los métodos numéricos de que se dispone, para obtener las constantes a partir de los datos experimentales de velocidad de reacción y concentración de reactivos y/o productos.

- I. Métodos experimentales
- 1. Cinética de estado estacionario
- 1.1 Métodos de flujo

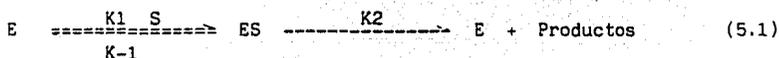
El método usual para medir la velocidad de una reacción química es el de mezclar soluciones separadas de los reactivos y medir el progreso de la reacción, por medio de muestreo discreto o continuo de la mezcla de reacción. La mezcla lenta (relativa a la vida media de la reacción) no permite hacer mediciones al inicio del proceso, por lo que la velocidad a la cual el mezclado puede ser llevado a cabo, establece un límite superior a los pasos de velocidad de reacción que puedan ser aislados y medidos de esta manera. El mezclado de dos soluciones por métodos manuales como regla general 2 o más segundos, lo cual es mucho más lento que el tiempo que toman algunos pasos de reacción enzimática en llevarse a cabo. Este tipo de mediciones, pudieron ser practicadas hasta que Hartridge y Roughton, introdujeron el uso de técnicas de flujo para análisis de reacciones rápidas.

Existen dos tipos de técnicas de flujo. En la técnica original de flujo continuo, las soluciones de enzima y sustrato son forzadas a pasar dentro de una cámara de mezclado a alta velocidad y la mezcla de reacción fluye de la cámara a un tubo de observación. El tiempo requerido por la mezcla para alcanzar cualquier punto a lo largo del tubo, depende de la longitud de la cámara de mezclado y de la velocidad de flujo. El progreso de la reacción sobre un intervalo de milisegundos puede ser monitoreado, tanto por observación en diferentes puntos a lo largo del tubo a una velocidad de flujo, o por observación en un solo punto a diferentes velocidades de flujo. En la técnica-

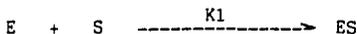
de flujo detenido, desarrollada por Chance (1954) y por Gibson (1969), la mezcla de reacción es inyectada rápidamente a un tubo de observación y detenida repentinamente. El progreso de la reacción es monitoreado en un solo punto - después de que la mezcla ha sido detenida; la medición rápida de propiedades ópticas o cualquier otra propiedad física del sistema, es posible mediante el uso de un osciloscopio de rayos catódicos. La técnica de flujo continuo, que se basa en el uso de un flujo relativamente prolongado de la mezcla de reacción y que usualmente contiene una concentración alta de enzima, es la más usada. En ambos casos los avances en los diseños de ingeniería de los aparatos de flujo, ha permitido aumentos de velocidad y mezclados más rápidos con una menor turbulencia y con tiempos de resolución que actualmente alcanzan -- los 10 segundos.

1.2 Formación del complejo enzima-sustrato

El mecanismo básico para una reacción de un sustrato consiste de tres pasos elementales, caracterizados por las constantes de velocidad K_1 , $K-1$ y K_2 :



Cuando la relación de sustrato/enzima es alta, el sistema estará en estado estacionario durante la mayor parte del tiempo de reacción. Sin embargo, ya que la enzima existe como E y no como ES antes del mezclado con el sustrato, el sistema atraviesa después del primer mezclado por una fase de estado transitorio, durante la cual, la relación de (ES)/(E) va de cero al valor de estado estacionario. Al inicio del estado transitorio, antes de que se hayan formado cantidades significativas de ES, los pasos $K-1$ y K_2 son despreciables y solamente el paso K_1 es significativo; esto es, el sistema consiste de una reacción de segundo orden:



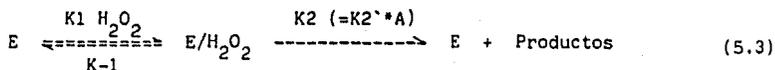
Si alguna propiedad física de la enzima libre o del sustrato libre fue ra lo suficientemente diferente de aquella del complejo enzima-sustrato, como para permitir que el paso de reacción simple sea monitoreado por técnicas de flujo, K_1 podría ser estimado directamente sin interferencias de los pasos -- $K-1$ y K_2 . Una vez que K_1 es obtenido, las otras dos constantes pueden ser estimadas de mediciones de estado estacionario. La ecuación de estado estable para este sistema es:

$$v = \frac{K_2 (E)_0 * S}{S + K_m}$$

$$K_m = \frac{K-1 + K_2}{K_1} \quad (5.2)$$

Así K_2 puede ser calculada por medio de la velocidad de saturación -- $K_2(E)_0$. Conociendo K_1 y K_2 , $K-1$ puede ser calculada de K_m .

El estudio de Chance (1943) del mecanismo de la peroxidasa (5.3), ilustra este procedimiento para medir constantes de velocidad.



La peroxidasa es una enzima que forma una solución roja, cambia su espectro de absorción drásticamente por la combinación con H_2O_2 , por lo que $K1$ puede ser estimada de observaciones rápidas de este paso de combinación. Más aún, el complejo E/H_2O_2 es medible a través de la reacción y $K2$ (o más precisamente $K2 \cdot A$, ya que en este caso es una constante de pseudo primer orden, que incluye la concentración de algún donador de hidrógeno A , tal como el ver de de leucomalaquita) puede ser estimada directamente de la relación.

$$\frac{d(\text{producto})}{dt} = K2 (E/H_2O_2)$$

La verificación de esta relación para este sistema y la concordancia del estimado de $K2$ entre el estado transitorio y el estado estable, dió una fuerte evidencia para la teoría general, de que el complejo enzima-sustrato era un intermedio obligatorio en la catálisis enzimática.

1.3 Formación del producto de reacción.

La formación del producto de reacción puede ser monitoreada durante el estado transitorio, por medio de técnicas de flujo. Para el mecanismo (5.1), la velocidad de cambio de (ES) es

$$\begin{aligned} \frac{d(ES)}{dt} &= K1 S (E) - (K-1 + K2)(ES) \\ &= K1 S (E)_o - (ES) - (K-1 + K2)(ES) \\ &= K1 S (E)_o - (K1 + K-1 + K2)(ES) \end{aligned} \quad (5.4)$$

La velocidad de formación del producto de reacción P es

$$\frac{dP}{dt} = K2(ES) \quad (5.5)$$

y entonces:

$$\frac{d^2P}{dt^2} = K2 \frac{d(ES)}{dt} \quad (5.6)$$

Sustituyendo las ecuaciones (5.5) y (5.6) en (5.4), se puede eliminar (ES), por lo que:

$$\frac{d^2P}{dt^2} + (K1S + K-1 + K2) \frac{dP}{dt} - K2K1S(E)_o = 0 \quad (5.7)$$

Si se emplea una alta relación $S/(E)_o$, sería consumido relativamente poco sustrato a través del estado estacionario, así que S permanecería muy cercano al valor de S_o al inicio o tiempo cero. Dada esta condición, la ecuación (5.7) va a ser una ecuación diferencial de segundo orden con coeficien-

cientes constantes. Su solución es:

$$P = P_0 + \frac{K_2 K_1 S_0(E) o t}{K_1 S_0 + K_{-1} + K_2} + \frac{K_2 K_1 S_0(E) o}{(K_1 S_0 + K_{-1} + K_2)^2} (e^{-(K_1 S_0 + K_{-1} + K_2)t} - 1) \quad (5.8)$$

Si no se adiciona producto al inicio de la reacción, P_0 es igual a cero en la ecuación (5.8). Además el término exponencial puede ser expandido en series de potencias en su forma estandar

$$e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots + \frac{x^n}{n!} + \dots \quad (5.9)$$

Esta serie de potencias disminuye rápidamente en el estado estacionario cuando t es pequeña. Sustituyendo solamente sus primeros tres términos en la ecuación (5.8), la reduce en

$$P = \frac{K_1 K_2 S_0(E) o t^2}{2} \quad (5.10)$$

Así el producto de reacción se acumula exponencialmente con t_2 en la fase temprana del estado estacionario (Fig. 5.1) y graficando P vs t^2 resulta una gráfica lineal cuya pendiente es igual a $K_1 K_2 S_0(E) o / 2$. Con K_2 obtenible de la velocidad de saturación del estado estable, K_1 puede ser calculada de esta pendiente. Una vez que K_1 y K_2 son conocida, K_{-1} es obtenible de la K_m de estado estacionario (ecuación 5.2).

Posteriormente, según t se incremente, el término exponencial en la ecuación (5.8) se convierte en despreciable y el sistema formalmente pasa de estado transitorio a estado estable. Por lo que la ec. (5.8), suponiendo que $P_0=0$, se reduce a:

$$P = \frac{K_2 K_1 S_0(E) o t}{K_1 S_0 + K_{-1} + K_2} - \frac{K_2 K_1 S_0(E) o}{(K_1 S_0 + K_{-1} + K_2)^2} \quad (5.11)$$

Por lo tanto, P se acumula ahora linealmente con el tiempo (Fig. 5.1). La extrapolación de esta región lineal interseca el eje t en t de retraso. Dado que la concentración es cero en el eje de t , el valor de t de retraso satisface la ecuación (5.12).

$$\frac{K_2 K_1 S_0(E) o t_{ret}}{K_1 S_0 + K_{-1} + K_2} - \frac{K_2 K_1 S_0(E) o}{(K_1 S_0 + K_{-1} + K_2)^2} = 0 \quad (5.12)$$

que resultaría en

$$t_{ret} = \frac{1}{K_1 S_0 + K_{-1} + K_2} \quad (5.13)$$

Si la concentración del sustrato es elevada a un nivel de saturación, esto se reduce a

$$t_{ret} = \frac{1}{K_1 S_0}$$

Por lo que, como sugirió Gutfreund (1955), t de retraso obtenida a niveles de saturación de sustrato da otra ruta para la estimación de K_1 durante el estado transitorio.

Las ecuaciones de estado estacionario de mecanismos más complejos han sido tratadas generalmente por Darvey (1968) y por Hijazi y Laidier (1973).- Darvey demostró que t de retraso es independiente de la concentración de enzima y que es expresable por una relación entre dos polinomios de concentración.

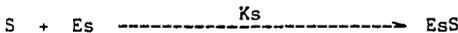
$$t = \frac{m_z S^z + m_{z-1} S^{z-1} + \dots + m_1 S + m_0}{d_z S^z + d_{z-1} S^{z-1} + \dots + d_1 S + d_0}$$

Todos los coeficientes d son del mismo signo, pero el signo de las m varía. Más aún, la t de retraso puede ser tanto negativa como positiva, como fue observado por Ouellet y Stewart (1959).

Hijazi y Laidier demostraron que las ecuaciones para una variedad de mecanismos de uno y dos sustratos y de inhibición, obedecían la forma general de

$$P = \sum_{i=1}^n B_i e^{-\lambda_i t} - \sum_{i=1}^n B_i$$

donde v es la velocidad de estado estable y el número de términos exponenciales es igual, al número de especies enzimáticas en el mecanismo, diferentes a la enzima libre; la suma de los exponentes, $\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots + \lambda_n$, es igual a todas las líneas de reacción en el mecanismo (por ejemplo, - todas las constantes de velocidad monomolecular y todas las constantes bimoleculares, cada una multiplicada por su ligando no enzimático asociado). - - Esta ecuación, que ha sido aplicada a la quimiotripsina, fosfatasa alcalina y a la miocina, da un procedimiento general para estimar constantes de velocidad bimoleculares. Cuando un ligando S reaccione con una sola especie enzimática en el mecanismo, en un paso bimolecular K_s , por ejemplo:



la constante K_s será obtenible de la pendiente de la gráfica lineal derivada de $(\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \dots + \lambda_n)$ vs S .

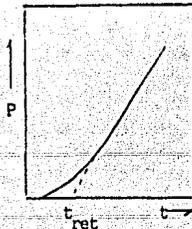


Fig. 5.1 Formación del producto durante el estado transitorio.

2. Obtención de constantes a partir de cinética de relajación

La posición de equilibrio de cualquier reacción química es determinada por el cambio estándar de energía libre de reacción

$$\Delta G_0 = -Rt \ln K_{eq} \quad (5.14)$$

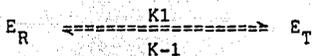
R = constantes de los gases y T = temperatura absoluta

Alguna perturbación en la temperatura o cualquier factor físico que afecte ΔG_0 invariablemente altera la K_{eq} . Consecuentemente, si tal perturbación es impuesta en un sistema de reacción que ha estado en equilibrio, deberá -- haber un cambio químico neto en el sistema, con el fin de obtenerse una nueva posición de equilibrio apropiada. Si la perturbación puede imponerse rápidamente, sería posible seguir la respuesta química o relajación del sistema. En esta base, Eligen (1954) desarrolló una herramienta totalmente nueva para estudiar procesos elementales de velocidad, con un tiempo de resolución, que va de minutos hasta fracciones de nanosegundo.

Varias son las perturbaciones físicas que son útiles en estudios de -- relajación química. Con el fin de incrementar la velocidad, un cambio de -- presión, saltos de temperatura, absorción de ruido y cambio de campo eléctrico son empleados. En la técnica de salto de temperatura, que ha sido ampliamente aplicado a sistemas enzimáticos, una corriente de alto voltaje se descarga a través de una mezcla de reacción que tenga una alta conductancia -- electrolítica. Un salto de varios grados en temperatura puede ser inducido en microsegundos, permitiendo usualmente por -- medios ópticos, la observación de respuesta de relajación en el rango de 10^{-4} a 10^{-5} segundos. La respuesta puede ser grabada con la ayuda de un osciloscopio.

2.1 Reacción de primer orden.

Una relajación química que puede ser tratada simplemente, es la de -- una interconversión reversible entre dos configuraciones de enzima, E_R y E_T :



Inicialmente, el sistema esta en equilibrio a temperatura T. Después de que se cambia a T', la concentración de las dos especies enzimáticas a diferentes tiempos puede ser expresada como:

CONFORMACION ENZIMATICA	CONCENTRACION INICIAL A T	CONCENTRACION FINAL A T'	CONCENTRACION DURANTE LA RELAJACION
R	E_R^0	E_R^{∞}	$E_R^{\infty} + x$
T	E_T^0	E_T^{∞}	$E_T^{\infty} - x$

Durante la respuesta de relajación, la enzima es distribuida entre -- las dos conformaciones, así que x, que es la distancia a la nueva posición -- de equilibrio, es finalmente reducida a cero. En cualquier instante durante la relajación, la ley de acción de masas requiere que

$$\frac{d(E_T^* - x)}{dt} = K_1(E_R^* + x) - K_{-1}(E_T^* - x)$$

o, después de reacomodar

$$\frac{dE_T^*}{dt} - \frac{dx}{dt} = K_1E_R^* - K_{-1}E_T^* + (K_1 + K_{-1})x \quad (5.15)$$

Eventualmente, después de que el equilibrio ha sido reestablecido a la nueva temperatura, el sistema de reacción vuelve a ser estacionario, en el cual se puede escribir

$$\frac{dE^*}{dt} = K_1E^* - K_{-1}E^* = 0$$

En tal caso, estos términos pueden ser eliminados, sin consecuencia, de la ecuación (5.15), obteniéndose solamente

$$-\frac{dx}{dt} = (K_1 + K_{-1})X$$

que después de integrar

$$-(K_1 + K_{-1})t$$

$$X = X^0 e \quad (5.16)$$

En esta expresión, X^0 representa la amplitud de X al inicio de la respuesta, la cual es llamada distancia entre E_R^0 y E_R^* . Con esto en mente, la ecuación (5.16) puede ser reescrita como

$$X = (E_R^0 - E_R^*) e^{-1/t} \quad (5.17)$$

$$\frac{1}{t} = K_1 + K_{-1}$$

El tiempo de relajación τ es el tiempo requerido por X para ser reducido a $1/e$ de su amplitud original (fig. 5.2). Su recíproco da la suma $-(K_1 + K_{-1})$.

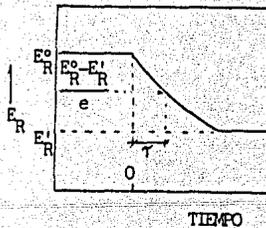


Fig. 5.2 Representación del proceso de relajación.

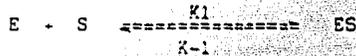
La relación de K_1/K_{-1} es por supuesto la constante de equilibrio a T' :

$$K_{eq} = \frac{E^*}{E_R} = \frac{K_1}{K_{-1}}$$

Conociendo tanto la suma como la relación entre K_1 y K_{-1} , las dos constantes son fácilmente estimadas.

b) Reacción de segundo orden.

Considerando una combinación reversible entre un sustrato y una enzima en la forma:



En cualquier instante durante la relajación, la ley de acción de masas requiere que

$$\frac{d((ES)^* - X)}{dt} = K_1(E^* + X)(S^* - X) - K_{-1}(ES)^* - X$$

o, después de reorganizar

$$\frac{d(ES)^*}{dt} - \frac{dx}{dt} = K_1E^*S^* - K_{-1}(ES)^* + K_1(E^* + S^*)X + K_{-1}X + K_1X^2 \quad (5.18)$$

Nuevamente en el equilibrio estacionario a la nueva temperatura T' , podemos escribir:

$$\frac{d(ES)^*}{dt} = K_1E^*S^* - K_{-1}(ES)^* = 0$$

Retirando estos términos de la ecuación (5.18), obtenemos

$$-\frac{dx}{dt} = (K_1(E^* + S^*) + K_{-1})X + K_1X^2 \quad (5.19)$$

Si X es muy pequeña, el término X puede despreciarse y la integración resulta en:

$$x = (E^0 - E^*) e^{-t/\tau} \quad (5.20)$$

$$\frac{1}{\tau} = K_1(E^* + S^*) + K_{-1}$$

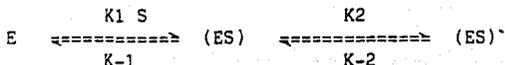
En este caso el tiempo de relajación recíproco es determinado variando linealmente la suma de enzima libre y sustrato libre, la constante bimolecular K_1 está dada por la pendiente de su gráfica lineal y la constante molecular K_{-1} está dada por la intercepción de esta gráfica lineal en el eje $1/\tau$.

La derivación de la ecuación (5.20) requiere la suposición de que X es muy pequeña y por lo tanto, X es despreciable en la ecuación (5.19), en general, la aplicación válida de relajaciones químicas depende de que se trabaje con concentraciones de perturbación, que sean relativamente pequeñas con respecto a las concentraciones totales. Los mecanismos con pasos reversibles múltiples generan tiempos de relajación múltiples. Los diferentes pasos de reacción están acoplados unos con otros, por lo que el aspecto de los tiempos de relajación son, en efecto, valores característicos del sistema de ecuaciones de velocidad.

En el lado experimental, debe ser observado que la extensión a la cual los tiempos de relajación pueden ser resueltos, depende de que tan diferentes sean en magnitud. Y ya que la posibilidad de que resulte una sola solución siempre existe, la detección de un tiempo simple de relajación no es prueba concluyente de que el mecanismo tiene solo un par de pasos reversibles, mientras que la detección de más de un tiempo de relajación sería prueba concluyente de que existen pasos múltiples.

2.2 Isomerización del complejo enzima-sustrato

La cinética de estado estacionario es una herramienta poderosa capaz de delinear la topología de reacciones de diferentes ligandos en un mecanismo, pero es incapaz de detectar la isomerización de complejos centrales enzima-sustrato que no reaccionan con algún ligando. Por lo que las cinéticas de estado transitorio y de relajación deben ser empleadas para estudiar tal isomerización. El modelo más simple para la isomerización de un complejo enzima-sustrato es:



Sus tiempos de relajación τ_1 y τ_2 son las raíces de la ecuación cuadrática (5.21)

$$\begin{aligned} (1/\tau)^2 - (K_1(E + S) + K_{-1} + K_2 + K_{-2})(1/\tau) + \\ + (K_1(E + S) + K_{-1})K_2 + K_{-2} - K_{-1}K_2 = 0 \end{aligned} \quad (5.21)$$

Si la formación inicial de (ES) es mucho más rápida que su isomerización (ES)', la solución a esta ecuación sería:

$$1/\tau_1 = K_{-1} + K_1(E + S) \quad (5.22)$$

$$\frac{1}{\tau_2} = \frac{K_2 K_1 (E + S)}{K_1 (E + S) + K_1} + K_{-2}$$

De las dos, $1/\tau_1$ varía linealmente con (E+S), mientras que $1/\tau_2$ varía hiperbólicamente con (E+S). Este último tipo de comportamiento hiperbólico es ejemplificado con las observaciones de Hammes y Hurst (1969) en la interacción de la creatinquinasa-ADP (fig. 5.3).

El paso elemental en cinética es algunas veces elemental solamente -- hasta que puede ser resuelto en componentes, lo cual es más elemental. En tales casos el estimado original para la constante de velocidad requeriría interpretación en términos de las constantes para los pasos nuevos. Este proceso continuaría hasta que todo las conformaciones significativas de cada

especie enzimática en el mecanismo han sido descritas. Aún así, el paso - (ES) de isomerización podría eventualmente probar ser compuesto.

3. A partir de cinética de estado estacionario.

La ecuación de velocidad (5.2) del mecanismo (5.1) puede ser reescrita para dar:

$$V_s = K_2, \text{ velocidad de saturación por unidad de enzima} \quad (5.23)$$

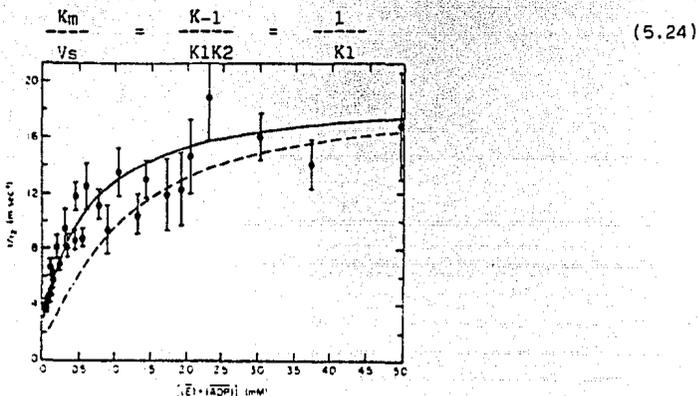


Figura 5.3 Recíproco del tiempo de relajación para las interacciones de la Creatinquinasa-ADP. La curva continua es la línea teórica para la isomerización del complejo enzima-sustrato, la curva punteada es obtenida después de hacer correcciones para la coplación de pasos de reacción.

La ecuación (5.4) primero se transforma en la (5.25) y posteriormente en la ecuación (5.26).

$$\frac{K_m}{V_s} > \frac{1}{K_1} \quad (5.25)$$

$$\frac{V_s}{k_m} < K_1 \quad (5.26)$$

La ecuación (5.23) resulta en K_2 cuando la concentración de enzima es conocida y la ecuación (5.26) de un estimado mínimo de K_1 . En el paso K_1 , la enzima y el sustrato chocan en solución y una fracción de las colisiones producirán un complejo enzima-sustrato. Si esta porción productiva alcanza la unidad, el complejo sería formado tan rápido como las moléculas de enzima-sustrato pudieran difundirse. Bajo estas condiciones se dice que son controladas por difusión. Para una molécula de sustrato pequeña con un coeficiente de difusión de $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ y una molécula de enzima grande con un coeficiente de difusión de $10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$ la K_1 controlada por difusión de espera que sea del orden de 10^9 a $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ la cual representa el tope superior absoluto de K_1 .

Las mediciones de estado estacionario dan solamente K_2 y un estimado - mínimo de K_1 en el caso del mecanismo (5.11), pero dan todas las constantes- (K_1 , $K-1$ y K_2) en el caso del mecanismo del tipo peroxidasa (5.3), donde K_2 - es una constante de pseudoprimer orden. La velocidad de saturación de esta- do estacionario y la constante de Michaelis para este mecanismo son:

$$v_{H_2O_2} = K_2 \cdot A$$

$$K_m^{H_2O_2} = \frac{K_2 \cdot A + K-1}{K_1}$$

Primero, K_2 puede ser determinada de la velocidad de saturación por - unidad enzimática. Dado que $K_m^{H_2O_2}$ se incrementa linealmente con A , con una - pendiente igual a K_2/K_1 , una vez conocida K_2 , K_1 también puede ser obteni- da. Finalmente teniendo K_2 y K_1 , $K-1$ puede ser calculado de $K_m^{H_2O_2}$.

II. Métodos estadísticos

En un experimento típico de cinética se realizan una serie de determi- naciones de velocidad inicial, o V_i , a una serie de concentraciones de algún ligando, X_i , y para obtener información de estos datos existen tres pregun- tas que hay que resolver antes:

1. ¿ Qué forma de modelo matemático (función) puede ser ajustada a los da- tos?.
2. Para un modelo cualquiera, ¿ Cómo pueden ser optimizados los paráme- tros que resulten en el mejor ajuste a los datos?.
3. ¿ Cómo se pueden comparar dos modelos en base a su facilidad de ajus- tar los datos?.

En general, la respuesta a la primera pregunta se guía en cierta mane- ra por consideraciones a priori. Por ejemplo, nuestro conocimiento de la -- teoría cinética de estado estacionario, nos informa de las funciones de velo- cidad que son comunes, esto es: la relación entre dos polinomios de concen- tración de ligandos. Otras formas matemáticas tales como funciones geométri- cas son menos comunes. La tercera pregunta puede ser resuelta solamente des- pués de que la segunda ha sido examinada, ya que dos modelos diferentes pue- den ser comparados si ambos modelos han sido "óptimamente" ajustados a los da- tos. Así, la segunda pregunta necesita ser resuelta a fondo, de tal manera- que podamos estimar a partir de los datos experimentales los parámetros opti- mizados para cualquier modelo bajo consideración. Uno de los métodos más im- portantes para llevar a cabo esto, es el de Mínimos Cuadrados.

4. Mínimos Cuadrados

Tómese por ejemplo, el conjunto de mediciones de velocidad que se en- cuentra en la figura 5.4. Cualquier modelo matemático que sea ajustado a es- tos datos puede ser escrito como:

$$V_t = F(X, \theta_1, \theta_2, \dots, \theta_j) \quad (5.27)$$

En resumen, el modelo supone que la velocidad teórica V_t , es una fun- ción de la concentración del ligando, X , y un conjunto de parámetros. Se -- puede pensar en tres modelos distintos:

$$V_t = \theta_1 + \theta_2 X \quad (5.28)$$

$$V_t = \theta_1 + \theta_2 X + \theta_3 X^2 \quad (5.29)$$

$$V_t = \frac{\theta_1 X}{X + \theta_2} \quad (5.30)$$

La ecuación (5.28) es un modelo lineal, en el que V_t está linealmente relacionado a la concentración de la variable X . Las ecuaciones (5.29) y (5.30) son modelos no lineales ya que V_t no está linealmente relacionado con X . Los parámetros para un modelo lineal son obtenibles por procedimientos de regresión lineal, y aquellos con un modelo no lineal por procedimientos de regresión no lineal. En ambos casos, estimar por el método de mínimos cuadrados, es estimar aquellos valores de los parámetros que minimizan la suma de cuadrados de las desviaciones entre la teoría y los experimentos.

Por ejemplo, en la figura (5.4), las curvas (b) y (c), muestran dos líneas rectas obedecen la ecuación (5.28) pero los estimados numéricos para los parámetros θ_1 y θ_2 no son los mismos para ambas líneas. La desviación residual entre la línea teórica y cada punto experimental que se indica por una línea punteada vertical puede ser representada como:

$$(V_i - V_t)$$

Quando cada residuo es elevado al cuadrado, la suma de estos valores es un criterio útil para juzgar la bondad del ajuste entre los valores teóricos y experimentales. En la figura (5.4), la suma de cuadrados es menor para la línea (c) que para la línea (b), con lo que la línea (c), se dice, que ajusta los datos mejor que la línea (b). El mejor ajuste se obtiene cuando los estimados numéricos de los parámetros θ son encontrados que minimizan la suma residual al cuadrado, esto es

$$\text{Mejor ajuste} = \text{Min} \sum (V_i - V_t)^2 \quad (5.31)$$

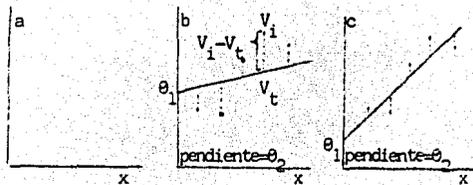


Figura 5.4 Ajuste de datos experimentales a una recta.

El criterio de mínimos cuadrados como se establece en esta ecuación es justificable, si y solo si, son válidos cuatro suposiciones acerca de la naturaleza de los errores experimentales.

1. Cuando una medición es repetida infinitamente, los errores de la media promediarán cero.
2. Los errores deberán ser aleatorios; no deberá haber correlación entre los errores de diferentes puntos experimentales.
3. La varianza deberá ser constante para todas las observaciones; el error aleatorio no deberá estar relacionado a la magnitud de las variables independientes y dependientes.
4. Los errores de las variables independientes son cero, o al menos despreciables en relación a los errores de las variables dependientes.

La suposición 1 usualmente tiene poca importancia. La suposición 2 es inválida siempre que hay desviaciones sistemáticas en el procedimiento experimental, por ejemplo, cuando la enzima sufre desnaturalización en el curso del experimento, de tal manera que las mediciones tomadas en diferentes puntos del experimento no tienen errores comparables. Tal debilidad algunas veces puede resolverse por una planeación cuidadosa del experimento, por ejemplo, tomando aleatoriamente las mediciones de velocidad. Las variables independientes, que son usualmente mediciones de concentración, son generalmente más exactamente obtenidas que las variables dependientes, que son usualmente velocidades o mediciones de unión de ligandos. La suposición 3 posee un gran problema y es generalmente inválido. Si ocurre esto deberán ser compensados -- asignando más ponderación a las mediciones confiables, y menos a las no confiables.

5. Regresión lineal

Con el fin de derivar la fórmula de regresión para calcular los parámetros de la ecuación lineal (5.28), se puede empezar sustituyendo esta en la ecuación (5.31).

$$\text{El mejor ajuste} = \text{Min} \sum (V_i - V_t)^2 = \text{Min} \sum (V_i - \hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2 X)^2 \quad (5.32)$$

donde $\hat{\theta}_1$ es cualquier estimado numérico del parámetro θ_1 y $\hat{\theta}_2$ es cualquier estimado del parámetro θ_2 . La suma de cuadrados varía cuando los dos estimados son variados. En el mínimo, la derivada parcial de la suma de cuadrados con respecto a los dos estimados deberá ser igual a cero:

$$\frac{\partial \sum (V_i - \hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2 X)^2}{\partial \hat{\theta}_1} = -2(\sum V_i - N\hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2 \sum X) = 0 \quad (5.33)$$

$$\frac{\partial \sum (V_i - \hat{\theta}_1 - \hat{\theta}_2 X)^2}{\partial \hat{\theta}_2} = -2(\sum X V_i - \hat{\theta}_1 \sum X - \hat{\theta}_2 \sum X^2) = 0 \quad (5.34)$$

donde N es el número total de puntos experimentales en la sumatoria. La ecuación (5.33) puede ser rearrreglada en

$$\hat{\theta}_1 = \frac{\sum V_i - \hat{\theta}_2 \sum X}{N} \quad (5.35)$$

sustituyendo la ecuación (5.35) en la (5.34) resulta en el estimado de mínimos cuadrados de θ_2 :

$$\hat{\theta} = \frac{\sum (XVi) - ((\sum Vi)(\sum X) / N)}{\sum X^2 - ((\sum X)^2 / n)} \quad (5.36)$$

Sustituyendo el estimado $\hat{\theta}_2$ en la ecuación (5.35) dará el estimado de θ_1 . Las ecuaciones (5.35) y (5.36) no están restringidas a una variación lineal de Vi con X. Son valores generales para cualquier par de variables relacionadas.

6. Regresión no lineal.

En el caso de una regresión no lineal, los estimados de los parámetros del modelo son variados hasta que la suma de residuos al cuadrado es mínima. Tomando como ejemplo, el modelo no lineal de la ecuación (5.30), si θ_1 y θ_2 son válidos, Vt variará causando que la suma de cuadrados también varíe. Así que, la suma de cuadrados tiene la forma de una superficie en el plano θ_1 - θ_2 . Existen muchos algoritmos, o métodos de búsqueda, para obtener el mínimo en esta superficie. Sin embargo, ningún método asegura que el mínimo localizado sea el mínimo global en el espacio total de los parámetros y no tan sólo un mínimo local. Sin embargo, si el ajuste entre la teoría y los experimentos en el mínimo llega a ser satisfactorio, libre de sesgos y si el mismo mínimo es localizado partiendo de un punto inicial diferente y por un método diferente de búsqueda, se puede asumir al menos tentativamente que el mínimo global ha sido localizado. La suposición derivada se fortalece cuando las mediciones experimentales son precisas y cuando el espacio de los parámetros es uniforme y libre de picos singulares.

Método de búsqueda directa.

A) Método de tabulación. Una región posible de la superficie θ_1 - θ_2 , se divide en una red regular o aleatoria y la suma de cuadrados es calculada para cada nodo con el fin de localizar el nodo mínimo. En la búsqueda Fibonacci el espaciado de los puntos de la red es llevada a cabo por medio del uso de los números de Fibonacci. Estos números son generados por la fórmula:

$$F_n = F_{n-1} + F_{n-2}$$

Los números iniciales de esta serie son: 1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21,

B) Métodos lineales. La búsqueda procede a lo largo de un conjunto de vectores direccionales. En el método de variables alternas cada uno de los ejes θ es explorado por turno (Fig. 5.5). Con el método de Powell (1964) un conjunto de direcciones conjugadas es generado para asegurar, para funciones cuadráticas o aproximadamente cuadráticas, la convergencia al mínimo.

C) Métodos secuenciales. Estos métodos son originados a partir del principio de operación evolutiva de Box (1957) y adoptan patrones geométricos para explorar la suma de cuadrados de la superficie. En el método SIMPLEX de Spendley, Hex y Himsworth (1962), la suma de cuadrados es calculada en los tres vértices de un triángulo y el vertice que resulte con el mayor valor es invertido para formar un nuevo triángulo. El proceso es entonces repetido (Fig. 5.6).

Métodos de gradiente

A) Método de pendientes descendentes. En este sistema que fue ideado por Cauchy, en cualquier punto durante la búsqueda, el gradiente de la superficie es calculado y se forma un paso a los largo de la dirección de la pendiente descendente del gradiente. El gradiente es entonces determinado una vez más en la nueva localización y así sucesivamente (fig. 5.7).

B) Método de Newton. Un aproximación de segundo orden de las raíces de Taylor de la suma de cuadrados de la función, guía el descenso. El descenso es eficiente en la vecindad del mínimo pero no a distancia del mínimo. De acuerdo a esto se necesitan buenos estimados iniciales de los parámetros para el procedimiento.

C) Método Davidon. La búsqueda se inicia con pendientes descendentes con respecto a la curvatura de la superficie y finalmente converge hacia el mínimo usando el método de Newton (Davidon 1959). De esta manera la ineficiencia del método de Newton, o del Gauss-Newton, a una cierta distancia del mínimo, puede ser evitada. Una modificación hecha por Fletcher y Power en 1963 mejoró este sistema.

D) Método Marquardt. En cualquier paso de una búsqueda iterativa -- las direcciones de descenso recomendadas por los sistemas de pendiente descendente y de Newton, son generalmente diferentes y pueden ir de 80° a 90° . El algoritmo de Marquardt (1963), es una solución de término medio para interpo- lar entre estas dos direcciones y calcular un tamaño de paso adecuado.

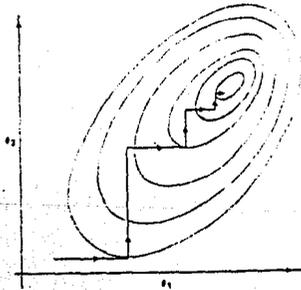


Fig. 5.5 Búsqueda de un mínimo en suma de residuos de cuadrados en la superficie $\theta_1 - \theta_2$ por el método de variable alterna. Cada flecha indica la dirección en un paso de la búsqueda.

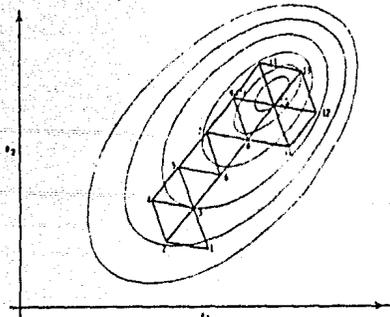


Fig. 5.6 Búsqueda por el método SIMPLEX.

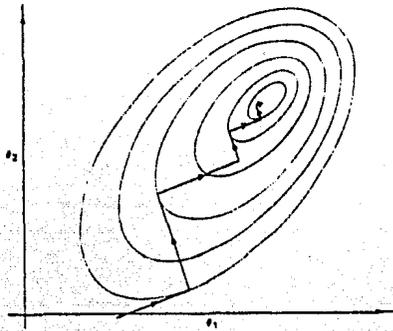


Fig. 5.7 Búsqueda por el método de pasos descendentes.

En general cada método de búsqueda es de uso específico para un tipo de problema de optimización.

Por otro lado muchos de los algoritmos de búsqueda están diseñados para optimizar sin restricciones, donde los parámetros a optimizar pueden variarse independientemente y libres de restricción. Los algoritmos más complicados son más frecuentemente necesarios para manejar optimizaciones con restricción, en donde los parámetros deben satisfacer alguna restricción externa. Sin embargo, los algoritmos más simples deben ser totalmente explorados antes de proceder a usar los más complicados. Y ya que las funciones de velocidad y unión enzimática son en general regulares y libres de picos singulares, aún las pruebas más simples pueden ser completamente satisfactorias. Por ejemplo, en el mecanismo de la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (Capítulo IV) las ocho constantes de velocidad para la unión al azar de NAD+ y etanol a la enzima, deben de satisfacer la restricción impuesta por la reversibilidad microscópica, esto es:

$$k_{13}k_{24} = k_{12}k_{34}$$

Esta restricción no permite la convergencia en búsquedas simples. Sin embargo, retirando la restricción durante las primeras etapas de la búsqueda y reimponiendo la restricción en los pasos finales, la convergencia puede ser alcanzada por una combinación simple de búsquedas de variables alternadas y tabulación.

7. Ponderación y Precisión

Usando el criterio de mínimos cuadrados, como base para regresión lineal o no lineal, la suposición presupone que el error experimental no está relacionado con la magnitud de las variables independientes o dependientes. Esto generalmente no está soportado y por razones técnicas los errores de las mediciones de velocidad a concentraciones altas de ligando pueden ser ligeramente diferentes en carácter, de aquellas a baja concentración de ligando. Un entendimiento de la estructura del error hace que se de más peso a las mediciones confiables y menos a las no confiables. En general, si se mide la velocidad de reacción a concentraciones fijas de ligando varias veces, las mediciones no son idénticas.

Debido a la dispersión aleatoria, los resultados se distribuyen sobre un rango discreto. La estadística básica de tal distribución es:

Número de mediciones = N

Promedio de la muestra $\bar{v} = \frac{\sum v_i}{N}$

Varianza de la muestra $s^2 = \frac{\sum (v_i - \sigma)^2}{N - 1}$

Desviación estandar de la muestra $s = \sqrt{\frac{\sum (v_i - \sigma)^2}{N - 1}}$

Cuando N llega a ser infinitamente grande, la distribución discreta se comporta como una distribución normal continua, el promedio de la muestra se aproxima a la media M y la varianza de la muestra s^2 se aproxima a la varianza σ^2 .

La varianza es el verdadero indicador de la dispersión experimental. Entre más pequeña es la dispersión, menor será σ^2 , y entre mayor sea, mayor será σ^2 . Sin embargo, entre más nos acerquemos a un número finito de replicas, se tendrá solamente s^2 que puede ser aceptada como un estimador provisional de σ^2 . Entre mayor sea N, mejor será el estimado provisional. Así que, las mediciones duplicadas son necesariamente valiosas para conocer la dispersión de los datos experimentales.

Cuando las mediciones de velocidad son obtenidas a diferentes concentraciones de ligando no se tiene la misma dispersión, por lo que se deberá dar peso a las mediciones confiables. El criterio de mínimos cuadrados establecido en la ecuación (5.31) deberá ser corregido para incluir ponderaciones.

$$\text{El mejor ajuste} = \text{Mín} \sum W_i (V_i - V_t)^2 \quad (5.37)$$

La ponderación W_i deberá ser inversamente proporcional a la varianza, esto es:

$$\text{El mejor ajuste} = \text{Mín} \sum (1 / \sigma^2) (V_i - V_t) \quad (5.38)$$

Si las diferentes V_i tienen un error constante, la σ es constante y la ecuación (5.38) se reduce nuevamente a la ecuación (5.37). Si las diferentes V_i tienen un error relativo constante, σ es proporcional a V_i y la ecuación (5.38) se transforma en:

$$\text{El mejor ajuste} = \text{Mín} \sum (1 / V_i^2) (V_i - V_t) \quad (5.39)$$

En esta ecuación, la ponderación empleada se aumenta como $1/V_i^2$. Sin embargo, las V_i experimentales son de hecho las "verdaderas" V_i , más una cantidad finita de dispersión. Quizas la ponderación debería ser $1/V_t^2$. ¿Realmente, alguna combinación de V_i y V_t sería la mejor?. Se encontró que tanto $1/(V_i + V_t)^2$ y $1/V_i V_t$ daban parámetros de mejor exactitud y precisión. En general, hay dos maneras de decidir si el sistema experimental está caracterizado por error constante o error relativo constante, o una posición intermedia. Primero, al duplicar las mediciones de varias o todas las V_i , pudiera dar estimados de las varianzas de muestra s_i^2 , las cuales a su vez indicarían la naturaleza de las varianzas σ_i^2 . En segundo lugar, en ausencia de duplicación el uso de gráficas residuales, así como de otras rutinas, también -

han sido propuestas. El uso de duplicaciones es en general lo más recomendable, tomando en consideración que las mediciones duplicadas deberán ser hechas siempre que se vaya a realizar regresión con ponderación.

La dispersión experimental siempre afecta la precisión de los parámetros obtenidos de una regresión. En regresión lineal, la varianza total de los puntos experimentales alrededor de la línea ajustada es:

$$s^2 = \frac{\sum (V_i - V_t)^2}{N - J} \quad (5.40)$$

donde N es el número de puntos, J es el número de parámetros 0; y N - J se refiere a los grados de libertad; conociendo S la varianza de los parámetros 0 de la ecuación (5.28), es:

$$s_{\theta_2}^2 = \frac{s^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2} \quad (5.41)$$

$$s_{\theta_1}^2 = s^2 \left(\frac{1}{N} + \frac{\bar{X}^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2} \right) \quad (5.42)$$

donde X es la concentración promedio. La varianza de los parámetros obtenidos de regresión lineal, de esta manera, pueden ser analizados, pero requieren el generar una matriz de información. Un método menos sofisticado es emplear el método de análisis de sensibilidad desarrollado en investigación de operaciones. Cada parámetro optimizado es perturbado fuera de su posición óptima y la suma de cuadrados de las desviaciones entre la teoría y los experimentos es analizada como una función de la perturbación. Esto define que tan sensitivo es el parámetro estimado a las perturbaciones, lo que en cada caso define la precisión de la estimación de parámetro en sí.

8. Linearización

Las leyes de velocidad enzimática, son generalmente una relación entre dos polinomios con respecto a la concentración de sustrato y son funciones no lineales. Sus parámetros pueden ser estimados por varios métodos de regresión no lineal. Además, varios métodos cortos, para hacer lineales las funciones, han sido desarrollados con este propósito. Este es especialmente el caso para la hipérbola rectangular simple, por ejemplo:

$$V_0 = \frac{V_s * S}{S + K_m}$$

Esta ecuación tiene la misma forma que la ecuación (5.30). Puede ser linearizada por medio de tres diferentes transformaciones (las nuevas variables son puestas dentro de parentesis):

Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_s} + \frac{K_m}{V_s} \left(\frac{1}{S} \right) \quad (5.43a)$$

Eadie-Hofstee

$$(V_o) = V_s - K_m \left(\frac{V_o}{S} \right) \tag{5.43b}$$

Heanes

$$\frac{S}{V_o} = \frac{K_m}{V_s} + \frac{1}{V_s} (S) \tag{5.43c}$$

Gráficamente, estas transformaciones lineales dan una base para obtener estimados de V_s y K_m . Estadísticamente también, dan una base para estimar V_s y K_m por medio de regresión lineal.

Sin embargo, estas ecuaciones transformadas son realmente de la misma forma que la ecuación (5.28), donde las variables dependientes o independientes son verdaderamente separadas unas de las otras. Consecuentemente, cuando estas ecuaciones transformadas son empleadas con propósitos de regresión lineal, se introducen sesgos y se obtienen diferentes estimados de V_s y K_m con las diferentes transformaciones. Se ha demostrado que la transformación de Hanes es más segura que el método de Lineweaver-Burk y con respecto al método de Eadie es linealmente más segura. Esto se presenta cuando los errores son pequeños, pero ocurre lo contrario cuando el error es grande. En el caso de que los errores sean constantes o cuando hubo error relativo constante y la concentración de sustrato fue espaciada armónica o geométricamente, la ecuación de Hanes es la mejor transformación. El caso de la transformación de Eadie es preferible solamente cuando hubo error relativo constante y la concentración del sustrato fue espaciada aritméticamente.

La transformación de Lineweaver-Burk da resultados pobres consistentemente. Así los méritos relativos de las tres transformaciones no son enteramente los mismos cuando son usados estadísticamente, así como cuando son usados gráficamente. Para la detección gráfica de no linealidad la transformación de Eadie es la mejor opción.

Las ecuaciones de velocidad más complejas que las de la hipérbola rectangular de primer orden, no son fácilmente tratadas por regresión lineal. Una excepción importante la constituye el tratamiento de Buntinz y Murpley (1972), de la ley de velocidad de segundo grado

$$V_o = \frac{m_2 S^2 + m_1 S}{d_2 S^2 + d_1 S + d_0} \tag{5.44}$$

En este tratamiento, la expresión de velocidad es dividida totalmente por el coeficiente d para dar:

$$V_o = \frac{a_2 S^2 + a_1 S}{b_2 S^2 + S + b_0} \tag{5.44a}$$

Esta ecuación puede ser acomodada en dos formas alternativas:

$$S + b_2 S^2 - \frac{a_2 S^2}{V_0} = \frac{a_1 S}{V_0} - b_0 \quad (5.45)$$

$$b_2 V_0 = \frac{-V_0(b_0 + S)}{S^2} + \frac{a_1}{S} + a_2 \quad (5.46)$$

En este punto, se introducen tres variables sustitutivas, X, Y y Z.

$$X = \frac{a_1}{S} - \frac{V_0(b_0 + S)}{S^2}$$

$$Y = S + b_2 S^2 - \frac{a_2 S^2}{V_0}$$

$$Z = \frac{S}{V_0}$$

Usando estas variables las ecuaciones (5.45) y (5.46) se transforman a la forma lineal siguiente:

$$Y = a_1 Z - b_0 \quad (5.45a)$$

$$V_0 = \frac{X}{b_2} + \frac{a_2}{b_2} \quad (5.46a)$$

Si se puede hacer un estimado inicial de a_1 y b_0 y aún de X, la regresión lineal por mínimos cuadrados de las mediciones de velocidad en base a la ecuación (5.46a) resultará en estimados de a_2 y b_2 . Utilizando estos últimos estimados para calcular Y, la regresión lineal en base a la ecuación (5.45a) dará mejores estimados de a_1 y b_0 , y así sucesivamente.

Así las ecuaciones (5.45a) y (5.46a) son mutuamente complementarias y continuando las interacciones entre ellas, resultan estimados optimizados de los cuatro valores. Se encontró que los estimados optimizados eran independientes de los valores iniciales cuando se aplicó esta técnica a la Hidrólisis del ácido 2-hipuroxi-DL-isovalínico por la carboxilpeptidasa A.

En principio, aún funciones más complejas que las de segundo grado pueden ser transformadas en lineales. Así la ecuación de velocidad general (5.47) puede ser linealizada como se muestra en la ecuación (5.47A).

$$V_0 = \frac{m_2 S^2 + \dots + m_1 S}{d_2 S^2 + \dots + d_1 S + d_0} \quad (5.47)$$

$$d_2 (V_0 S^2) + \dots + d_1 (V_0 S) = d_0 V_0 - m_2 d^2 - \dots - m_1 S = 0 \quad (5.47A)$$

En el caso de una ecuación como la (5.47A), puede ser tratada por regresión lineal múltiple. Sin embargo, los métodos no lineales son más atractivos para ecuaciones de velocidad de alto grado.

9. Bondad del ajuste

Para cualquier modelo de mecanismo, un ajuste optimizado de mínimos cuadrados entre su ecuación de velocidad y las observaciones experimentales - puede ser obtenido por métodos de regresión, pero el método de mínimos cuadrados en sí no es una base suficiente para establecer claramente los méritos relativos de los diferentes modelos de mecanismos. Además de estos, son requeridos criterios adicionales de la bondad del ajuste. Dentro de estos criterios se han establecido cinco grandes categorías que son:

a). Buen resultado de la regresión lineal; Las ecuaciones de velocidad para algunos modelos de mecanismo en un principio pueden ser linealizados. - La falla de la regresión lineal en tales casos probablemente indicaría que el modelo contiene parámetros redundantes.

b). Buen resultado de la regresión no lineal; Si los métodos de regresión no lineal convergen a un ajuste optimizado para un modelo, pero fallan - para hacerlo con otro, el último modelo sería descartado en favor del primero.

c). Valor de los parámetros; Los modelos que resultan irrazonables - (por ejemplo negativos) o no confiables (por ejemplo, desviaciones estandar - grandes) deberán ser descartados.

d). Distribución de residuos: Los modelos que den desviaciones residuales, entre la teoría y los experimentos, que no esten normalmente distribuidas o que no tengan una media de cero, deberán descartarse.

e). Suma de cuadrado de residuos: La suma de cuadrados de desviaciones residuales no debe ser excesiva, en relación a la varianza de las observaciones experimentales. El modelo que resulta con una suma de cuadrados significativamente menor sería el mejor modelo.

III.- Estimación de parámetros

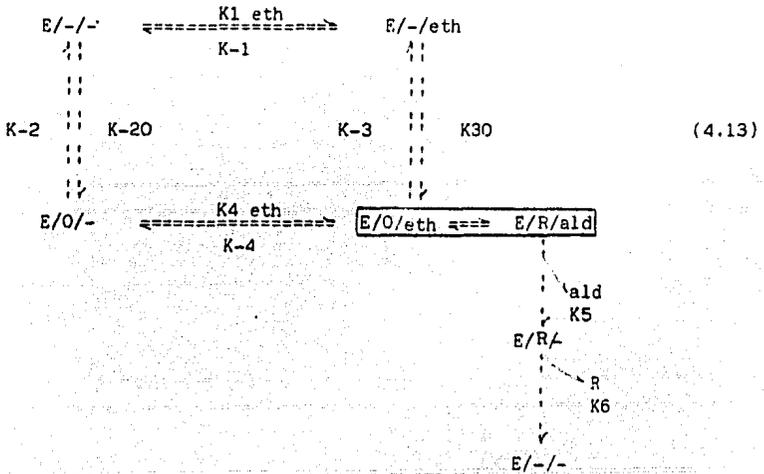
En los Apéndices IV y V se presentan dos programas que estiman las constantes de velocidad para un mecanismo propuesto. El primero de ellos realiza esta tarea mediante el algoritmo PRAXIS y el segundo por el método-SIMPLEX.

El método PRAXIS de optimización es un algoritmo desarrollado para manejar funciones no lineales de varias variables con restricciones; y el método SIMPLEX, como se presenta aquí, trabaja para funciones no lineales de variables, sin restricciones. Una explicación más amplia de los algoritmos - su fundamento se describe en los apéndices correspondientes.

10. Resultados del programa de optimización PRAXIS

Para probar el programa del Apéndice IV se uso el mecanismo para la reacción de la Alcohol Deshidrogenasa de hígado de caballo.

La Alcohol Deshidrogenasa cataliza la reacción de etanol a acetaldehído. El mecanismo propuesto por Hanes y colaboradores (1972), para la reacción en ausencia de producto, es:



donde (eth) = etanol, (ald) = acetaldehído, (O) = NAD⁺ y (R) = NADH.

En el Capítulo IV, este mecanismo se usó para demostrar la utilidad del programa de generación de ecuaciones de velocidad (Apéndice III) y cuyos resultados se muestran en la figura 4.4. Tal y como fue generada, la expresión de velocidad fue incertada en el programa directamente (Ver Apéndice IV). Los datos de concentración de sustratos y velocidad inicial obtenidos de Wong, J.T. (1975).

Para la estimación de las diez constantes de velocidad resultantes del modelo propuesto se hicieron dos corridas: (1) con datos ficticios del valor inicial de las constantes y (2) con datos, resultado del ajuste, reportados por Wong (1975). Para el primer caso los datos iniciales se presentan en la figura (5.8) y para el segundo en la figura (5.9). Los resultados se muestran en las figuras (5.10) y (5.11), respectivamente.

```

10 25 2 ADH PRUE 0
5.0E1
1.0E1
  |
  |
4.9E0
  |
  |
1.71000E-01      7.50000E-03      1.00000E-01
  |                |                |
3.56000E-01      7.50000E-03      1.30000E-01
  |                |                |
6.03000E-01      7.50000E-03      2.00000E-01
  |                |                |
1.06500E+00      7.50000E-03      2.50000E-01
  |                |                |
4.63000E+00      7.50000E-03      3.00000E-01
  |                |                |
4.63000E+00      4.80000E-01      8.20000E-01
  
```

Figura 5.8 Datos para el programa del Apéndice IV. Valores iniciales de las constantes de velocidad ficticios.

10 25 2 ADH PRUE '0

5.2E0
1.9E0
3.7E1
1.6E-1
3.6E2
1.6E1
1.4E1
5.2E1
9.8E1
4.7E0

1.71000E-01	7.50000E-03	1.00000E-01
1.71000E-01	1.60000E-02	1.20000E-01
1.71000E-01	4.30000E-02	1.80000E-01
1.71000E-01	9.60000E-02	2.30000E-01
1.71000E-01	4.80000E-01	2.60000E-01
3.56000E-01	7.50000E-03	1.30000E-01
3.56000E-01	1.60000E-02	2.10000E-01
3.56000E-01	4.30000E-02	2.70000E-01
3.56000E-01	9.60000E-02	3.20000E-01
3.56000E-01	4.80000E-01	3.95000E-01
6.03000E-01	7.50000E-03	2.00000E-01
6.03000E-01	1.60000E-02	3.00000E-01
6.03000E-01	4.30000E-02	3.50000E-01
6.03000E-01	9.60000E-02	4.10000E-01
6.03000E-01	4.80000E-01	5.25000E-01
1.06500E+00	7.50000E-03	2.50000E-01
1.06500E+00	1.60000E-02	3.40000E-01
1.06500E+00	4.30000E-02	4.50000E-01
1.06500E+00	9.60000E-02	5.30000E-01
1.06500E+00	4.80000E-01	6.40000E-01
4.63000E+00	7.50000E-03	3.00000E-01
4.63000E+00	1.60000E-02	4.20000E-01
4.63000E+00	4.30000E-02	6.20000E-01
4.63000E+00	9.60000E-02	7.30000E-01
4.63000E+00	4.80000E-01	8.20000E-01

Figura 5.9 Datos para el programa del Apéndice IV. Valores iniciales de las constantes de velocidad tomados de Wong (1975).

Fig. 5.11 Resultados del programa del Apéndice IV para los datos de la figura 5.9.

PROGRAMA PARA EL ANÁLISIS DE DATOS EXPERIMENTALES DE UN SISTEMA DE UNIDADES

PARÁMETRO	VALOR	UNIDAD	VALOR	UNIDAD
OPCIONES EXPERIMENTALES				
1.27				
1.28				
1.29				
1.30				
1.31				
1.32				
1.33				
1.34				
1.35				
1.36				
1.37				
1.38				
1.39				
1.40				
1.41				
1.42				
1.43				
1.44				
1.45				
1.46				
1.47				
1.48				
1.49				
1.50				
1.51				
1.52				
1.53				
1.54				
1.55				
1.56				
1.57				
1.58				
1.59				
1.60				
1.61				
1.62				
1.63				
1.64				
1.65				
1.66				
1.67				
1.68				
1.69				
1.70				
1.71				
1.72				
1.73				
1.74				
1.75				
1.76				
1.77				
1.78				
1.79				
1.80				
1.81				
1.82				
1.83				
1.84				
1.85				
1.86				
1.87				
1.88				
1.89				
1.90				
1.91				
1.92				
1.93				
1.94				
1.95				
1.96				
1.97				
1.98				
1.99				
2.00				
2.01				
2.02				
2.03				
2.04				
2.05				
2.06				
2.07				
2.08				
2.09				
2.10				
2.11				
2.12				
2.13				
2.14				
2.15				
2.16				
2.17				
2.18				
2.19				
2.20				
2.21				
2.22				
2.23				
2.24				
2.25				
2.26				
2.27				
2.28				
2.29				
2.30				
2.31				
2.32				
2.33				
2.34				
2.35				
2.36				
2.37				
2.38				
2.39				
2.40				
2.41				
2.42				
2.43				
2.44				
2.45				
2.46				
2.47				
2.48				
2.49				
2.50				
2.51				
2.52				
2.53				
2.54				
2.55				
2.56				
2.57				
2.58				
2.59				
2.60				
2.61				
2.62				
2.63				
2.64				
2.65				
2.66				
2.67				
2.68				
2.69				
2.70				
2.71				
2.72				
2.73				
2.74				
2.75				
2.76				
2.77				
2.78				
2.79				
2.80				
2.81				
2.82				
2.83				
2.84				
2.85				
2.86				
2.87				
2.88				
2.89				
2.90				
2.91				
2.92				
2.93				
2.94				
2.95				
2.96				
2.97				
2.98				
2.99				
3.00				
3.01				
3.02				
3.03				
3.04				
3.05				
3.06				
3.07				
3.08				
3.09				
3.10				
3.11				
3.12				
3.13				
3.14				
3.15				
3.16				
3.17				
3.18				
3.19				
3.20				
3.21				
3.22				
3.23				
3.24				
3.25				
3.26				
3.27				
3.28				
3.29				
3.30				
3.31				
3.32				
3.33				
3.34				
3.35				
3.36				
3.37				
3.38				
3.39				
3.40				
3.41				
3.42				
3.43				
3.44				
3.45				
3.46				
3.47				
3.48				
3.49				
3.50				
3.51				
3.52				
3.53				
3.54				
3.55				
3.56				
3.57				
3.58				
3.59				
3.60				
3.61				
3.62				
3.63				
3.64				
3.65				
3.66				
3.67				
3.68				
3.69				
3.70				
3.71				
3.72				
3.73				
3.74				
3.75				
3.76				
3.77				
3.78				
3.79				
3.80				
3.81				
3.82				
3.83				
3.84				
3.85				
3.86				
3.87				
3.88				
3.89				
3.90				
3.91				
3.92				
3.93				
3.94				
3.95				
3.96				
3.97				
3.98				
3.99				
4.00				
4.01				
4.02				
4.03				
4.04				
4.05				
4.06				
4.07				
4.08				
4.09				
4.10				
4.11				
4.12				
4.13				
4.14				
4.15				
4.16				
4.17				
4.18				
4.19				
4.20				
4.21				
4.22				
4.23				
4.24				
4.25				
4.26				
4.27				
4.28				
4.29				
4.30				
4.31				
4.32				
4.33				
4.34				
4.35				
4.36				
4.37				
4.38				
4.39				
4.40				
4.41				
4.42				
4.43				
4.44				
4.45				
4.46				
4.47				
4.48				
4.49				
4.50				
4.51				
4.52				
4.53				
4.54				

En ambos casos el programa converge para los dos conjuntos de datos en un número finito de iteraciones y la bondad del ajuste se puede apreciar en la suma de residuos al cuadrado (suma de diferencias al cuadrado entre las velocidades - experimentales y las calculadas) que se presentan en las figuras (5.12) y (5.13) respectivamente.

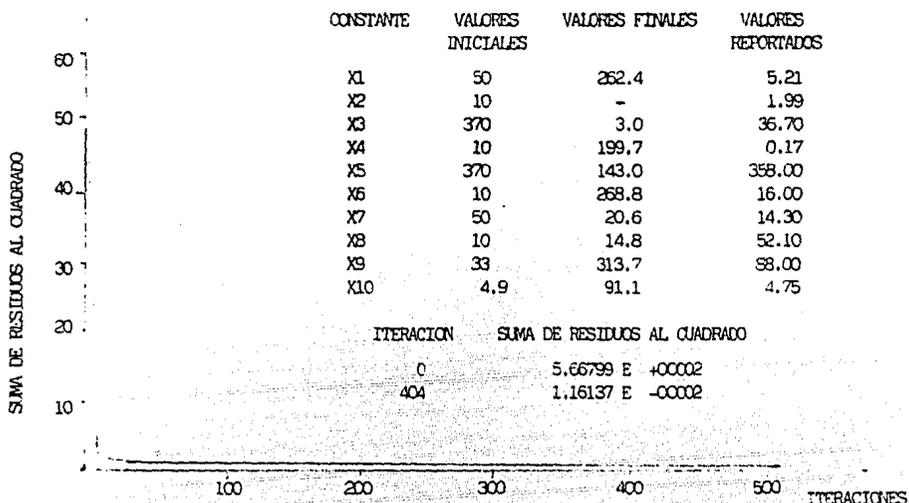


Figura 5.12 Suma de residuos al cuadrado contra número de iteraciones resultado del programa del Apéndice IV. Valores iniciales de constantes de velocidad ficticios.

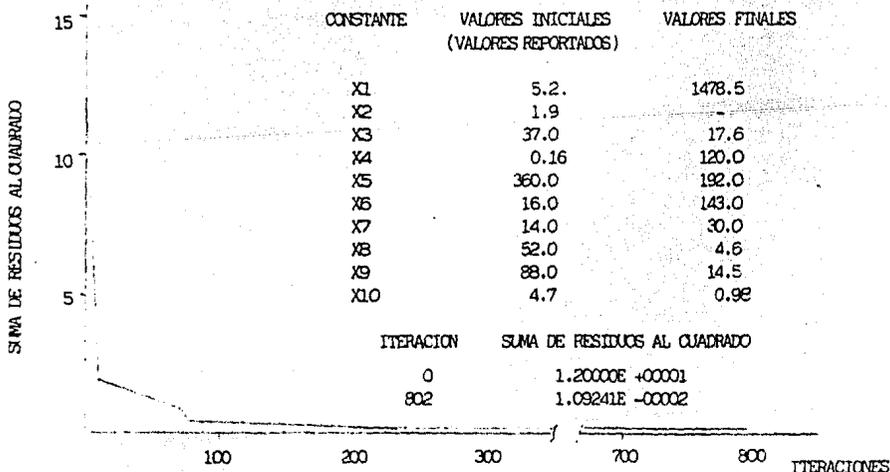


Fig. 5.13 Suma de residuos al cuadrado contra número de iteraciones resultado del programa del Apéndice IV. Valores iniciales de constantes de velocidad tomadas de Wong (1975).

Los resultados demostraron que el sistema posee potencial para el ajuste de ecuaciones de velocidad inicial a datos experimentales. Partiendo de un modelo razonable, el programa del Apéndice III puede generar expresiones de velocidad y de restricción asociadas. Con buenos estimados iniciales el programa del Apéndice IV ajustan los valores de las constantes a una solución posible. Haciendo esto para varios modelos se puede llegar a obtener uno que se ajuste mejor a los datos experimentales o bien se dispone de una herramienta más para comparar varios modelos posibles.

La ventaja de hacer modelos es importante para los investigadores de las reacciones enzimáticas, pero las dificultades inherentes a la mecánica de este proceso no deberán ser despreciadas. Antes de que un sistema como el que se presenta aquí pueda ser utilizado se deberán hacer muchas pruebas preliminares. El usuario deberá tener presente la sensibilidad del método de prueba y el rango de concentraciones de enzima y de productos. La recolección de datos deberá ser muy cuidadosa y las mediciones precisas con determinaciones múltiples sobre amplios rangos de concentración de reactivos. Los modelos seleccionados deberán estar basados en los resultados experimentales encontrados. Y lo que siempre será un problema fuerte, es la selección de valores iniciales de las constantes de velocidad, que si es buena, el sistema convergera y dará soluciones aceptables.

11. Resultados del programa SIMPLEX

Este programa se probó con datos ficticios figura (5.14), únicamente para comprobar su funcionamiento, con la ecuación:

$$V = \frac{X1S2 + X2S1S2 + X3S1S1S3}{1. + X4S1 + X5S1S1 + X6S2 + X7S1S2 + X8S1S1S2}$$

8	0	15		
	1.00000E-05			
	2.50000E+08		1.00000E+06	
	3.50000E+02		1.00000E+01	
	1.00000E+07		5.00000E+05	
	1.00000E+04		5.00000E+02	
	1.00000E+09		1.00000E+07	
	3.60000E+03		1.00000E+02	
	1.00000E+04		5.00000E+02	
	4.00000E+05		5.00000E+03	
	0.60000E-04		0.17125E-01	1.28200E+03
	0.60000E-04		0.97955E-03	1.24900E+03
	0.60000E-04		0.29797E-03	0.77208E+03
	0.60000E-04		0.20002E-03	0.74348E+03
	0.60000E-04		0.10343E-03	0.65770E+03
	0.60000E-04		0.72541E-04	0.61004E+03
	0.60000E-04		0.42059E-04	0.52425E+03
	0.60000E-04		0.25002E-04	0.42417E+03
	0.60000E-04		0.20002E-04	0.39081E+03
	0.60000E-04		0.15070E-04	0.32408E+03
	0.60000E-04		0.10617E-04	0.29549E+03
	0.12000E-02		0.47950E-05	0.99610E+03
	0.12000E-02		0.30820E-05	0.70920E+03
	0.12000E-02		0.15750E-05	0.43300E+03

Figura 5.14 Datos para el programa del Apéndice V.

Los resultados se presentan en la figura (5.16). Su utilidad radica en que puede ser usado para obtener un estimado de las constantes de velocidad para un sistema sin restricciones, o bien, para un sistema con restricciones. En este último caso, las restricciones se dejaron a un lado haciéndose la optimización como si el sistema fuera sin restricciones y una vez obtenido el mejor ajuste, los valores de las constantes de velocidad obtenidas se pueden usar como un valor inicial del programa PRAXIS de optimización con restricciones.

.25000E+09	.10000E+07
.35000E+03	.10000E+02
.10000E+08	.50000E+03
.10000E+05	.50000E+03
.10000E+10	.10000E+08
.36000E+04	.10000E+03
.10000E+05	.50000E+03
.40000E+06	.50000E+04

VALOR DE LA FUN OBJ: .805776E+07

EL MÍNIMO ESTA EN

X (1) =	.2519887E+09
X (2) =	.3792167E+03
X (3) =	.9755176E+07
X (4) =	.1016129E+05
X (5) =	.9298745E+09
X (6) =	.3640655E+04
X (7) =	.1052938E+05
X (8) =	.4033872E+06

EL MÍNIMO ES: .6867982E+07

TAMAÑO DE SIMPLEX = .2891322E+16 INTER. NO= 15

Figura 5.15 Resultados del programa del Apéndice V para los datos de la figura 5.14.

EN EL VALOR DEL PARAMETRO:

.64107E+05	.12820E+04	.15599E-04
.28958E+05	.12490E+04	.34533E-04
.12427E+05	.77208E+03	.80472E-04
.88651E+04	.74348E+03	.11280E-03
.48864E+04	.65770E+03	.20465E-03
.35009E+04	.61004E+03	.28564E-03
.20739E+04	.52425E+03	.48218E-03
.12480E+04	.42417E+03	.80128E-03
.10020E+04	.39081E+03	.99797E-03
.75766E+03	.32408E+03	.13199E-02
.53551E+03	.29549E+03	.18674E-02
.27543E+03	.16440E+04	.36306E-02
.12725E+05	.15060E+04	.78588E-04
.48141E+03	.12058E+04	.20772E-02
.38293E+01	.16585E+04	.26114E+00
.26806E+01	.15300E+04	.37305E+00
.19138E+01	.13730E+04	.52252E+00
.11999E+01	.11440E+04	.83339E+00
.89355E+00	.99610E+03	.11191E+01
.57433E+00	.70920E+03	.17411E+01
.29350E+00	.43300E+03	.34071E+01

Fig. 5.16 Continuación

CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo, se logró plantear la metodología necesaria para la obtención de ecuaciones de velocidad de reacciones enzimáticas y la estimación de las constantes de velocidad asociadas a ellas.

El sistema que se sugiere, demostró su validez en lo que respecta a la obtención de ecuaciones de reacción a partir de mecanismos de acción enzimática propuestos, haciendo uso del método de King-Altman para su derivación.

Los programas de los apéndices I, II y III facilitan mucho esta tarea por el hecho de que su funcionamiento no requiere de información muy elaborada para obtener los resultados deseados, ahorrando mucho tiempo en la derivación de ecuaciones de velocidad y de restricción.

Por otro lado, aunque para el caso de prueba los resultados no fueron muy satisfactorios en la estimación de parámetros (con respecto a los valores reportados), de la Alcohol Deshidrogenasa, el método PRAXIS demostró su utilidad en el manejo de ecuaciones de velocidad (en general no lineales y con restricciones), del tipo de las resultantes para mecanismos enzimáticos, ya que el algoritmo converge en un número finito de iteraciones aún con valores iniciales mal fundamentados.

Sin embargo, en la medida que se conozca la información necesaria del comportamiento del sistema en estudio y se hagan los cambios necesarios en el programa (valores iniciales y máximos de las constantes, precisión y tamaño de variación de los parámetros durante las estimaciones), se podrán obtener buenos resultados en el ajuste de valores experimentales a una ecuación de velocidad dada.

La metodología propuesta representa una herramienta más, en estudios cinéticos, que puede mejorar mucho el conocimiento de un sistema de acción enzimática. Su uso permitirá hacer estudios más profundos, que los comúnmente realizados en el ajuste de datos experimentales a ecuaciones de velocidad simples del tipo de Michaelis-Menten, con lo que se podrán obtener mejores beneficios de los resultados de una investigación, que por su naturaleza requieren de tratamientos más precisos.

A P E N D I C E I

Programa para generar los patrones válidos de King y Altman

El programa se basa en el método expuesto en el Capítulo III, sección 2.2, para generar los patrones válidos de King-Altman haciendo uso del álgebra de Wang.

El programa se compone de un programa principal y dos subrutinas llamadas PRIMGN y FACTOR.

El programa principal: 1) lee los datos del mecanismo; 2) asigna un número primo (generado por PRIMGN) a cada rama; 3) determina el número de ramas que entran a cada nodo, e identifica este número con el vector V para formar un vector EINC con todas las ramas; 4) hace la multiplicación entre sí, de los números primos de $V(i)$ por $V(i+1)$ del vector EINC y forma el vector ICOLKT; 5) compara los valores de ICOLKT entre sí y descarta los elementos que son iguales entre sí; 6) realiza la factorización de los elementos de ICOLKT con la subrutina FACTOR, iniciando el proceso con el número primo de mayor valor asignado a una rama y cuando encuentra el factor que divide exactamente repite la secuencia hasta que la última división es igual a 1 y si dos números primos se repiten en la factorización se eliminan y en caso contrario se almacenan en EINC; 7) se reasigna el número natural que corresponde al número primo. El total de patrones válidos será igual a ITR.

A.1.1 Subrutina PRIMGN.

Genera números primos con el método de la red de Eratostenes. Los números resultan al ir dividiendo una secuencia numérica que se inicia con los números naturales, primero entre 2 con lo que se eliminan aquellos números que resultan con división exacta, luego se repite el procedimiento dividiendo con el valor siguiente a 2 y así sucesivamente para obtener números que solo sean divisibles entre 1 y entre sí mismos; los primeros valores de esta secuencia son:

Inicio con números naturales

1,2,3,4,5,6,7,.....,NF

Se divide entre 2 a partir del tercer número y se eliminan aquellos que resultan con división exacta

1,2,3,5,7,9,11,13,15,17,.....

Se divide entre 3 a partir del cuarto número

1,2,3,5,7,11,13,17,19,23,29,31,35,37,41,.....

Se divide entre 5 a partir del quinto número

1,2,3,5,7,11,13,17,19,23,29,31,37,41,43,47,.....

Se divide entre 7 a partir del sexto número

1,2,3,5,7,11,13,17,19,23,29,31,37,41,43,47,.....

y así sucesivamente.

El criterio de detención se obtiene cuando el número que divide es mayor a la raíz cuadrada de NP. El Programa Principal no hace uso del número 1.

A.1.2 Datos necesarios.

Los datos de entrada se muestran en la tabla A.1, y los diagramas de flujo se presentan en las figuras A1.1, A.1.2, A.1.3.

Tabla A.1.1.

TARJETA	DATO	COLUMNA	COMENTARIO
1	#DE RAMA #DE NODOS	1-2 3-4	NE NV
2	#TOTAL DE RAMAS QUE INCIDEN EN EL NODO # DE LA RAMA QUE INCIDE	1-2 3-4	M+ OIN(J), J= 1,M

(+) Una tarjeta por cada nodo. En total NE tarjetas de este tipo. Es necesario que se pongan en orden iniciando con el nodo 1.

A.1.2 FORMATO DE SALIDA.

El formato general de salida será:

HAY *ITR* ARBOLES PARA ESTA GRAFICA

ESTOS ARBOLES SON LISTADOS A CONTINUACION.

LAS RAMAS QUE LO FORMAN SON:

ITR IIST IIST (*)

(I,J) (I+1,J)(NET,J)

·
·
·
·
·

·
·
·
·
·

(I, ITR).....(NET,ITR)

NOTA: (*) Los datos de este renglón se adicionaron para ser usados como parámetros en el programa del Apéndice III.

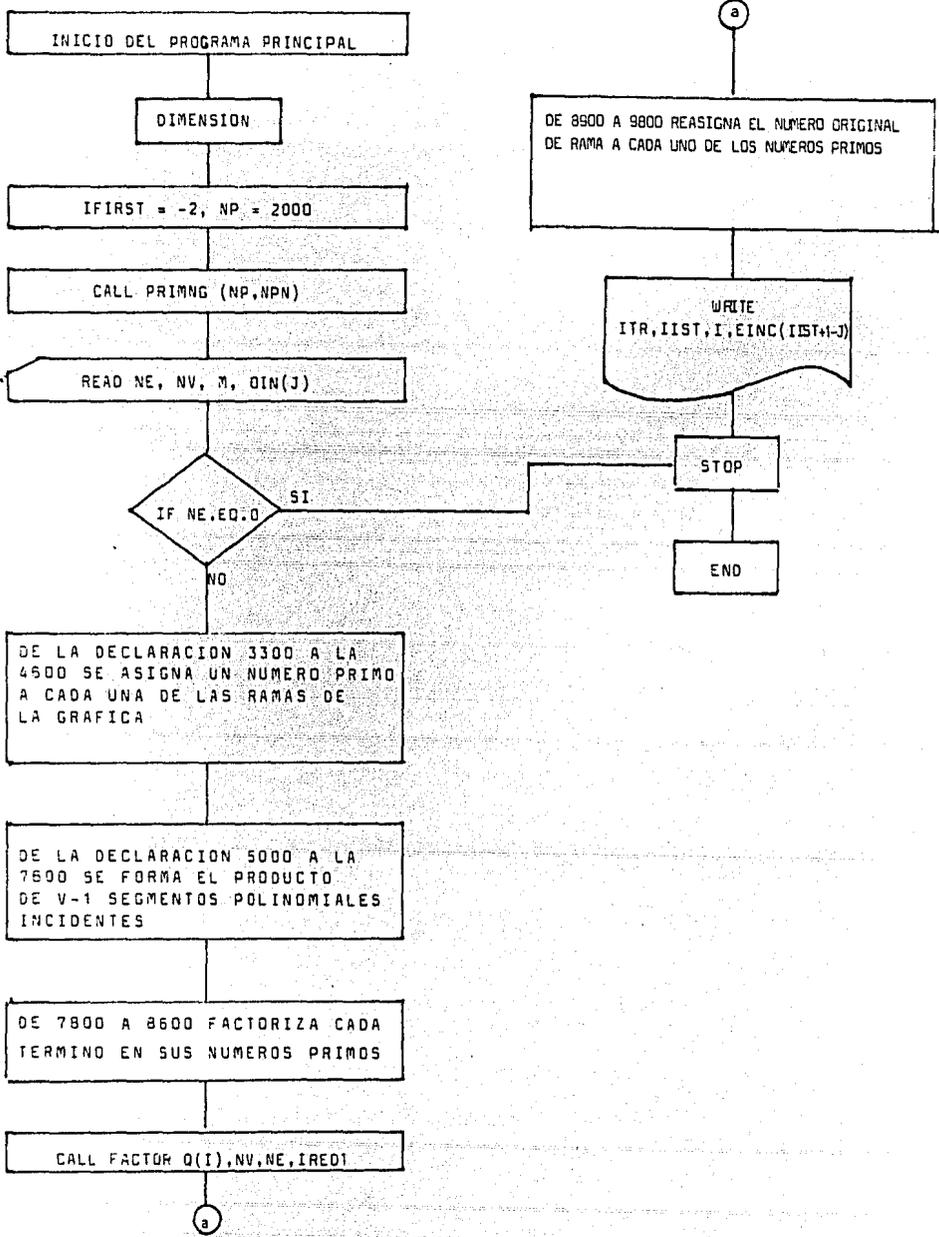


Fig. A 1.3 Diagrama de flujo del programa.

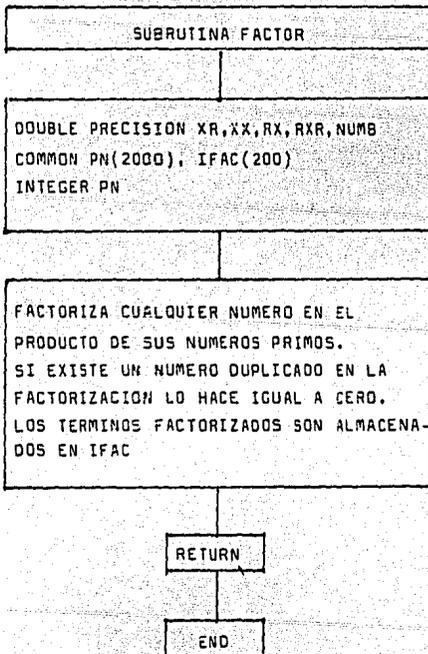
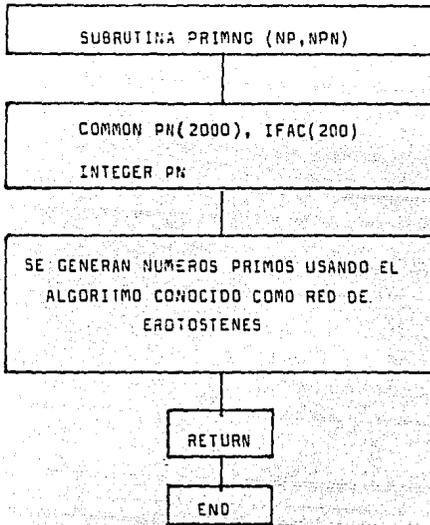


Fig. A 1.3 Continuación. >Listado del Programa del Apéndice I.

```

C *****
C * PRICIPIO DEL PROGRAMA, #
C * ESTE PROGRAMA OBTIENE LOS ARBOLES DE UNA GRAFICA LINEAL.*
C * LA GRAFICA ES LEIDA COMO SE INDICA A CONTINUACION: †
C * PRIMERA TARJETA: * 1-2 NUMERO DE RAMAS EN LA GRAFICA †
C * COL 3-4 NUMERO DE NODOS EN LA GRAFICA, †
C * LAS SIGUIENTES TARJETAS CONTENDRAN LAS RAMAS QUE INCIDEN EN UN*
C * NODO COMO A CONTINUACION SE INDICA: †
C * (NOTA: HAY UNA TARJETA DE DATOS PARA CADA NODO), †
C * TARJETA DE DATOS: COL 1-2 NUMERO DE RAMAS QUE ENTRAN AL NODO, †
C * Y POR CADA PAR SUBSECUENTE DE COLUMNAS ALIMENTAR EL NUMERO †
C † ASIGNADO A CADA RAMA, †
C * EL PROGRAMA REQUIERE DEL USO DE DOS SUBROUTINAS: PRIMGN(GENERA †
C * NUMEROS PRIMOS) E IFACOR(FACTORIZA EL PRODUCTO DE LOS NUMEROS*
C † PRIMOS), †
C *****
FILE 1(TITLE='ARCH/PATRON',KIND=DISK,MAXRECSIZE=15,BLOCKSIZE=2,
1 AREAS=1,AREASIZE=14,SAVEFACTOR=3,NEWFILE=TRUE)
DIMENSION V(99),EINC(15000),OIN(100)
DIMENSION ITRAC(1000),KCOEF(20),INDT(20),ITREE(20)
COMMON PN(2000),IFAC(200)
DOUBLE PRECISION ICOLKT(65000),Q(65000)
INTEGER V,EINC,PN,OIN
IFIRST=-2
NF=2000
C GENERA UN CONJUNTO DE NUMEROS PRIMOS Y ASIGNA UN NUMERO PRIMO
C A CADA UNA DE LAS RAMAS DE LA GRAFICA.
CALL PRIMGN (NF,NPN)
351 READ(5,100,END=350) NE,NV
100 FORMAT(I2,I2)
IF (NE.EQ.0) GO TO 350
IST=0
DO 16 I=1,NV
READ(5,101) M,(OIN(J),J=1,M)
DO 50 J=1,M
IP=OIN(J)+1
50 EINC(J+IST)=PN(IP)
IST=IST+M
16 V(I)=M
101 FORMAT (40(I2))
NT=V(1)
IDEG=V(2)
KK=0
NET=NV-1
NVS=NV-2
C FORMA EL PRODUCTO DE V-1 SEGMENTOS POLINOMIALES INCIDENTES. SI
C CUALQUIERA DE ESTOS TERMINOS EN ESTE PRODUCTO SON IGUALES
C LO DESCARTA.
DO 17 I=1,NT
17 ICOLKT(I)=EINC(I)
IST=V(I)
DO 10 J=1,NVS
DO 11 L=1,NT
DO 11 K=1,IDEG
KK=KK+1
3(KK)=ICOLKT(L)*EINC(IST+K)
11 CONTINUE
NT=KK
IST=IST+IDEG
IDEG=V(J+2)

```

```

DO 12 I=1,NT
12  ICOLNT(I)=Q(I)
    KK=0
10  CONTINUE
    NTCH=NT-1
    DO 35 I=1,NTCH
        MST=I+1
        DO 36 J=MST,NT
            IF (Q(I)-Q(J)) 36,31,36
31      Q(I)=4
            Q(J)=4
36      CONTINUE
35      CONTINUE
        IST=0
        ITR=0
    C   FACTORIZA CADA TERMINO EN SUS NUMEROS PRIMOS.
        DO 20 I=1,NT
            CALL FACTOR (Q(I),NU,NC,IREDT)
            IF (IREDT.EQ.0) GO TO 20
            ITR=ITR+1
            DO 21 J=1,NET
21      EINC(J:IST)=IFAC(J)
            IST=IST+NET
20      CONTINUE
            IIST=IST+NET
    C   REASIGNA EL NUMERO ORIGINAL DE RAMA A CADA UNO DE LOS
    C   NUMEROS PRIMOS.
        DO 51 I=1,ITR
            MS=1
            DO 55 J=1,NET
            DO 52 K=MS,NC
                IF (EINC(IIST+1-J)-PN(K:1)) 52,53,52
52      CONTINUE
53      MS=K+1
55      EINC(IIST+1-J)=K
            IST=IST+NET
51      CONTINUE
    C   ESCRIBE LAS RAMAS DE CADA UNO DE LOS PATRONES.
        WRITE (1,300) ITR
300  FORMAT (' HAY ',I4,' ARBOLES PARA ESTA GRAFICA ',// ' ESTOS ARDOL
SES SON LISTADOS A CONTINUACION',// ' LAS RAMAS QUE LO FORMAN SON:
',//)
        WRITE(1,313) ITR,IIST,IIST
313  FORMAT(3(I5))
    C   DO 70 I=1,ITR
    C   IIST=IIST+NET
    C 70  WRITE(6,302) I,(EINC(IIST+1-J),J=1,NET)
    C 302 FORMAT (' ARDOL',I4,' QUE TIENE LAS RAMAS ',25(2X,I2))
        DO 71 I=1,ITR
            IIST=IIST+NET
71      WRITE(1,301) I,(EINC(IIST+1-J),J=1,NET)
301  FORMAT (4X,I4,25(I4))
        LOCK 1
350  STOP
    C
    C   F I N   D E L   P R O G R A M A .
        END
    SUBROUTINE FACTOR (NUMD,M,N,IREDT)
    C   ESTA SUBROUTINA FACTORIZARA CUALQUIER NUMERO EN EL PRODUCTO DE SUS
    C   NUMEROS PRIMOS. SI EXISTE UN NUMERO PRIMO DUPLICADO EN LA SECUEN-
    C   CIA SERA IGUALADO A CERO. LA SUBROUTINA NO MENCIONA CUAL NUMERO

```

```

C      ESTADA DUPLICADO, SOLAMENTE DARA QUE AL MENOS UNO SE DIFLICO.
C      LOS TERMINOS ENCONTRADOS POR LA FACTORIZACION SON ALMACENADOS
C      EN EL ARREGLO IFAC.
      DOUBLE PRECISION XR,XX,RX,RXR,NUMB
      COMMON PN(2000),IFAC(200)
      INTEGER PN
      II=0
      XR=NUMB
      DO 11 J=1,N
      XX=PN(N+2-J)
      RX=XR/XX
      IXR=RX+.5
      RXR=IXR
17      IF (RX-RXR) 11,20,11
20      XR=RX
      II=II+1
      IFAC(II)=PN(N+2-J)
11      CONTINUE
      IF (XR.EQ.1.0) GO TO 12
      IREDT=0
      RETURN
12      IREDT=1
      RETURN
      END

C
C      SUBROUTINE PRIMON (NP,NPN)
C
C      ESTA SUBROUTINA GENERA NUMEROS PRIMOS USANDO EL ALGORITMO CONOCIDO
C      COMO MCD DE EROTOSTENES.
      COMMON PN(2000),IFAC(200)
      INTEGER PN
      DO 15 I=1,NP
15      PN(I)=I
      DUMB=NP
      ST=SQRT(DUMB)
      IHP=2
      LL=NP
      DIV=2.
11      II=0
      DO 10 I=1,LL
      IF (PN(I)-PN(IHP)) 5,5,6
5      II=II+1
      GO TO 10
6      X=PN(I)/DIV
      LX=X
      RLX=LX
      IF (X-RLX) 1,10,1
1      II=II+1
      PN(II)=PN(I)
10      CONTINUE
      IHP=IHP+1
      DIV=PN(IHP)
      IF (DIV-ST) 3,4,4
3      LL=II
      GO TO 11
4      NPN=II
      RETURN
      END

```

A P E N D I C E II

Programa para el cálculo de patrones válidos por el método del determinante.

El programa que se presenta en este apéndice, permite conocer el número de patrones válidos de Kins-Altman, mediante el método del determinante (Capítulo II, sección 2.2.1).

El programa está codificado en FORTRAN y está formado por un programa principal y una subrutina llamada MINU.

El programa principal: a) toma los datos, que se alimentan y forman la matriz de corte MA, como se menciona en el texto, y b) hace la multiplicación de la matriz de corte por su transpuesta, resultando en un determinante A de $NV \times NV$, donde NV es el número de nodos-1 de la figura que se formó con el mecanismo propuesto. Una vez realizado esto, llama a la subrutina MINU y calcula el valor del determinante por el método de normalización y eliminación de Gauss-Jordan.

Los datos de entrada se muestran en la tabla A 2.1. Los diagramas de flujo del programa y de la subrutina se presentan en las figuras A 2.1 y A 2.2.

Tabla A2.1

TARJETA	DATO	COLUMNA	COMENTARIO
1	# de ramas	1 - 2	NE
	# de nodos-1	3 - 4	NV
2	# de rama	1 - 2	NBR(+)
	nodo de origen	3 - 4	N1
	nodo de arriba	5 - 6	N2

(+) Una tarjeta por cada rama de la figura formada a partir del mecanismo propuesto, en total NE tarjetas de este tipo.

Formato de salida.

La impresión de resultados está formada: 1) por los datos con que se alimentó el programa, y 2) el valor del determinante que se calculó y que es el número de patrones válidos de King-Altman por el método del determinante. El propósito de imprimir los datos de entrada, es con el fin de detectar posibles errores que lleven a malas interpretaciones.

El formato general de salida es:

DATOS DESCRIPTIVOS DEL MECANISMO

NUMERO DE RAMAS = NE

NUMERO DE NODOS - 1 = NV

RAMA # 1: NODO DE ORIGEN = , NODO DE ARRIBO =

⋮

(1 renglon para cada rama alimentada)

⋮

RAMA # NE: NODO DE ORIGEN = , NODO DE ARRIBO =

NUMERO DE PATRONES = D.

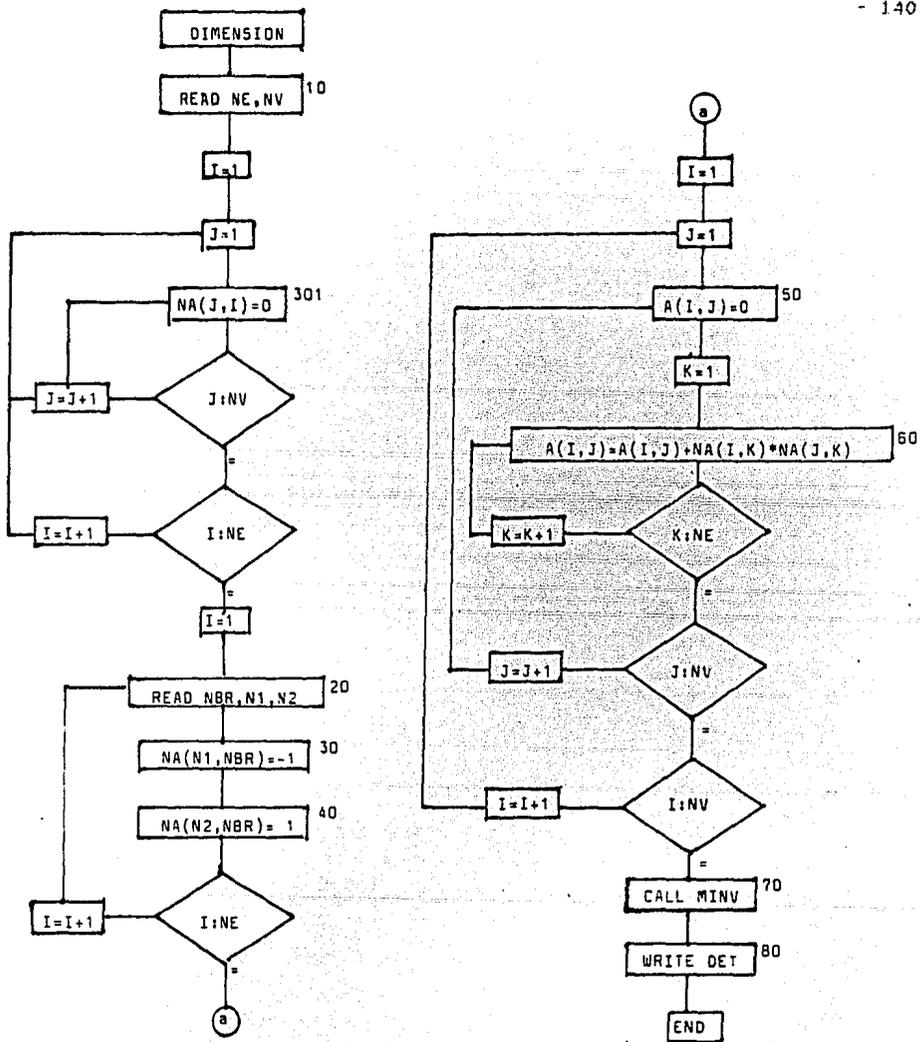


Fig. A 2.1 Diagrams de flujo del Programa Principal del Apéndice II.

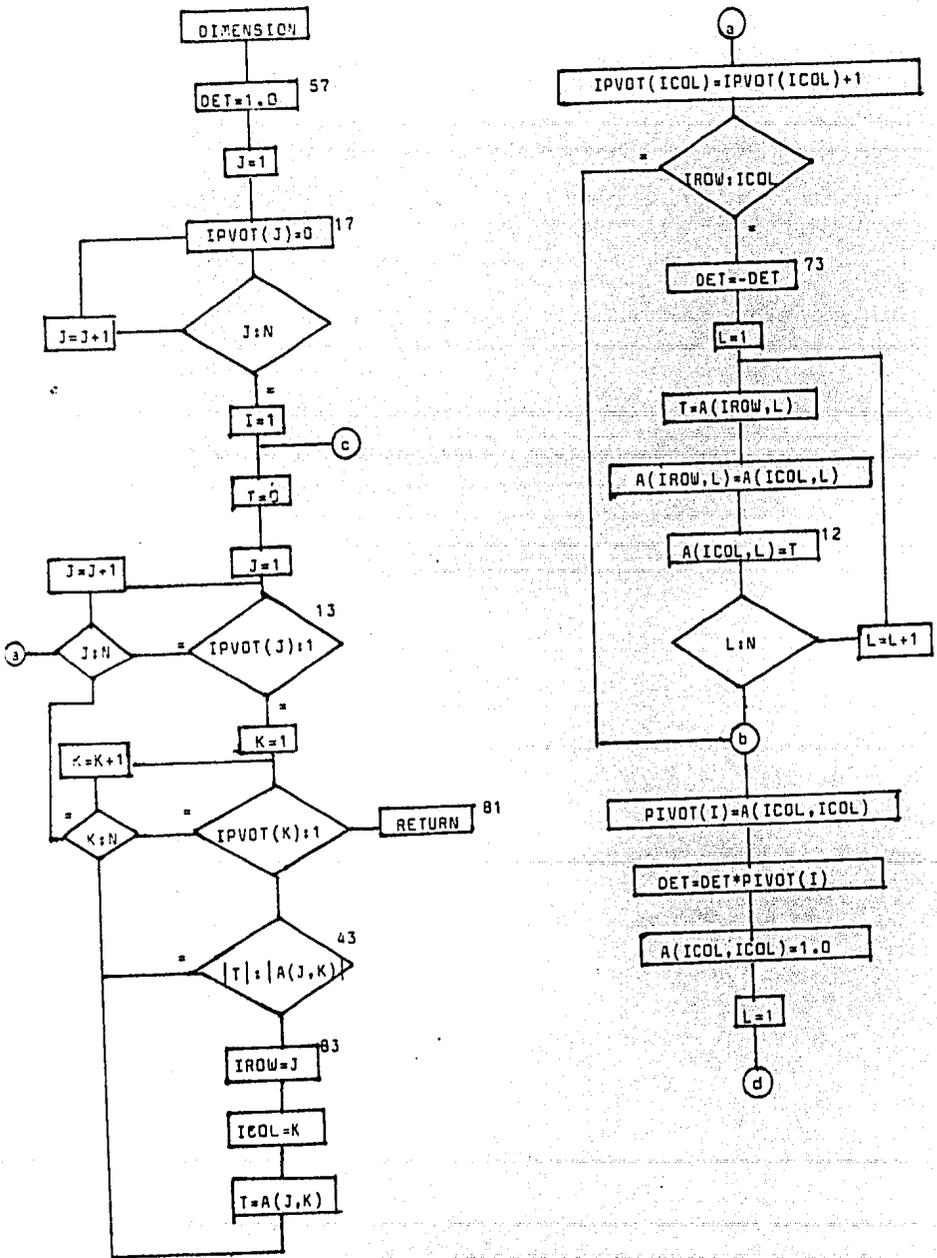


Fig. A 2.2 Diagrama de flujo de la SUBRRUTINA MINU.

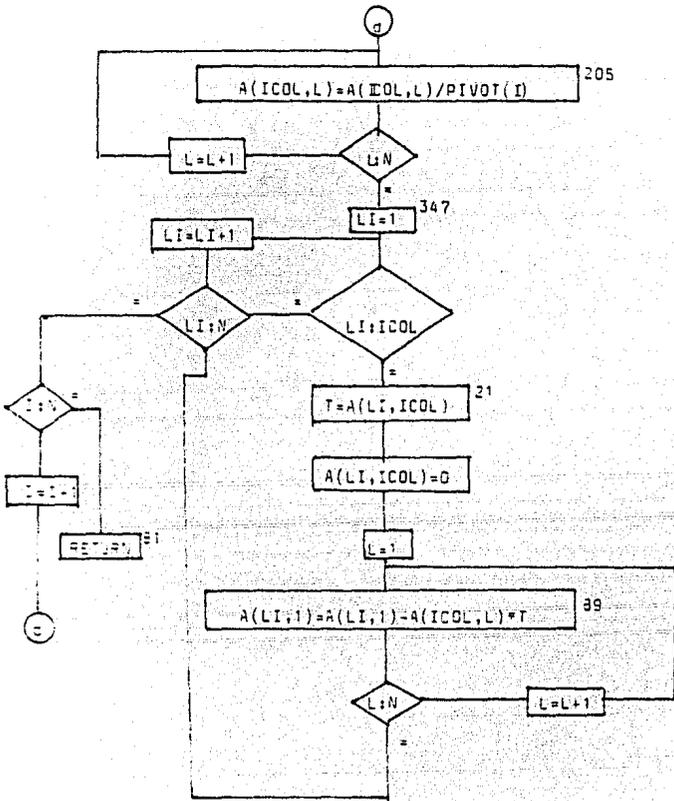


FIG. A 2.2 Continuation.

Listado del programa del Apéndice II.

```

C *****
C * PRINCIPIO DEL PROGRAMA. *
C * *
C * ESTE PROGRAMA CALCULA EL NUMERO DE ARBOLES POR EL METODO *
C * DEL DETERMINANTE. *
C * LA DIMENSION DE LAS MATRICES A, L Y M PUEDE SER CAMBIADA *
C * PARA QUE IT SEA IGUAL A NV, DONDE NV ES EL NUMERO DE NODOS-1 *
C *****
C
C LOS DATOS DE ENTRADA REQUERIDOS EN FORMATO I2 SON:
C 1) NUMERO DE RAMAS, NUMERO DE NODOS-1
C 2) EN TARJETAS SEPARADAS UNA POR CADA RAMA, EL NUMERO DE RAMA
C ASIGNADO, EL NUMERO DE NODO DE DONDE PARTE LA RAMA Y EL
C NUMERO DE NODO A DONDE LLEGA LA RAMA.
C
C
C FILE 1(TITLE='ARCH/DETER',KIND=DISK,MAXRECSIZE=15,BLOCKSIZE=2,
1 AREAS=1,AREASIZE=14,SAVEFACTOR=3,NEWFILE=TRUE)
DIMENSION NA(20,100),A(20,20),L(20),M(20)
READ (5,100) NE,NV
100 FORMAT(I2,I2)
WRITE(1,110)
110 FORMAT(' DATOS DESCRIPTIVOS DEL MECANISMO ')
WRITE(1,115) NE
115 FORMAT('... NUMERO DE RAMAS = ',I2)
WRITE(1,120) NV
120 FORMAT('... NUMERO DE NODOS-1 = ',I2)
DO 301 I=1,NE
DO 301 J=1,NV
301 NA (J,I)=0
DO 200 I=1,NE
READ(5,211) (NBR,N1,N2)
211 FORMAT(40I2)
NA(N1,NBR)=-1
NA(N2,NBR)= 1
WRITE(1,140) NBR,N1,N2
140 FORMAT('... RAMA#',I4,'; NODO DE ORIGEN=',I4,';NODO DE ARRIBO=',I4)
200 CONTINUE
DO 202 I=1,NV
DO 203 J=1,NV
A(I,J)=0
DO 204 K=1,NE
A(I,J)=A(I,J)+NA(I,K)*NA(J,K)
204 CONTINUE
203 CONTINUE
202 CONTINUE
103 FORMAT(')
CALL MINV(A,NV,D)
WRITE(1,104) D
104 FORMAT('... NUMERO DE PATRONES =',F10:0)
LOCK 1
STOP
C FIN DEL PROGRAMA PRINCIPAL,
END
SUBROUTINE MINV (A,N,DET)
C INICIO DE SUBROUTINA
C ESTE SUBPROGRAMA RESUELVE EL DETERMINANTE A

```

```

DIMENSION A(20,20),IPVOT(20),PIVOT(20)
C   LAS 3 SIGUIENTES DECLARACIONES INICIAN EL PROGRAMA
C
57 DET=1.
   DO 17 J=1,N
17  IPVOT(J)=0
   DO 135 I=1,N
C   LAS SIGUIENTES 12 ORDENES BUSCAN EL ELEMENTO PIVOTE
C
      T=0,
      DO 9 J=1,N
      IF(IPVOT(J).EQ.1) GO TO 9
13  DO 23 K=1,N
      IF(IPVOT(K)-1) 43,23,81
43  IF(ABS(T).GE.ABS(A(J,K))) GO TO 23
83  IROW=J
      ICOL=K
      T=A(J,K)
23  CONTINUE
      ? CONTINUE
      IPVOT(ICOL)=IPVOT(ICOL)+1
C   LAS SIG. 3 ORDENES PONEN EN DIAGONAL AL PIVOTE
C
      IF(IROW.EQ.ICOL) GO TO 109
73  DET=-DET
      DO 12 L=1,N
      T=A(IROW,L)
      A(IROW,L)=A(ICOL,L)
12  A(ICOL,L)=T
109 PIVOT(I)=A(ICOL,ICOL)
      DET=DET*PIVOT(I)
C
      A(ICOL,ICOL)=1.
      DO 205 L=1,N
205  A(ICOL,L)=A(ICOL,L)/PIVOT(I)
C
347 DO 135 LI=1,N
      IF(LI.EQ.ICOL) GO TO 135
21  T=A(LI,ICOL)
      A(LI,ICOL)=0.
      DO 89 L=1,N
89  A(LI,L)=A(LI,L)-A(ICOL,L)*T
135 CONTINUE
81  RETURN
C   FIN DE SUBROUTINA
      END

```

A P E N D I C E III

El programa presentado en este apéndice está codificado en lenguaje PL/I y calcula: (1) Los patrones válidos de King-Altman, (2) el número de especies libres en el mecanismo, (3) el número de patrones de King-Altman por el método del determinante (ver Apéndice II), (4) el número y composición de los patrones de King-Altman (ver Apéndice I), (5) las ecuaciones de restricción y (6) la expresión de velocidad del mecanismo propuesto.

El programa de este apéndice se puede dividir en seis partes como se indica a continuación.

- a) De la línea 1 a la 51 se definen las variables a usar y se hace la lectura de una parte de los datos.
- b) De la línea 52 a la 83 se termina la lectura de datos y determina el número de especies libres.
- c) De la línea 84 a la 119 se calcula el número de patrones de King-Altman por el método del determinante (ver Apéndice II).
- d) De la línea 120 a la 239 se determina los patrones válidos de King-Altman por el método Polinomial (ver Apéndice I).
- e) De la línea 240 a la 516 se determina las ecuaciones de restricción para el mecanismo propuesto y
- f) De la línea 516 al final, se calcula la expresión de velocidad para el mecanismo.

Tal como se presenta, el programa puede obtener resultados directamente de mecanismos hasta de 11 ramas, ya que para mecanismos que se excedan de este valor el programa falla por problemas de sobreespecificación al hacer los cálculos de los patrones de King-Altman, deteniéndose al cálculo. El problema radica en que el compilador PL/I del sistema Burroughs (Instalado en la U.N.A.M), está limitado a manejar precisión sencilla.

Para manejar esta limitación, se optó por obtener los patrones de King-Altman y toda la información necesaria que no se puede calcular por el programa de este apéndice, por medio del programa del Apéndice I, que está codificado en lenguaje FORTRAN, lo que permite el manejo de doble precisión. Se alimentan los patrones como datos para obtener la ecuación de restricción y la expresión de velocidad del mecanismo propuesto.

Las capacidades del programa para hacer los cálculos de un mecanismo son:

- a) 25 Ramas máximo.
- b) Número de nodos menor al número de ramas.
- c) 100 Constantes de velocidad.
- d) 10 Sustratos y/o productos.

Los datos de entrada se describen en la tabla A 3.1. Los diagramas de flujo se presentan en la figura A 3.2 y la forma general de escritura de los resultados en la figura A 3.3.

Tabla A 3.1 Datos de entrada al Programa de generación de ecuaciones de velocidad,

Tarjeta	Descripción	Columnas	Campo	Comentarios
1	No. de ramas(b)	1 - 2	Numérico	1 = b = 25
	No. de nodos(n)	4 - 5		1 = n = 25
2	Rama # (b_i)	2 - 3	Numérico	una tarjeta para cada rama o paso de reacción
	"del" nodo #(n_f)	5 - 6		1 = b_i = b
	"al" nodo #(n_t)	8 - 9		1 = n_f = n 1 = n_t = n
	* Constante de vel. de formación	11 - 15	Caracteres K(XX)	un elemento para la variable del arreglo K (la constante de velocidad) donde 1=XX=# de constantes y XX es el número asignado al paso de reacción #
			o en blanco o cero(0)	sí es irreversible Ordinariamente en blanco pero el reactivo correspondiente es indicado
	* Reactivo (usualmente sustrato)	17 - 20	Caracteres S(Y)	Un elemento para la variable del arreglo S donde 1=Y=# de reactivos y Y es el número asignado al reactivo (incluyendo productos)
		o en blanco	Si la constante correspondiente esta en blanco	
**Constante de vel. inversa	22 - 26	Caracteres K(XX)	Ver comentario para constante de formación	
		o en blanco o cero(0)		
**Reactivo (usualmente producto)	28 - 31	Caracteres S(Y)	Ver comentario anterior de reactivo	
		o en blanco		
3	Reactivo seleccionado	1 - 4	Caracteres S(Y)	La ecuación de velocidad sera generada en función de este reactivo
	* La rama b_i abandona el nodo n_f y entra al nodo n_t			
	** La rama b_i abandona el nodo n_t y entra al nodo n_f			

Tabla A 3:1 Continuación.

Nota: si el número de ramas b de la figura geométrica formada a partir del mecanismo propuesto es mayor a 11, se deberán obtener los siguientes datos a partir del programa del Apéndice I y deberán ser insertados a continuación de los datos de la página anterior.

Tarjeta	Descripción	Columnas	Campo	Comentarios
4	# de patrones generados	1 - 5	Número	Patrones válidos de King-Altman
	# total de ramas que forman los patrones	6 - 10	Número	Generalmente es menor al producto de # de patrones por el número de nodos
	Igual al punto anterior	11 - 15	Número	
5	Ramas que forman los patrones	4 espacios por rama	Número	Una tarjeta por patrón

1. Formato general de escritura de datos.

La impresión incluye datos alimentados, número de especies libres, número de patrones por el método del determinante, número de patrones por el método polinomial y las ramas que forman cada uno, ecuaciones de restricción independientes (si existen) y la ecuación de velocidad.

DESCRIPCION TOPOLOGICA DEL MECANISMO ENZIMATICO

NUM DE RAMAS = NBRAN

NUM DE NODOS = NNODE

RAMA 1 DEL NODO N1 AL NODO Nt K(XX) S(Y) K(XX) S(Y)

:

:

:

RAMA NBRAN DEL NODO N1 AL NODO Nt K(XX) S(Y) K(XX) S(Y)

**** RESULTADOS ****

DE ENZIMAS LIBRES = NFRENZ

DE PATRONES POR EL METODO DEL DETERMINANTE = DETER

DE PATRONES POR EL METODO POLINOMIAL = NTR

PATRONES VALIDOS DE KING-ALTMAN

PATRON # NUMERO DE RAMA QUE COMPONE EL PATRON

#SAL 1

1 (RAMAS QUE COMPONEN EL PATRON # 1)

:

:

:

NTR

(RAMAS QUE COMPONEN AL PATRON # NTR)

ECUACIONES DE RESTRICCION Y ASPECTOS RELACIONADOS

(sólo si el mecanismo presenta ciclos cerrados reversibles)

T(IZ) = (ECUACION DE RESTRICCION)

MVC = VALOR NUMERICO PARA ESTIMAR CONSTANTES CON EL PROGRAMA A-4

NCON = VALOR NUMERICO PARA ESTIMAR CONSTANTES CON EL PROGRAMA A-4

IPK = VALOR NUMERICO PARA ESTIMAR CONSTANTES CON EL PROGRAMA A-4

F(XX) = ECUACIONES DE RESTRICCION EN FUNCION DE CONSTANTES INDEPENDIENTES (I=1)

ECUACION DE VELOCIDAD

NODO(01) = NODO(01) +

:

:

:

NODO(K) = NODO(K) +

DENOM = DENOM +

NUMER = NUMER +

VELOC = NUMER/DENOM

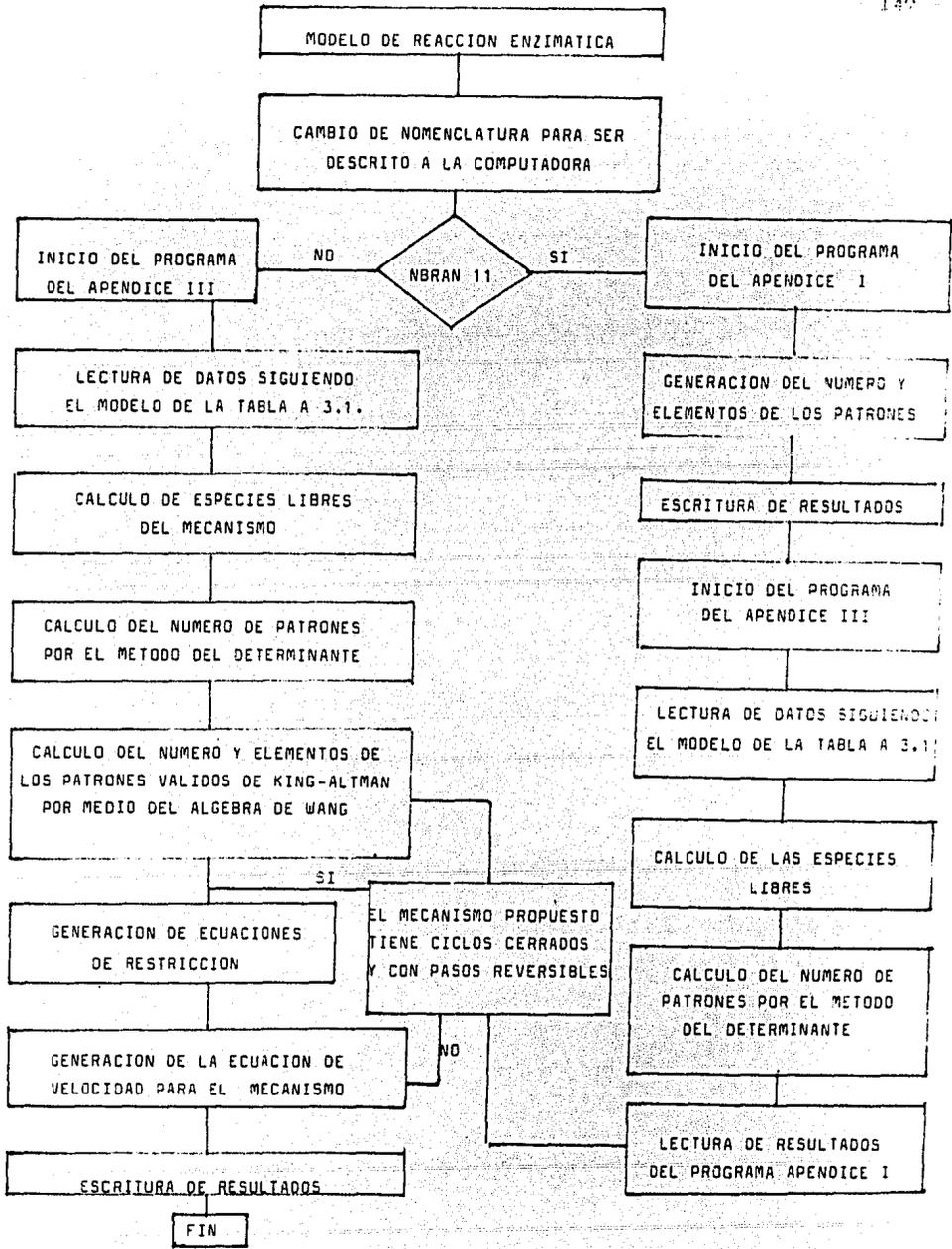


Fig. A 3.1 Diagrama de flujo.

Listado del Programa del Apéndice III.

```

ENZIMIN; PROCEDURE OPTIONS(MAIN);
DEL LINCOUT CHARACTER(80);
DEL FORTPM FILE RECORD OUTPUT ENV(KIND='DISK',MAXRECSIZE=80,
BLOCKSIZE=10,PROTECTION='PROTECTED',SAVEFACTOR=30,
TITLE='ARCH/DATA',UNITS='CHARACTERS',NEWFILE='TRUE');
PUT PAGE EDIT(' DESCRIPCION TOPOLOGICA DEL MECANISMO ENZIMATICO'
(4));
GET EDIT(NBRAN,NNODE) (F(2),X(1),F(2));
PUT SKIP(2) EDIT(' NUM DE RAMAS =',NBRAN)(SKIP,A,F(2));
PUT SKIP(1) EDIT(' NUM DE NODOS='NNODE)(SKIP,A,F(2));
PUT SKIP(2);
DEL NT(25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL NMAT(25,2) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL MNAT(25,2) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL ANAT(25,2) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL RETEMP CHARACTER(80);
DEL TEMP CHARACTER(80);
DEL SUB(25,2) CHARACTER (4);
DEL MATRE(25,25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL MATREC(25,25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL CYCLE(25,25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL RTC(25,2) CHARACTER (5);
DEL HUCN(25) NH(25) NHF(25);
DEL BETHAT(25,25) HOLD(25);
DEL NMAT(25,25) DECIMAL FIXED(11);
DEL NNON(25) IFAC(25);
DEL I0(25,25) DECIMAL FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL J0CLNT(25,25) DECIMAL FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL I0R DECIMAL FIXED(11);
DEL (XX,RY,RX,XY) FLOAT DECIMAL(11);
DEL NP(25) INITIAL(2,7,5,7,11,13,17,17,23,29,31,37,41,43,47,
53,59,61,67,71,73,79,83,89,97); /* 25 NO. PRIMOS */
DEL RLV CHARACTER (4);
DEL PLM CHARACTER(1);
DEL CHUMX PICTURE 'XX';
DEL CHUMY PICTURE 'XX';
DEL I0(25,25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL TR(25,25) BINARY FIXED(11) AUTOMATIC;
DEL SNOO CHARACTER(25) CIR CHARACTER(25);
RTC = ' ';
SUB = ' ';
MATRE = 0;
MATREC = 0;
BETHAT = 0;
NMAT = 0;
NNON = 0;
NH = 0;
NHF = 0;
NHAT = 0;
NMATC = 0;
NMATO = 0;
/* LECTURA DE LOS DATOS DEL MECANISMO PROPUESTO */
DO I = 1 TO NBRAN;
GET EDIT(NBR,N1,N2,RTC(NBR,1),SUB(NBR,1),RTC(NBR,2),
SUB(NBR,2) (SKIP,X(1),F(2),X(1),F(2),X(1),F(2),X(1),A(5),X(1),
A(4),X(1),A(5),X(1),A(4));
/* ESCRITURA DE LOS DATOS DE ENTRADA */
PUT EDIT(NBR,N1,N2,RTC(NBR,1),SUB(NBR,1),RTC(NBR,2),

```

```

SUB (NBR,2) (COLUMN(5),F(3),F(6),F(6),X(2),A(5),X(1),A(4),X(2),A(5),
X(1),A(4));
/* DETERMINA EL NUMERO DE ESPECIES LIBRES */
N3=N1;
N4=N2;
IF N1>50 THEN DO;
  N5=N5+1;
  NF(N5)=N1-90;
  N1=N1-90;
  N3=N1+NNODE;
END;
IF N2>50 THEN DO;
  N5=N5+1;
  NF(N5)=N2-90;
  N2=N2-90;
  N4=N2+NNODE;
END;
MMAT(NBR,1)=N1;
MMAT(NBR,2)=N2;
MMATC(NBR,1)=N3;
MMATC(NBR,2)=N4;
MATRE(N1,NBR)=-1;
MATRE(N2,NBR)=1;
MATRE(N3,NBR)=-1;
MATRE(N4,NBR)=1;
END;
MAXX=NF(1);
DO I=2 TO N5;
  IF NF(I)>MAXX THEN MAXX=NF(I);
END;
NFRENZ=MAXX;
MMATO=MMAT;
/* LECTURA DEL SUSTRATO SOBRE EL QUE SE DETERMINARA LA EC DE VEL. */
GET EDIT(RLV) (SKIP,A(4));
NNNOD=NNODE-1;
PUT SKIP(2) EDIT(' *****RESULTADOS*****')(A);
PUT SKIP(2) EDIT(' # DE ENZIMAS LIBRES =',NFRENZ)(SKIP,A,F(3));
/* RUTINA DEL CALCULO DEL NUMERO DE PATRONES DE KINO-ALTMAN POR
EL METODO DEL DETERMINANTE, */
DO I = 1 TO NNNOD;
  DO J = 1 TO NNNOD;
    DO K = 1 TO NBRAN;
      DETMAT(I,J) = DETMAT(I,J) + MATRE(I,K)*MATRE(J,K);
    END;
  END;
END;
DETER = 1;
DO I = 1 TO NNNOD-1;
  IF DETMAT(I,I) = 0 THEN GO TO NOTZERO;
  DO J = I + 1 TO NNNOD;
    IF DETMAT(J,I) = 0 THEN GO TO STILZERO;
    DO K = 1 TO NBRAN;
      HOLD(K) = DETMAT(J,K);
      DETMAT(J,K) = DETMAT(I,K);
      DETMAT(I,K) = HOLD(K);
    END;
    GO TO NOTZERO;
  END;
STILZERO:
END;
PUT EDIT(' MATRIZ SIN RANCO COMPLETO-DATOS DE ENTRADA MAL')(SKIP,A);
STOP;

```

```

NOZERO: DO J = I+1 TO NNNOD;
        DETHOLD = DETMAT(J,I)/DETMAT(I,I);
        DO K = I TO NNNOD;
            DETMAT(J,K) = DETMAT(J,K) - DETMAT(I,K)*DETHOLD;
        END;
    END;
    DETER = DETER*DETMAT(I,I);
END;
IJK=NNNOD;
DETER=DETER*DETMAT(IJK,IJK);
PUT SKIP(2) EDIT(' # DE PATRONES POR METODO DEL DETERMINANTE= ',DETER
                (A,F(5)));
/* CALCULO DE LOS PATRONES DE KING-ALTMAN. (DETERMINA LAS RAMAS QUE
   QUE FORMAN CADA UNO */
/* CUENTA EL # DE RAMAS QUE CONECTAN CADA NODO */
/* ALMACENA EN NCON(I) - EL TOTAL EN NTCN */
/* SI EL NUMERO DE RAMAS ES MAYOR A 11 ES NECESARIO QUE SE
   ALIMENTEN LOS PATRONES CALCULADOS POR EL PROGRAMA DEL
   APOENICE I. SI ES IGUAL O MENOR A 11 EL PROGRAMA DETERMINA
   LOS PATRONES DIRECTAMENTE */
IF NBRAN > 11 THEN GO TO XYZ;
ELSE DO;
NCON=0;
NTCN=0;
DO I = 1 TO NNODE;
    DO J = 1 TO NBRAN;
        IF MATRE(I,J) = 0 THEN GO TO ENDJJ;
        NTCN = NTCN + 1;
        NCON(I) = NCON(I) + 1;
        NPAT(NTCN) = NP(J+1);
    ENDJJ; END;
END;
/* CALCULA EL PRODUCTO DE NODOS-1 QUE INCIDEN EN SECUENCIA POLINOM.*
IF NNODE = 2 THEN DO;
    NTR=0;
    DO J=1 TO NBRAN;
        IF MATRE(1,J) = 0 THEN GO TO NOB;
        NTR=NTR+1;
        NPAT(NTR)=J;
    NOB; END;
    NTT=NTR+1;
    GO TO POLY;
END;
NCC = NCON(1);
NTC = NCON(1);
DO I = 1 TO NCC;
    ICOLKT(I) = NPAT(I);
END;
ON FIXEDOVERFLOW BEGIN; PUT LIST('IQ',IQ(NI),'ICOLKT= ',
    ICOLKT(L),'NPAT= ',NPAT(NTC+K),' SE REQUIERE DE DOBLE PRECISION')
END;
DO J = 1 TO NNODE-2;
    NI = 0;
    DO L = 1 TO NCC;
        DO K = 1 TO NCON(J + 1);
            NI = NI + 1;
            IQ(NI) = ICOLKT(L) * NPAT(NTC + K);
        END;
    END;
NCC = NI;
NTC = NTC + NCON(J + 1);

```

```

DO I = 1 TO NCC;
  ICOLKT(I) = IQ(I);
END;
END;
/* ELIMINA TERMINOS CON VALORES DUPLICADOS */
DO J = 1 TO NI - 1;
  DO K = J + 1 TO NI;
    IF IQ(J) = IQ(K) THEN DO;
      IQ(J) = 4;
      IQ(K) = 4;
    END;
  END;
END;
END;
/* FACTORIZA CADA TERMINO EN SUS NUMEROS PRIMOS */
NTC = 0;
NTR = 0;
DO I = 1 TO NI;
  II = 0;
  XR = IQ(I);
  DO J = 1 TO NBRAN;
    XX = NP(NBRAN + 2 - J);
    RX = XR/XX;
    IXR = RX + .5;
    RXR = IXR;
    IF RX = RXR THEN DO;
      XR = RX;
      II = II + 1;
      IFAC(II) = NP(NBRAN + 2 - J);
    END;
  END;
  IF XR = 1.0 THEN GO TO IEND;
  NTR = NTR + 1;
  DO J = 1 TO NNNOD;
    NPAT(J+NTR) = IFAC(J);
  END;
  NTC = NTC + NNNOD;
IEND: END;
NTT = NTC + NNNOD;
DO I = 1 TO NTR;
  MS = 1;
  DO J = 1 TO NNNOD;
    DO K = MS TO NBRAN;
      IF NPAT(NTC + 1 - J) = NP(K+1) THEN GO TO FNDPN;
    END;
    FNDPN: MS = K+1;
    NPAT(NTC + 1 - J) = K;
  END;
  NTC = NTC - NNNOD;
END;
GO TO POLY;
END;
XYZ:
  GET SKIP EDIT(NTR,NTC,NTT)(3(F(5)));
  DO I = 1 TO NTR;
    NTT=NTT-NNNOD;
    GET SKIP EDIT((NPAT(NTT+1-J) DO J=1 TO NNNOD))(X(8),18(F(4)));
  END;
POLY:
  PUT SKIP(2) EDIT(' * DE PATRONES POR EL METODO POLINOMIAL= ',NTR)
  (A,F(5));
  PUT SKIP(2);

```

```

PUT SKIP(2) EDIT(' PATRONES VALIDOS DE KING-ALTMAN')(A);
PUT SKIP(3) EDIT(' PATRON # RAMAS QUE COMPONEN EL PATRON')(
(A));PUT SKIP(2);
IF NBRAN>11 THEN NTT=NTC;
ELSE NTC=NTT;
DO I = 1 TO NTR;
NTT = NTT - NNNOD;
PUT EDIT(I,(NPAT(NTT + 1 -J) DO J = 1 TO NNNOD))
(COLUMN(2),F(5),18(F(4)));
END;
/* RUTINA DE ECUACIONES DE RESTRICCION */
STRT:
NNODE=NNODE +NFRENZ;
NNNOD=NNNOD+NFRENZ;
MATRE=MATREC;
MHAT=NMATC;
NH=0;
DO I = 1 TO NNNOD;
TRYJ: DO J = 1 TO NBRAN;
IF NH(J)^=0 THEN GO TO TRYJED;
IF MATRE(I,J)=0 THEN GO TO TRYJED;
NH(J)=I;
DO JJ=1 TO NNODE;
IF JJ=I THEN GO TO ETJJ;
IF MATRE(JJ,J)=0 THEN GO TO ETJJ;
DO II=1 TO NBRAN;
IF MATRE(I,II)^=0 THEN IF MATRE(JJ,II)^=0 THEN MATRE(JJ,II)=0;
ELSE MATRE(JJ,II)=1;
END;
ETJJ: END;
GO TO OUTOFJ;
TRYJED: END;
PUT SKIP(3) EDIT(' NO SE ENCUENTRAN CICLOS-NO HAY ECUACIONES DE REST
RICCION')(COLUMN(2),A);
GO TO FFFFFF;
OUTOFJ: END;
FCYCLE=0;
I=0;
DO J=1 TO NBRAN;
IF NH(J)=0 THEN DO;
I=I+1;
FCYCLE(I,J) = 1;
IJ=0;
DO II=1 TO NNODE;
IF MATRE(II,J)=0 THEN GO TO NXROW;
IJ=1;
DO JJ=1 TO NBRAN;
IF MATRE(II,JJ)^=0 THEN IF NH(JJ)^=0
THEN FCYCLE(I,JJ)=1;
END;
NXROW: END;
IF IJ=0 THEN DO;
I=I-1;
GO TO FCS;
END;
END;
FCS: END;
IF I=0 THEN GO TO FFFFFF;
NOC=I;
STRTA2:
DO I=1 TO (NOC-1);

```

```

        SNOC = ' ' ;
        DO J= (I+1) TO NOC;
            DO JJ=1 TO NBRAN;
                IF FCYCLE(I,JJ)=1 THEN IF FCYCLE(J,JJ)=1
                    THEN GO TO A2ENDJ;
            END;
        SUBSTR(SNOC,J,1) = '1';
A2ENDJ; END;
        IF SNOC=' ' THEN GO TO A2ENDI;
        DO J= (I+1) TO NOC;
            IF SUBSTR(SNOC,J,1)='1' THEN DO;
                II=NOC;
REN:    IF SUBSTR(SNOC,II,1)='1' THEN DO;
                    II=II-1;
                    IF II<J THEN GO TO A2ENDI;
                    ELSE GO TO REN;
                END;
                SUBSTR(SNOC,J,1) = ' ' ;
                DO JS=1 TO NBRAN;
                    NHOLD=FCYCLE(J,JS);
                    FCYCLE(J,JS)=FCYCLE(II,JS);
                    FCYCLE(II,JS)=NHOLD;
                END;
            END;
        END;
A2ENDI; END;
/* PUT EDIT((FCYCLE(II,J) DO J=1 TO NBRAN) DO II=1 TO NOC))
(COLUMN(15),12(F(1),X(1))); */
A3:  IR=0;
     ISCT=1;
     IFCT=1;
     IRCT=1;
RPA3: DO I=1 TO NBRAN;
        IS(ISCT,I)= FCYCLE(IFCT,I);
        END;
        IF IFCT = NOC THEN GO TO PRCYC;
        IFCT=IFCT + 1;
        DO I=1 TO ISCT;
            IJD=0;
            DO J=1 TO NBRAN;
                IF IS(I,J)=1 THEN IF FCYCLE(IFCT,J)=1 THEN DO;
                    IJD=1;
                    IR(IRCT,J)=0;
                END;
                ELSE IR(IRCT,J)=1;
                ELSE IF FCYCLE(IFCT,J)=1 THEN IR(IRCT,J)=1;
                    ELSE IR(IRCT,J)=0;
            END;
            IF IJD=1 THEN IRCT=IRCT+1;
        END;
        SIR=' ' ;
        DO I=1 TO (IRCT-1);
            IF I<(IRCT-1) THEN GO TO SI;
            IF SUBSTR(SIR,I,1)='1' THEN GO TO IA3ED;
            DO J=(I+1) TO (IRCT-1);
                II=0;
                IJ=0;
                IJK=0;
                DO K=1 TO NBRAN;
                    IF IR(I,K)=1 THEN II=II+1;
                    IF IR(J,K)=1 THEN IJ=IJ+1;

```

```

        IF IR(I,K)=IR(J,K) THEN DO;
            IF IR(I,K)=0 THEN GO TO IJKED;
            IJK=IJK+1;
        END;
IJKED:   END;
            IF IJK=II THEN SUBSTR(SIR,J,1)='1';
            ELSE IF IJK=IJ THEN SUBSTR(SIR,I,1)='1';
        END;
SI:     IF SUBSTR(SIR,I,1)='1' THEN GO TO IA3ED;
        ISCT=ISCT+1;
        DO KK=1 TO NBRAN;
            IS(ISCT,KK)=IR(I,KK);
        END;
IA3ED:  END;
        ISCT=ISCT+1;
        IRCT=1;
        GO TO RPA3;
PRCYC: II=0;
        DO I=1 TO ISCT;
            DO J=1 TO NBRAN;
                IF IS(I,J)=1 THEN DO K=1 TO 2;
                    IF RTC(J,K)= ' ' !RTC(J,K)= ' 0' !RTC(J,K)= ' 0
                    !RTC(J,K)= '0 ' !RTC(J,K)= ' 0 ' !RTC(J,K)= ' 0 '
                    THEN GO TO IRVS;
                END;
            END;
            II=II+1;
            IF I = II THEN DO J=1 TO NBRAN;
                IS(II,J)=IS(I,J);
            END;
/*PUT EDIT((IS(I,J) DO J=1 TO NBRAN)) (COLUMN(8),12(F(2),X(1)))=?
IRVS:  END;
        ISCT=II;
/* VERIFICACION DE TODAS LAS ECUACIONES DE RESTRICCION */
        NH=0;
        DO I=1 TO ISCT;
            DO J=1 TO NBRAN;
                IF IS(I,J)=1 THEN IF RTC(J,1)= ' ' !RTC(J,1)= ' 0'
                !RTC(J,1)= ' ' !RTC(J,1)= '0 ' !RTC(J,1)= ' 0 '
                !RTC(J,1)= ' 0 ' THEN GO TO PROB;
                ELSE IF RTC(J,2)= ' ' !RTC(J,2)= ' 0' !RTC(J,2)= ' 0 '
                !RTC(J,2)= '0 ' !RTC(J,2)= ' 0 ' !RTC(J,2)= ' 0 '
                THEN GO TO PROB;
                ELSE NH(I)=NH(I)+1;
            END;
            GO TO TERMP;
        PROB: NH(I)=0;
        TERMP: END;
PUT SKIP(3) EDIT(' ECUACIONES DE RESTRICCION Y ASPECTOS RELACIONADOS')
(A);PUT SKIP;
PUT EDIT(' EN EL ARCHIVO ARCH/DATA')(A); PUT SKIP;
        KVCT=0;
        SNUMX=KVCT;
        DO I=1 TO ISCT;
            IF NH(I)=0 THEN GO TO ENDTT;
            KVCT=KVCT+1;
            SNUMX=KVCT;
            NH(I)=0;
            LINCOUT=' T('!!SNUMX!!)'=';
            LPOS=13;
            DO J=1 TO NBRAN;

```

```

      IF IS(I,J)=1 THEN DO;
SUBSTR(LINEOUT,LPOS,13)='(!!IRTC(J,1)!!/'/'!!IRTC(J,2)!!)';
LPOS=LPOS+13;
IJCT=NMAT(J,2);
NHP(J)=1;
II=0;
GO TO XITTTG;

```

```

      END;

```

```

    END;

```

```

XITTTG: II=II+1;

```

```

  IF II=NH(I) THEN GO TO BKITT;

```

```

  DO K=J+1 TO NDRAN;

```

```

    IF NHP(K)=0 THEN IF IS(I,K)=1 THEN DO;

```

```

      DO KL=1 TO 2;

```

```

        IF IJCT=NMAT(K,KL) THEN DO;

```

```

          IF II=4 THEN DO;

```

```

SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)='';

```

```

          WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);

```

```

          LINEOUT=' T(!!SNUMX!!)=T(!!SNUMX!!)';

```

```

          LPOS=LPOS+1;

```

```

        END;

```

```

SUBSTR(LINEOUT,LPOS,14)='*(!!IRTC(K,KL)!!/'/'!!IRTC(K,3-KL)!!)';

```

```

      NHP(K)=1;

```

```

      LPOS=LPOS+14;

```

```

      IJCT=NMAT(K,3-KL);

```

```

      GO TO XITTTG;

```

```

    END;

```

```

  END;

```

```

END;

```

```

END;

```

```

BKITT:

```

```

SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)='';

```

```

WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);

```

```

ENDTT: END;

```

```

LINEOUT=' NVC=!!SNUMX!!';

```

```

WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);

```

```

/* ESCRITURA DE TODOS LOS CICLOS FUNDAMENTALES */

```

```

CARDSIN2;

```

```

KVCT=0;

```

```

DO I=1 TO NCC;

```

```

  NH(I)=0;

```

```

  DO J=1 TO NDRAN;

```

```

    IF FCYCLE(I,J)=1 THEN IF RTC(J,1)=' ' 'IRTC(J,1)=' 0'

```

```

      !RTC(J,1)=' 0'

```

```

      !RTC(J,1)='0 ' !RTC(J,1)=' 0 ' !RTC(J,1)=' 0 '

```

```

      THEN GO TO XOUTNH;

```

```

    ELSE IF RTC(J,2)=' ' 'IRTC(J,2)=' 0' !RTC(J,2)=' 0 '

```

```

      !RTC(J,2)='0 ' !RTC(J,2)=' 0 ' !RTC(J,2)=' 0 '

```

```

      THEN GO TO XOUTNH;

```

```

    ELSE NH(I)=NH(I)+1;

```

```

  END;

```

```

  KVCT=KVCT+1;

```

```

  GO TO XINNH;

```

```

  XOUTNH: NH(I)=0;

```

```

  XINNH:

```

```

END;

```

```

SNUMX=KVCT;

```

```

LINEOUT=' NCON=!!SNUMX!!';

```

```

WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);

```

```

DO J=1 TO NDRAN;

```

```

  NHP(J)=0;

```

```

DO I=1 TO NOC;
  IF NH(I)≠0 THEN;
    IF FCYCLE(I,J)=1 THEN NHP(J)=NHP(J)+1;
  END;
END;
CARDSIN3:
DO J=1 TO NOC;
  IF NH(J)=0 THEN GO TO XITFST;
  DO JJ= 1 TO NERAN;
    IF NHP(JJ)=1 THEN IF FCYCLE(J,JJ)=1 THEN DO;
      CNUMX=SUBSTR(RTC(JJ,2),3,2);
      LINEOUT=          IPK('!CNUMX!!')=1'!!';
      WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
      GO TO XITFST;
    END;
  END;
XITFST: END;
CARDSIN4:
DO I=1 TO NOC;
  IF NH(1)=0 THEN GO TO NXCYCL;
  DO J=1 TO NERAN;
    IF NHP(J)=1 THEN IF FCYCLE(I,J)=1 THEN DO;
      IK=1;
      DO IJK=1 TO NERAN;
        IF FCYCLE(I,IJK)=1 THEN IF IJK≠J THEN FCYCLE(NOC+1,IJK)=1;
        ELSE FCYCLE(NOC+1,IJK)=0;
        ELSE FCYCLE(NOC+1,IJK)=0;
      END;
      ISC=NMAT(J,1);
      LINEOUT='          (!RTC(J,2)!!)'='(!RTC(J,1);
      LPOS=10;
STAGC:
  IF NH(I) = IK THEN DO;
    SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)=';';
    WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
    GO TO NXCYCL;
  END;
  DO II=1 TO NERAN;
    IF FCYCLE(NOC+1,II)=1 THEN DO;
      IF NMAT(II,1)=ISC THEN IL=2;
      ELSE IF NMAT(II,2)=ISC THEN IL=1;
    ELSE GO TO ENDSTAG;
    IF LPOS > 56 THEN DO;
      WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
      LINEOUT='          ';
      LPOS=7;
    END;
    IK=IK+1;
    SUBSTR(LINEOUT,LPOS,14)='*(!RTC(II,IL)!!)'/'!RTC(II,3-IL)!!';
    LPOS=LPOS+14;
    ISC=NMAT(II,IL);
    FCYCLE(NOC+1,II)=0;
    GO TO STAGC;
  END;
ENDSTAG: END;
  END;
  SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)=';';
END;
NXCYCL:
END;
*****

```

```

NNODE=NNODE-NFRENZ;
NNNOD=NNNOD-NFRENZ;
NMAT=NMAT0;
/* FIN DE LA RUTINA DE ECUACION DE RESTRICCION */
/* RUTINA DE ECUACION DE VELOCIDAD. */
PUT PAGE EDIT(' ECUACION DE VELOCIDAD-EN EL ARCHIVO ARCH/DATA')(A);
PUT SKIP(2);
LASTONE;
DO I = 1 TO NNODE;
IF I = 1 THEN NTT = NTC;
ELSE NTT = NTC;
  SNUMX=I;
  TEMP = ' NODO('||SNUMX||')=NODO('||SNUMX||')';
  IRT=0;
  LPOS = 24;
  DO J = 1 TO NTR;
    NTC = NTC - NNNOD;
    JSIC = 0;
    MCN = 1;
    MHCN(MCN)=I;
    NH = 0;
    NHOLD = 0;
    NHP=0;
J16: DO J1 = 1 TO NNNOD;
  IF NH(J1) = ??? THEN GO TO J1END;
  IF NH(J1) = 0 THEN K = NH(J1);
  ELSE DO;
    K = NFAT(NTC + 1 - J1);
    NH(J1) = K;
  END;
  DO J2 = 1 TO 2;
    DO J3 = 1 TO MCN;
      IF NMAT(K,J2) = MHCN(J3) THEN DO;
IF RTC(K,3-J2)=' ' 'RTC(K,3-J2)=' ' 0 'RTC(K,3-J2)=' ' 0 '
  RTC(K,3-J2)=' 0 ' 'RTC(K,3-J2)=' 0 ' 'RTC(K,3-J2)=' 0 '
      THEN GO TO J2END;
      MCN=MCN+1;
      NHOLD = NHOLD + 1;
      NH(J1) = ???;
      IF J2 = 1 THEN NHP(J1) = K;
      ELSE NHP(J1) = -K;
      MHCN(MCN)=NMAT(K,(3-J2));
      GO TO J2END;
    END;
  END;
J2END: END;
J3END: END;
J1END: END;
JENDR: JSIC = JSIC + 1;
IF JSIC > NNNOD THEN DO;
PUT EDIT(' DIAGRAMA INCORRECTO - NO ES GRAFICA CONECTADA')(A);
STOP;
END;
IF NHOLD = NNNOD THEN GO TO J16;
DO J4 = 1 TO NNNOD;
IF J4=1 THEN PLM='1';
ELSE PLM='7';
IF NHP(J4) = 0 THEN DO;
  J2 = 1;
  NHP(J4) = -NHP(J4);
END;
ELSE J2 = 2;

```

```

K=NHP(J4);
IF LPOS > 60 THEN DO;
    LINEOUT=TEMP;
    WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
    TEMP=' ';
    LPOS = 7;
    IRT = IRT + 1;
    END;
IWROOT = 1;
IF SUB(K,J2) = ' ' THEN DO;
    IF RTC(K,J2)=' 0'!RTC(K,J2)=' 0'
        !RTC(K,J2)='0' !RTC(K,J2)=' 0' !RTC(K,J2)=' 0'
    THEN DO;TEMP=RETEMP; GO TO J4END;END;
    SUBSTR(TEMP,LPOS,6)=PLM!RTC(K,J2);
    LPOS = LPOS + 6;
    END;
ELSE DO;
    IF RTC(K,J2)=' 0'!RTC(K,J2)=' 0'
        !RTC(K,J2)='0' !RTC(K,J2)=' 0' !RTC(K,J2)=' 0'
    THEN DO;TEMP=RETEMP; GO TO J4END;END;
    SUBSTR(TEMP,LPOS,11)=PLM!RTC(K,J2)!!*!!SUB(K,J2);
    LPOS=LPOS+11;
    END;
J4END: END;
IF IRT :18 THEN DO;
    LINEOUT=TEMP;
    SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)=' ';
    WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
    TEMP = ' NODO('!!SNUMX!!')=NODO('!!SNUMX!!')';
    LPOS = 24;
    IRT = 0;
    END;
JEND: END;
LINEOUT=TEMP;
SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)=' ';
WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
IEND: END;
LPOS = 10;
LINEOUT=' DENOM=DENOM';
DO I=1 TO NNODE;
    SNUMX=I;
    SUBSTR(LINEOUT,LPOS,9)=' NODO('!!SNUMX!!')';
    LPOS=LPOS+9;
    IWROOT = 1;
    IF LPOS>63&I<NNODE THEN DO;
        WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
        LINEOUT = ' ';
        LPOS=7;
        IWROOT=0;
        END;
    END;
IF IWROOT=1 THEN DO;
    SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)=' ';
END;
WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
LINEOUT=' NUMER=NUMER';
LPOS = 18;
DO I=1 TO NBR;
    J=1;
    PLM='+';
    IF RLV="SUB(I,1) THEN IF RLV="SUB(I,2) THEN GO TO NUMER;

```

```
XRT: IF RTC(I,J)=' ' !RTC(I,J)=' 0' !RTC(I,J)=' 0 '
      !RTC(I,J)=' 0 ' !RTC(I,J)=' 0 ' !RTC(I,J)=' 0 '
      THEN GO TO NXRTC;
      SNUMX=NMAT(I,J);
      IF LPOS>57 THEN DO;
        WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
        LINEOUT=' ';
        LPOS=7;
      END;
      SUBSTR(LINEOUT,LPOS,15)=PLM!!'NODO('!!SNUMX!!')*!!RTC(I,J);
      LPOS=LPOS + 15;
      IF SUB(I,J)=' ' THEN GO TO NXRTC;
      IF LPOS>67 THEN DO;
        WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
        LINEOUT=' ';
        LPOS=7;
      END;
      SUBSTR(LINEOUT,LPOS,5)='*!!SUB(I,J);
      LPOS=LPOS+5;
NXRTC: J=J+1;
      PLM='--';
      IF J=2 THEN GO TO XRT;
NUMSR: END;
      SUBSTR(LINEOUT,LPOS,1)='';
      WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
      LINEOUT=' ' VELOC=NUMR/DENOM;
      WRITE FILE(FORTPM) FROM(LINEOUT);
/* F I N   D E L   P R O C R A M A .   */
      END; END ENZINE;
```

A P E N D I C E I V

Método PRAXIS para minimizar una función de varias variables.

El método PRAXIS del Programa de este apéndice intenta encontrar el mínimo global (y no tan sólo el mínimo local) de una función de varias variables, sin hacer uso de derivadas.

El Programa es una modificación del método original de Powell, que mejora la velocidad de convergencia y confiabilidad de los resultados.

Algoritmo Powell.

El método Powell minimiza una función sin el cálculo de derivadas, el cual es una modificación del método de convergencia cuadrática propuesta por C.S. Smith en 1962. Ambos métodos aseguran la convergencia en un número finito de pasos, para una función definida como cuadrática, haciendo uso de algunas propiedades de las direcciones conjugadas.

Direcciones conjugadas

Si a es definida y simétrica, entonces minimizar la función cuadrática

$$a^T A x - 2b^T x = (x - A^{-1} b)^T A (x - A^{-1} b) - b^T A^{-1} b \quad (A 4.1)$$

es equivalente a resolver el sistema de ecuaciones lineales

$$A x = b \quad (A 4.2)$$

Si la matriz A es conocida explícitamente, entonces, en lugar de minimizar (A 4.1), se puede resolver (A 4.2) por cualquier método disponible, por ejemplo: formando la descomposición Cholesky de A , donde A es la matriz Hessiana de una cierta función que no es conocida explícitamente, pero donde la equivalencia de (A 4.1) y (A 4.2) es útil.

Definición 1

Dos vectores u y v se dice que son conjugados con respecto a la matriz positiva, definida y simétrica A , si

$$u^T A v = 0 \quad (A 4.3)$$

Cuando no hay riesgo de confusión, se puede decir simplemente que u y v son conjugados. Por un conjunto de direcciones conjugadas, se quiere decir que un conjunto de vectores son conjugados de manera aparejada.

Observación

Si $\{u_1, \dots, u_m\}$ es cualquier conjunto de direcciones conjugadas diferentes de uno en R^n entonces $\{u_1, \dots, u_m\}$ son linealmente independientes. Así $m \leq n$ y $m = n$ si $\{u_1, \dots, u_m\}$ abarca R^n .

Teorema A 4.1

Si A es positiva, definida y simétrica, $Ax=b$, y u_1, \dots, u_m es un conjunto de direcciones conjugadas diferentes de cero, entonces

$$v = x - \sum_{i=1}^m \left(\frac{u_i^T b}{u_i^T A u_i} \right) u_i \quad (A 4.4)$$

Prueba

Si $i = j = m$ entonces, de (A 4.3)

$$u_j^T A v = u_j^T (A x - b) = 0 \quad (A 4.5)$$

Corolario A 4.1

Si $m=n$ en el teorema A 4.1, entonces $v=0$, por lo que

$$x = \sum_{i=1}^n \left(\frac{u_i^T b}{u_i^T A u_i} \right) u_i \quad (A 4.6)$$

Resresando al problema de minimización, el teorema A 4.1 y la equivalencia de problemas (A 4.1) y (A 4.2), dan el siguiente resultado

Teorema A 4.2

Si A es positiva, definida y simétrica,

$$f(x) = x^T A x - 2b^T x + c \quad (A 4.7)$$

para alguna $b \in R^n$ y $c \in R$, u_1, \dots, u_m es un conjunto de direcciones conjuntas diferentes de cero, entonces el mínimo de $f(x)$ en el espacio abarcado por u_1, \dots, u_m ocurre en el punto donde

$$\beta_i = \frac{u_i^T b}{u_i^T A u_i} \quad (A 4.8)$$

Prueba

Esto sigue del teorema A 4.1, o alternativamente, de la relación

$$f\left(\sum_{i=1}^m \alpha_i u_i\right) = \sum_{i=1}^m (\alpha_i - \beta_i)^2 u_i^T A u_i + c - \sum_{i=1}^m \left(\frac{u_i^T b}{u_i^T A u_i} \right)^2 \quad (A 4.9)$$

(los términos cruzados se eliminan por la conjugación de u_1, \dots, u_m)

La utilidad del teorema A 4.2 proviene del siguiente resultado, que muestra como se puede calcular la β_i de (A 4.8) usando evaluaciones de función, aún si A , b y c no son conocidos explícitamente. La prueba es inmediata a partir de la ecuación (A 4.9).

Teorema A 4.3

Con la notación del teorema A 4.2, una j fija satisface $1 \leq j \leq m$, y fija $\alpha_1, \dots, \alpha_{j-1}, \alpha_{j+1}, \dots, \alpha_m$ el mínimo de

$$f_j(\alpha_j) = f\left(\sum_{i=1}^m \alpha_i u_i\right) \quad (A 4.10)$$

ocurre en $\alpha_j = \beta_j$

A partir del teorema A 4.2 y A 4.3 se puede ver que el mínimo de la función cuadrática $f(x)$ puede ser encontrado por n minimizaciones de una dimensión a lo largo de direcciones conjugadas diferentes de cero u_1, \dots, u_n y el orden en el cual las minimizaciones de una dimensión son llevadas a cabo es irrelevante. Para usar este resultado, se tiene que estar en posibilidad de generar conjuntos de direcciones conjugadas. Tanto el método Powell como el de Smith hacen esto usando el siguiente teorema.

Teorema A 4.4

Si el mínimo de $f(x)$ dado por (A 4.7) en la dirección U a partir del punto X_i es en X_i , para $i = 0, 1$, entonces $X_i - X_0$ es conjugado con U .

Prueba

Para $i = 0$ y 1

$$\frac{\partial}{\partial h} f(X_i + h U) = 0 \quad (\text{A 4.11})$$

en $h = 0$, así que de (A 4.7)

$$U^T (A X_i - b) = 0 \quad (\text{A 4.12})$$

restando la ecuación (A 4.12) para $i=0$ y 1 resulta

$$U^T A (X_i - X_0) = 0$$

que completa la prueba.

Procedimiento básico de Powell.

La idea básica del algoritmo de Powell es Sea X_0 la aproximación inicial al mínimo y sea u_1, \dots, u_n las columnas de la matriz de identidad. Una iteración del procedimiento básico consiste de los siguientes pasos:

1. Para $i=1, \dots, n$, se calcula β_i para minimizar $f(X_{i-1} + \beta_i u_i)$, y definir $X_i = X_{i-1} + \beta_i u_i$.
2. Para $i=1, \dots, n-1$, se reemplaza u_i por u_{i+1} .
3. Se reemplaza u_n por $X_n - X_0$.
4. Se calcula β para minimizar $f(X_0 + \beta u_n)$, y se reemplaza X_0 por $X_0 + \beta u_n$.

Para una función general (no cuadrática), las iteraciones son repetidas hasta que algún criterio es satisfecho. Si f es cuadrática, consideremos la situación después de k iteraciones, donde $1 \leq k \leq n$. Entonces u_{k+1}, \dots, u_n son conjugadas por el teorema A 4.4 y la elección de u_n en el paso 3. Después de n iteraciones se ha alcanzado a lo largo de n direcciones conjugadas u_1, \dots, u_n y por los teoremas A 4.2 y A 4.3. El mínimo se ha alcanzado si las u_i son todas diferentes de cero. Esto es cierto si $\beta \neq 0$ en cada iteración, porque entonces la dirección u_1, \dots, u_n puede ser linealmente depen-

diente.

El problema de la dependencia lineal

Se ha observado que aún para una función cuadrática f , una de las iteraciones puede tener $\beta_i = 0$. Esto resulta si las direcciones u_1, \dots, u_n son linealmente dependientes y esto en el procedimiento solo puede encontrarse en el mínimo de $f(x)$ sobre un subespacio afinado de R^n . Aunque no es cierto que β_i sea cero exactamente.

Powell descubrió que las direcciones u_1, \dots, u_n algunas veces son casi linealmente independientes. Así, él sugirió que las nuevas direcciones $X_{i+1} - X_i$ se usaran, y que una de las anteriores u_1, \dots, u_n se descartaran sólo si esto no decrecía el valor de $|\det(U, \dots, U_n)|$, donde

$$V_i = (u_j^T A u_j)^{1/2} u_j \quad (A-4.14)$$

para $i=1, \dots, n$. Con esta modificación, el algoritmo es casi satisfactorio, pero la propiedad deseada de convergencia se pierde y para un conjunto de direcciones conjugadas podría ser que nunca se construyera.

La modificación principal

La manera simple de evitar la dependencia lineal de las direcciones de acercamiento, con el procedimiento básico de Powell, y mantener la convergencia cuadrática si $\beta_i \neq 0$, es la de reemplazar las direcciones de acercamiento u_1, \dots, u_n en las columnas de la matriz de identidad después de cada n o $n/2$ iteraciones.

En lugar de reemplazar $u = [u_1, \dots, u_n]$ a la matriz de identidad, se puede usualmente asignar u a cualquier matriz ortogonal Q . Para evitar el descartar información útil acerca de f , se escoge Q de tal manera que u_1, \dots, u_n permanezca conjugada si f es cuadrática. Los vectores principales q_1, \dots, q_n se calculan en la suposición de que f es cuadrática y u es igual a $Y = [q_1, \dots, q_n]$. Las razones para seguir este procedimiento se resumen a:

1. Si la aproximación cuadrática a f es buena, entonces las nuevas direcciones de acercamiento son conjugadas con respecto a la matriz, la cual es cercana a la matriz Hessiana de f a el mínimo y así las siguientes iteraciones dan una rápida convergencia.
2. Sin importar la validez de la aproximación cuadrática, las nuevas direcciones de acercamiento son ortogonales, así que el acercamiento a un mínimo, nunca puede estar restringido a un subespacio.

En el procedimiento básico de Powell para minimizar una función positiva definida cuadrática en n iteraciones, los pasos 1 a 3 de la primera iteración son innecesarios. En el nuevo algoritmo se omiten los pasos 1 a 3 en la primera iteración y después de cada descomposición singular de valores (p.ej. en las $(n/2)$, $(2n/2)$, ... iteraciones). Así hay exactamente $n(n/2)$ minimizaciones lineales, en lugar de $n(n/2)$, entre descomposiciones singulares de valores sucesivos.

Esta modificación no es importante para n grande, pero los valores numéricos sugieren que es significativa para valores pequeños de n .

El acercamiento lineal

El procedimiento de acercamiento lineal es similar al usado por Powell. Se desea encontrar un valor de h tal que aproximadamente minimice

$$Y(h) = f(X_0 + h u) \quad (A 4.15)$$

donde el valor de X_0 y la dirección $u \neq 0$ están dados y $Y(0) = f(X_0)$ está previamente conocido. Si un acercamiento lineal en la dirección de u ha sido hecho, o si u resulta de un valor singular de descomposición, entonces un estimado de $Y'(0)$ está disponible. Una parábola $P(h)$ es ajustada a $Y(h)$, usando $Y(0)$, el estimado de $Y'(0)$, si está disponible y el valor calculado de $Y(h)$ en otro punto, o en dos puntos si no hay estimado de $Y'(0)$. Si $P(h)$ tiene un mínimo en $h = h^*$, y $Y(h^*) - Y(0)$, entonces h^* es aceptado como un valor de h que minimiza aproximadamente (A 4.15). De otra manera h^* es reemplazada por $h^*/2$, $Y(0)$ es recalculada repitiéndose la prueba (después de un número de pruebas sin resultado, el procedimiento resreza con $h=0$).

Criterio de interrupción.

El usuario del procedimiento PRAXIS da los parámetros: t (tolerancia absoluta positiva), $\epsilon = \text{MACHEPS}$ (la precisión de la máquina). El procedimiento intenta que X satisfaga

$$\|X - m\|_2 = \epsilon^{1/2} \|X\|_2 + t \quad (A 4.16)$$

donde m es la posición del mínimo local verdadero cerca de X . La forma exacta del lado derecho de la ec. (A 4.16) no es importante y puede ser fácilmente cambiado. Este criterio fue escogido por la analogía existente con el caso de una dimensión.

Es imposible garantizar que (A 4.16) satisfaga todas las funciones f , o aún para f que sea C^2 cerca de m . El criterio de interrupción es, sin embargo, muy precavido y es satisfactorio para varios casos.

La única excepción es el caso pobremente conocido

$$f(X) = X^T A X \quad (A 4.17)$$

donde A es una matriz Hilbert de 12×12 con un número de condición $k \approx 1.1 \times 10^8$, $\epsilon^2 \approx 4 \times 10^{-16}$.

En muchos casos el criterio de interrupción resulta muy precavido y son llevadas a cabo algunas evaluaciones innecesarias. Se remarca que al igual que en el método de Powell, el criterio de interrupción no es una parte importante del método. Un criterio mejorado puede ser fácilmente incorporado.

Supongamos que X' sea la mejor aproximación al mínimo antes de una iteración del procedimiento básico y sea X'' la mejor aproximación después de la iteración. Se prueba si

$$2 \|X'' - X'\|_2 = \epsilon^{1/2} \|X'\|_2 + t \quad (A 4.18)$$

El criterio de interrupción es simplemente para parar y resreza la aproximación X'' y saber si (A 4.18) es satisfecha para un

número determinado de iteraciones consecutivas. El número de iteraciones consecutivas estará determinado por que tan cuidadoso se quiera ser.

Tabla A 4.1 Descripción de los datos de entrada del programa.

En la primera tarjeta de datos: # de parámetros, # de observaciones, # de sustratos, nombre del mecanismo, INVERT, 0 = no, 1 = si.

En la segunda tarjeta de datos: Parámetros iniciales.

Tercera tarjeta de datos: datos experimentales en la forma de primer sustrato, ..., último sustrato y en la última columna velocidad observada.

TARJETA	COLUMNAS	COMENTARIOS
1	1 - 3	Número de parámetros
	4 - 6	Número de observaciones
	7 - 9	Número de sustratos
	10 - 20	Nombre del programa
	21 - 22	INVERT
2	1 - 5	Todos los parámetros iniciales un dato por tarjeta
3	10 - 20	Concentración del primer sustrato
	30 - 40	Concentración del segundo sustrato
	50 - 60	Velocidad observada

FALLA DE ORIGEN

The image displays a large, dense grid of data points, likely a matrix or table of results from a program. The grid is organized into several columns and rows, with some text labels interspersed. The data appears to be numerical or categorical values arranged in a structured format. The overall appearance is that of a printed output from a computer program, possibly a scientific or engineering application, given the title 'FALLA DE ORIGEN' (Origin Failure).

Fig. A 4.2 Formato de salida de los resultados del programa.

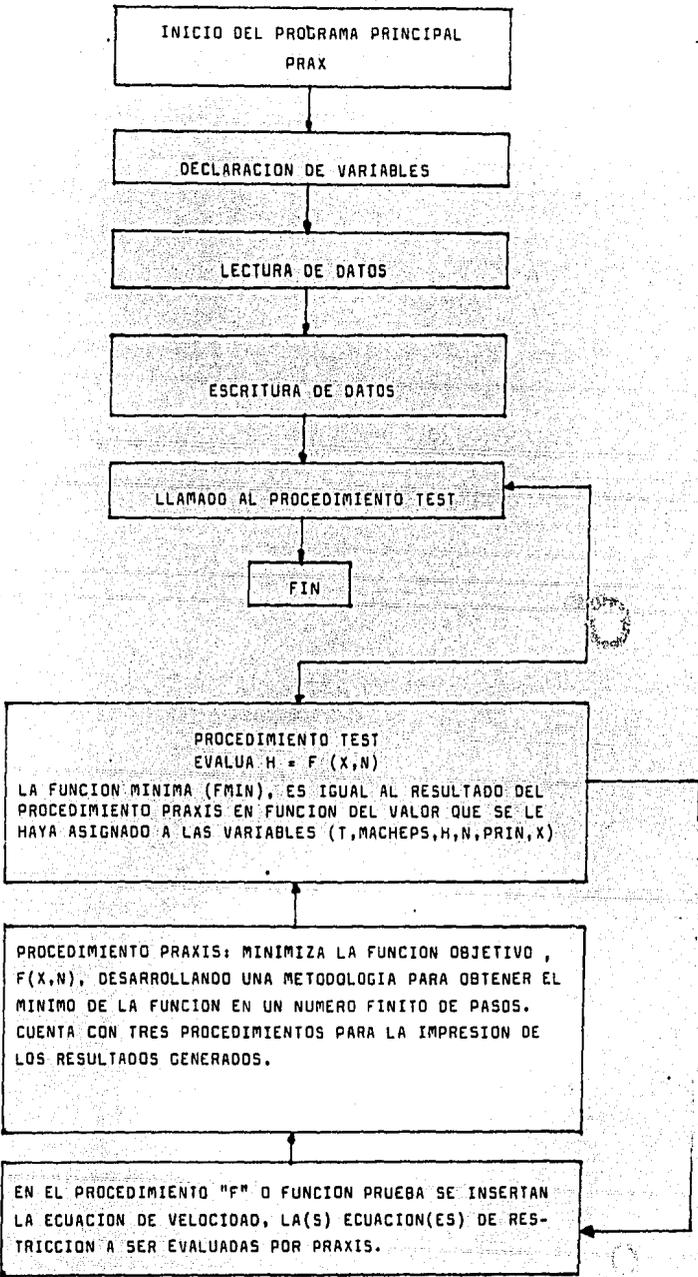


Fig. A 4.3 Diagrama de flujo (en bloques).

Listado del Programa del Apéndice IV.

```

MAX: PROCEDURE OPTIONS(MAIN);
* ***** */
/* EL PRINCIPIO DEL PROGRAMA SE ENCUENTRA AL FINAL DEL LISTADO.
PARA INFORMACION DE LOS DATOS DE ENTRADA REQUERIDOS DIRIGIRSE
TAMBIEN A LA PARTE FINAL DONDE HAY COMENTARIOS AL RESPECTO.
SE NECESITA UN GENERADOR DE NUMEROS ALEATORIOS UNIFORMES.
LA SIGUIENTE TARJETA LLAMA A LA FUNCION RANDOM QUE ES PROPOR-
CIONADA POR EL COMPILADOR. */
DCL RANDOM BUILTIN;
DCL IPK(50) FIXED BINARY INITIAL((50)0);
/* INSERTA LOS RESULTADOS, NVC, NCON- IPK- QUE SON GENERADOS POR EL
PROGRAMA PROYCTODO Y ARCHIVADOS EN RANA/DATA. UNO POR LINEA. */
BEGIN;
/* PROGRAMA PRUEBA PARA EL PROCEDIMIENTO PRAXIS.
***** */
PRAXIS: PROCEDURE (T,MACHEFS,H,N,PRIN,X);
DCL (T,MACHEFS,H) FLOAT (7);
DCL X(50) FLOAT (7);
DCL (N,PRIN) FIXED BINARY (15);
BEGIN;
* ESTE PROCEDIMIENTO MINIMIZA LA FUNCION F(X;N) DE N VARIABLES
X(1).....X(N). USANDO EL PRINCIPIO DEL METODO DE EJES.
A LA ENTRADA X TOMA UN VALOR SUPUESTO; EN EL REGRESO TOMA EL
PUNTO ESTIMADO SI ES MINIMO; CON (ESPERANZA) (ERROR) > SQRT
(MACHEFS)/X(1). DONDE MACHEFS ES LA PRECISION DE LA MAQUINA
(PARA ESTE CASO MACHEFS=16**(-9)), QUE ES EL NUMERO MAS PEQUEÑO
TAL QUE 1/MACHEFS<1. T ES LA TOLERANCIA (PARA ESTE CASO T =
1.0E-05). H ES EL MAXIMO TAMAÑO DE PASO; DETERMINADO CON RESPECTO
A LA DISTANCIA MAXIMA ESPERADA A LA SUPUESTA EN EL MINIMO. ( SI
ES DETERMINADA PEQUEÑA O GRANDE; ENTONCES LA VELOCIDAD INICIAL
DE CONVERGENCIA SERA LENTA).
EL USUARIO DEBERA OBSERVAR EL COMENTARIO SOBRE LOS NUMEROS HE-
RISTICOS DESPUES DEL PROCEDIMIENTO QUAD.
PRIN CONTROLA LA ESCRITURA DE DATOS INTERMEDIOS.
SI PRIN=0, LOS RESULTADOS INTERMEDIOS NO SON ESCRITOS.
SI PRIN=1, F ES ESCRITO DESPUES DE CADA N+1 O N+2 MINIMIZACIONES
LINEALES. Y LA X FINAL ES ESCRITA, PERO LAS X INTER-
MEDIAS SOLAMENTE SI N=4.
SI PRIN=2, LOS VALORES CARACTERISTICOS DE A Y EL FACTOR DE ESCA-
LAMIENTO SON TAMBIEN ESCRITOS.
SI PRIN=3, F Y X SON ESCRITOS DESPUES DE MUY POCAS MINIMIZACIO-
NES LINEALES.
SI PRIN=4, LOS VECTORES CARACTERISTICOS SON TAMBIEN ESCRITOS.
FMIN ES UNA VARIABLE GLOBAL; VER PROCEDIMIENTO PRINT.
RANDOM ES UNA FUNCION SIN PARAMETROS QUE REGRESA UN NUMERO
ALEATORIO UNIFORMEMENTE DISTRIBUIDO EN (0,1). CUALQUIER INICIO
DEBE SER HECHO ANTES DEL LLAMADO A PRAXIS.
*/
MINFIT: PROCEDURE(N,EPS,TOL,AB,Q);
DCL (EPS,TOL,C,F,G,H,S,X,Y,Z) FLOAT (7);
DCL (AB(50,50),Q(50),E(50)) FLOAT (7);
DCL (N,L,KT) FIXED BINARY (15);
BEGIN;
/* LOS VALORES SINGULARES DEL ARREGLO AB SON RETORNADOS EN Q
Y AB ES REESCRITO CON LA MATRIZ ORTOSONAL V TAL QUE
U*DIAG(Q) = AB * V. DONDE U ES CUALQUIER OTRA MATRIZ
ORTOGONAL.
SE REALIZA LA REDUCCION PRINCIPAL A LA FORMA BIDIAGONAL

```



```

      H= AB(I,I+1)*G;
      DO J=L TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
      AB(J,I) = AB(I,J)/H;
      END; END;
      DO J=L TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
      S=0;
      DO K=L TO N; IF IPK(K) ^=1 THEN DO;
      S = S + AB(I,K)* AB(K,J);
      END; END;
      DO K = L TO N; IF IPK(K) ^=1 THEN DO;
      AB(K,J)= AB(K,J) + S*AB(K,I);
      END; END;
      END; END;
      ENDS;
      DO J=L TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
      AB(I,J)=0; AB(J,I)=0;
      END; END;
      AB(I,I)=1;
      G = E(I);
      L = I;
      END; END;
      /* DIAGONALIZACION DE LA FORMA BIDIAGONAL */
      EPS= EPS*X;
      DO K = N TO 1 BY (-1); IF IPK(K) ^=1 THEN DO;
      KT=0;
      TESTFSPLITTING;
      KT = KT + 1;
      IF KT > 30 THEN DO;
      E(K) = 0.000000000;
      PUT EDIT (' OR ERROREA',(COLUMN(1),A(20)));
      END;
      DO LL = K TO 1 BY (-1); IF IPK(LL) ^=1 THEN DO;
      L=LL;
      IF ABS(E(L))<= EPS THEN GO TO TESTFCONVERGENCE;
      IF L>1 THEN DO;
      IF ABS(Q(L-1))<= EPS THEN GO TO CANCELLATION;
      END;
      END; END;
      /* CANCELACION DE E(L) SI L > 1 */
      CANCELLATION;
      C=0;
      S=1;
      DO I= L TO K; IF IPK(I) ^=1 THEN DO;
      F= S* E(I);
      E(I) = C*E(I);
      IF ABS(F)<= EPS THEN GO TO TESTFCONVERGENCE;
      G =Q(I);
      IF ABS(F)<ABS(G) THEN DO;
      H = ABS(G)*SQRT(1 + (F/G)**2);
      Q(I)=H;
      END;
      ELSE DO;
      IF F^=0 THEN DO;
      H=ABS(F)*SQRT(1 + (G/F)**2);
      Q(I) = H;
      END;
      ELSE DO;
      H=0;
      G(I)=0;
      END; END;
      IF H=C THEN DO;

```

```

G=1;
H=1;
END;
/* LO ANTERIOR REEMPLAZA Q(I)=H*SQRT(G*G+F*F) LO CUAL PUEDE DAR
RESULTADOS INCORRECTOS SI LOS CUADRADOS ESTAN INDEFINIDOS O
F=G=0
C=G/H;
S=-F/H;
END; END;
TESTCONVERGENCE;
Z = Q(K);
IF L=K THEN GO TO CONVERGENCE;
X=Q(L);
Y = Q(K - 1);
G = E(K - 1);
H = E(L);
F=((Y-Z)*(Y+Z)+(G-H)*(G+H))/(2*H*Y);
G = SQRT(F*F + 1);
IF F < 0 THEN F=((X-Z)*(X+Z) +H*(Y/(F-G)-H))/X;
ELSE F=((X-Z)*(X+Z)+H*(Y/(F+G)-H))/X;
/* SIGUIENTE TRANSFORMACION DE OR
I=1; C=1;
IF L+1=K THEN DO;
DO I=L+1 TO K; IF IPK(I) =1 THEN DO;
S= E(I); Y=Q(I); G= E(K); H= G(C);
IF ABS(Y)*ABS(C)*H THEN DO;
Z=ABS(S)*SQRT(1 + (F/H)*S); E(I-1)=Z; END;
ELSE DO;
IF F=0 THEN DO;
Z=ABS(F)*SQRT(1 + (F/H)*S); E(I-1) = Z; END;
ELSE DO;
I=0; E(I-1)=0; END;
END;
END;
IF I=0 THEN DO; I=1; F=1; END;
I= E(I); G= H(I);
F= (G+G)*G/3; G = -XIS + E(C); H= Y(S);
Y = Y(C);
DO J = 1 TO M; IF IPK(J) =1 THEN DO;
X = ABS(J)-1; Z= ABS(J);
H=ABS(J)-1; G= X(C);
H=J(I) = -XIS + E(C);
END; END;
IF ABS(E(I)*ABS(C)*H THEN DO;
Z= ABS(X)*SQRT(1 + (F/H)*S); Q(I-1)=Z; END;
ELSE DO;
IF F=0 THEN DO;
Z=ABS(F)*SQRT(1 + (F/H)*S); Q(I-1) = Z; END;
ELSE DO;
I=0; Q(I-1)=0; END;
END;
END;
IF I=0 THEN DO; I=1; F=1; END;
C=F(I); G=H(I);
F= (G+G)*G/3; G = -XIS + E(C); H= Y(S);
END; END;
END;
END;
GO TO TESTCONVERGENCE;
CONVERGENCE;
IF I=K THEN DO;
END;

```

```

DO J=1 TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
AB(J,K)=-AD(J,K);
  END; END;
END; END;
END;
RETURN;
END MINFIT;
/*
*/
SORT: PROCEDURE;
BEGIN;
/*  ARREGLA LOS ELEMENTOS DE 'D' Y SUS CORRESPONDIENTES COLUMNAS
    DE 'V' EN ORDEN DESCENDENTE
DCL K FIXED BINARY;
DCL S FLOAT (7);
DO I = 1 TO N-1; IF IPK(I) ^=1 THEN DO;
K = I; S = D(I);
DO J = I+1 TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
IF D(J) > S THEN DO;
K = J; S = D(J); END;
END; END;
IF K=I THEN DO;
D(K) = D(I); D(I) = S;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) ^=1 THEN DO;
S = V(J,I); V(J,I) = V(J,K); V(J,K) = S;
END; END;
END;
END;
END;
RETURN;
END SORT;
/*
*/
PRINT: PROCEDURE;
/*  LA VARIABLE FININ ES GLOBAL Y ESTIMA LOS VALORES DE F EN EL
MINIMO; USANDO SOLAMENTE PARA IMPRIMIR LOG(FX-FMIN)
IF PRINT = 0 THEN DO;
PUT SKIP EDIT(4 DE ITERACIONES)(A, E(7));
PUT SKIP EDIT(4 DE EVALUACION DE FUNCION)(A, F(7));
PUT SKIP EDIT(5 DIGITOS RESIDUAL DE CUADRADOS)(Y, A, E(10), S);
/*  SI LAS DOS PRIMERAS LINEAS SON OMITIDAS ENTONCES NO
    SE REQUIERE PRINT
IF FX=FMIN THEN PUT EDIT( INDEFINIDO)(COLUMN(60), A(17));
ELSE PUT LIST(LOG10(FX-FMIN));
IF N=4 THEN PUT SKIP;
IF N=4|PRINT = 2 THEN DO;
PUT SKIP;
PUT EDIT( PARAMETROS)(COLUMN(1), A(20));
DO I=1 TO N;
PUT LIST(X(I));
END; END;
PUT SKIP;
END;
RETURN;
END PRINT;
/*
*/
NOIPRINT: PROCEDURE;
DCL C CHARACTER(10);
DCL I CHARACTER(10);
DCL P CHARACTER(10);

```



```

DO I = 1 TO N; IF IPK(I) ^=1 THEN DO;
  T(I) = QA*Q0(I)+QB*X(I)+QC*Q1(I);
END; END;
END;
/* INCREMENTA EL CONTADOR DE LA EVALUACION DE FUNCION. */
NF=NF+1;
OBJ=F(T,N);
RETURN(OBJ);
END FLIN;
/*
DCL (K,DZ) FIXED BINARY;
DCL (X2,XM,F0,F2,FM,D1,T2,S,SF1, SX1) FLOAT (7);
SF1= F1; SX1 = X1;
K= 0; XM=0; F0= F; FM= FX;
IF (D2< MACHEPS) THEN DZ= 0;
ELSE DZ = 1;
/* ENCUENTRA EL TAMANO DEL PASO. */
S=0;
DO I=1 TO N; IF IPK(I) ^=1 THEN DO;
  S = S + X(I)**2;
END; END;
S= SQRT(S);
IF DZ=0 THEN T2 = M4*SQRT(ABS(FX)/DMIN + S*LDT)+M2*LDT;
ELSE T2 = M4*SQRT(ABS(FX)/(D2) + S*LDT)+M2*LDT;
S= M4*S + T;
IF D2=0 & (T2>S) THEN T2 = S;
IF T2 < SMALL THEN T2= SMALL;
IF T2 > (0.01*H) THEN T2 = 0.01*H;
IF FK=0 & (F1<=FM) THEN DO;
  XM = X1; FM = F1; END;
IF FK=1!(ABS(X1)<T2) THEN DO;
IF X1>=0.0000000 THEN X1=T2;
ELSE X1=-T2;
F1 =FLIN(X1);
END;
IF F1 <= FM THEN DO;
XM = X1; FM = F1; END;
ROJO: IF DZ=0 THEN DO;
/* EVALUA FLIN EN OTRO PUNTO Y ESTIMA LA SEGUNDA DERIVADA. */
IF F0 < F1 THEN X2 =-X1;
ELSE X2 =2*X1;
F2= FLIN(X2);
IF F2 <= FM THEN DO;
  XM = X2; FM=F2; END;
D2 = (X2*(F1-F0)-X1*(F2-F0))/(X1*X2*(X1-X2));
END;
/* ESTIMA LA PRIMERA DERIVADA EN CERO. */
D1 = (F1 - F0)/X1 - X1*D2;
DZ = 0;
/* PREDICE EL MINIMO */
IF D2<= SMALL THEN DO;
IF D1<0 THEN X2=H;
ELSE X2=-H;
END;
ELSE X2= -0.50000000*D1/D2;
IF ABS(X2)>H THEN DO;
IF X2 > 0 THEN X2 = H;
ELSE X2 = -H;
END;
/* EVALUA F EN EL MINIMO PREDICHO */

```

```

AZUL: F2 = FLIN(X2);
IF N=NITS & F2=F0 THEN DO: K=K+1;
/* SI NO SUCEDE ESTO PRUEBA OTRA VEZ. */
IF F0<F1 & (X1*X2)>0 THEN GO TO ROJO;
X2= 0.500000000*X2; GO TO AZUL;
END;
/* SE INCREMENTA EL CONTADOR DE BUSQUEDA EN UNA DIMENSION */
NI = NI + 1;
IF F2>FM THEN X2=XM;
ELSE FM=F2;
/* OBTIENE UNA NUEVA ESTIMACION DE LA SEGUNDA DERIVADA */
IF ABS(X2*(X2-X1))> SMALL THEN
D2=(X2*(F1-F0)-X1*(FM-F0))/(X1*X2*(X1-X2));
ELSE DO;
IF N=0 THEN D2=0; ELSE D2=D2; END;
IF D2<SMALL THEN D2=SMALL;
X1=X2; FX=FM;
IF SF1<FX THEN DO;
FX=SF1; X1=SX1; END;
/* CHECA X POR BUSQUEDA LINEAL PERO NO POR BUSQUEDA PARABOLICA */
IF J>0 THEN DO;
DO I=1 TO N; IF IPK(I)=1 THEN DO;
X(I)=X(I)+X1*V(I,J);
END; END; END;
RETURN;
END MNM;
/*
*/

```

```

QUAD: PROCEDURE;
/* BUSCA EL MINIMO A LO LARGO DE UNA CURVA,
DEFINIDA BY Q0,Q1 AND X */
DCL (L,S) FLOAT(7);
S=FX; FX=QF1; QF1=S; QD1=0;
DO I=1 TO N; IF IPK(I)=1 THEN DO;
S=X(I); X(I)=Q1(I); L=Q1(I); Q1(I)=S;
QD1=QD1+(S-L)*X2;
END; END;
L=SQRT(QD1); QD1=L; S=0;
IF QD0 > 0 & QD1 > 0 & NI >= (3*N*N). THEN DO;
J=0; NITS=2; IFK=0;
CALL MNM(J,NITS,S,L,QF1,IFK);
QA=L*(L-QD1)/(QD0*(QD0+QD1));
QB= (L+QD0)*(QD1-L)/(QD0*QD1);
QC=L*(L+QD0)/(QD1*(QD0+QD1));
END;
ELSE DO; FX=QF1; QA=0; QB=0; QC=1; END;
QD0=QD1; DO I=1 TO N; IF IPK(I)=1 THEN DO;
S=Q0(I); Q0(I)=X(I);
X(I)=QA*S + QB*X(I) + QC*Q1(I); END; END;
RETURN;
END QUAD;
/*
*/

```

```

DCL ILLC FIXED BINARY;
DCL (NI,NF,KL,KY,KTH) FIXED BINARY;
DCL (S,SL,DI,DRIN,FX,F1,LNS,LBT,SP,DE,QF1,QD0,QD1,QA,QB,QC,QND
, NC,NA,SMALL,VB,SMALL,LARGE,VLARGE,SCDD,LD,AC,T2) FLOAT(7);
DCL (B(50), Y(50), Z(50), Q0(50), Q1(50)) FLOAT(7);
DCL U(50,50) FLOAT(7);
/*
INITIALIZATION
*/

```

```

/* NUMEROS DEPENDIENTES DE LA MAQUINA. */
SMALL = MACHEFS**2; VSMALL = SMALL**2;
LARGE = 1/SMALL; ULARGE = 1/VSMALL;
M2 = SQRT(MACHEFS); M4 = SQRT(M2);
/* NUMEROS HEURISTICOS
*****
SI LOS EJES PUDIERAN SER MAL ESCALONADOS (LO CUAL DEBERA SER
EVITADO SI ES POSIBLE) ENTONCES SCBD=0; DE OTRA FORMA SCBD=1.
SI EL PROBLEMA SE SABE QUE ESTA MAL CONDICIONADO ILLC=0, DE
OTRA FORMA ILLC=1.
KTM+1 ES EL NUMERO DE ITERACIONES SIN MEJORAS ANTES QUE EL
ALGORITMO TERMINE. (VER APENDICE IV).
KTM=4 ES MUY PRECAVIDO USUALMENTE KTM=1 ES SATISFACTORIO.
SCBD = 1; ILLC = 1; KTM = 1;
IF ILLC = 0 THEN LDFAC = 0.1;
ELSE LDFAC = 0.01;
KT = 0; NI = 0; NF = 1; QF1 = F(X,N); FX = QF1;
T = SMALL + ABS(T); T2 = T; DMIN = SMALL;
IF H < 100*T THEN H = 100*T; LDT = H;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J)^=1 THEN DO;
IF I = J THEN V(I,J) = 1.000000000;
ELSE V(I,J) = 0.000000000;
END; END;
END; END;
D(1) = 0; QDO = 0;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO;
Q1(I)=X(I);
RO(I)=X(I);
END; END;
FX = F(X,N);
CALL PRINT;
/* CIRCUITO PRINCIPAL
***** */
L0: SF = D(1); D(1) = 0; S = 0;
/* MINIMIZA A LO LARGO DE LA PRIMERA DIRECCION */
J=1; NITS=2; IFK=1;
CALL MNM(J,NITS,D(1),S,FX,IFK);
IF S <= 0 THEN DO;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO;
V(I,1) = -V(I,1);
END; END;
END;
IF (SF <= 0.9*D(1)) | (0.9*SF >= D(1)) THEN DO;
DO I = 2 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO; D(I) = 0; END; END;
END;
DO K = 2 TO N; IF IPK(K)^=1 THEN DO;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO; Y(I)=X(I); END; END;
SF=FX;
IF (ILLC=0) | (KT>0) THEN ILLC=0;
ELSE ILLC=1;
L1: KL = K; DF = 0;
IF ILLC = 0 THEN DO;
/* PASO ALEATORIO PARA SALIRSE DE UN VALLE DE RESOLUCION. */
RND=RANDOM(IR);
PUT DATA(RND);
DO I=1 TO N; IF IPK(I)^=1 THEN DO;
/* PRAXIS ASUME QUE RANDOM REGRESA COMO UN NUMERO ALEATORIO
UNIFORMEMENTE DISTRIBUIDO ENTRE (0,1) Y QUE CUALQUIER INICIO
DEL GENERADOR DE NUMEROS ALEATORIOS YA HA SIDO HECHO.
DO J = 1 TO N; IF IPK(J)^=1 THEN DO; X(J) = X(J) + SF*V(I,J);

```

```

END; END; END; END;
FX=F(X,N); NF=NF+1;
END;
DO K2 = K TO N; IF IPK(K2)≠1 THEN DO;
SL=FX; S=0;
/* MINIMIZA A LO LARGO DE LAS DIRECCIONES NO-CONJUGADAS' */
NITS=2; IFK=1;
CALL MNM(K2,NITS,D(K2),S,FX,IFK);
IF ILLC = 0 THEN S = D(K2)*(S + Z(K2))**2;
ELSE S = SL - FX;
IF DF < S THEN DO; DF = S; KL = K2; END;
END; END;
IF (ILLC = 1)&(DF < ABS(100*MACHEPS*FX)) THEN DO;
/*SI NO SUCEDE QUE ILLC=1 ENTONCES PRUEBA UNA VEZ MAS CON ILLC=0 */
ILLC = 0; GO TO L1;
END;
IF (K = 2)&(PRIN > 1) THEN DO; SO='NUEVA D; CALL VECPRINT(EO,D,M);
END;
DO K2 = 1 TO K-1; IF IPK(K2)≠1 THEN DO;
/* MINIMIZA A LO LARGO DE LAS DIRECCIONES CONJUGADAS' */
NITS=2; IFK=1;
S=0; CALL MNM(K2,NITS,D(K2),S,FX,IFK);
END; END;
F1 = FX; FX = SF; LDS = 0;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
SL = X(I); X(I) = Y(I); SL = SL - Y(I); Y(I) = SL;
LDS = LDS + SL*SL;
END; END;
LDS = SQRT(LDS);
IF LDS > SMALL THEN DO;
/* SE SALE FUERA DE LA DIRECCION KL Y MINIMIZA A LO LARGO DE
UNA NUEVA DIRECCION CONJUGADA. */
DO I = KL-1 TO K BY -1; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J)≠1 THEN DO;
V(J,I+1) = V(J,I); END; END;
D(I+1) = D(I);
END; END;
D(K) = 0;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
V(I,K) = Y(I)/LDS;
END; END;
NITS=4; IFK=0;
CALL MNM(K,NITS,D(K),LDS,F1,IFK);
IF LDS <= 0 THEN DO;
LDS = -LDS;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
V(I,K) = -V(I,K);
END; END;
END;
END;
LDT = LDFAC*LDS; IF LDT < LDS THEN LDT = LDS;
FX = F(X,N);
CALL PRINT;
T2 = 0;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
T2 = T2 + X(I)**2;
END; END;
IC = UNISORT(T2) + 1;
/* DETERMINA SI EL TIPO DEL PASO
DEBE LA BITA DE LA DIRECCION.
IF LDS <= 0 ENTONCES TIPO DE PASO = 1

```

```

ELSE NT = NT + 1;
IF KT > KTM THEN GO TO L2;
END; END;
/* PRUEBA EXTRAPOLACION CUADRATICA EN CASO DE QUE SE ENCUENTRE
EN UN VALLE. */
CALL QUAD;
DN = 0;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
D(I) = 1/SQRT(D(I));
IF DN < D(I) THEN DN = D(I);
END; END;
IF PRIN > 3 THEN DO;
SO = 'NUEVAS DIRECCIONES; CALL MATPRINT(SO,U,N,N);
END;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) = 1 THEN DO;
S = D(J)/DN;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
V(I,J) = S*U(I,J);
END; END;
END; END;
IF SCBD > 1 THEN DO;
/* ESCALA LOS EJES PARA TRATAR DE REDUCIR EL NUMERO DE CONDICION */
S = VLARGE;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
SL = 0;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) = 1 THEN DO;
SL = SL + V(I,J)**2;
END; END;
Z(I) = SQRT(SL);
IF Z(I) < M4 THEN Z(I) = M4;
IF S > Z(I) THEN S = Z(I);
END; END;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
SL = S/Z(I); Z(I) = 1/SL;
IF Z(I) > SCBD THEN DO;
SL = 1/SCBD; Z(I) = SCBD;
END;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) = 1 THEN DO; V(I,J) = SL*V(I,J); END; END;
END; END;
/* TRASPONE V POR MINFIT */
DO J = 1 TO I-1; IF IPK(J) = 1 THEN DO;
DO I = 2 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
S = V(I,J); V(I,J) = V(J,I); V(J,I) = S;
END; END; END;
/* LOCALIZA EL VALOR SINGULAR DE DESCOMPOSICION DE "V". ESTO DA
LOS VALORES CARACTERISTICOS Y LOS EJES PRINCIPALES DE LA FORMA
DE APROXIMACION CUADRATICA SIN ELEVAR AL CUADRADO EL NUMERO DE
CONDICION. */
CALL MINFIT(N,MACHERS,VSMALL,U,D);
IF SCBD > 1 THEN DO;
/* SIN ESCALAMIENTO */
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
S = Z(I);
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) = 1 THEN DO;
V(I,J) = S*U(I,J);
END; END;
END; END;
DO I = 1 TO N; IF IPK(I) = 1 THEN DO;
- 1;
DO J = 1 TO N; IF IPK(J) = 1 THEN DO;

```

```

S = S + U(J,I)**2;
END; END;
S = SORT(S); D(I)=S*D(I); S=1/S;
DO J=1 TO N; IF IPK(J)≠1 THEN DO;
V(J,I) = S*V(J,I);
END; END;
END; END;
END;
DO I=1 TO N; IF IPK(I)≠1 THEN DO;
IF (DN*D(I)) > LARGE THEN D(I) = USMALL;
ELSE DO;
IF (DN*D(I)) < SMALL THEN D(I) = ULARGE;
ELSE D(I) = (DN*D(I))**(-2);
END;
END; END;
/* ORDENA LOS NUEVOS VALORES Y VECTORES CARACTERISTICOS. */
CALL SORT;
DMIN = D(N);
IF DMIN < SMALL THEN DMIN = SMALL;
IF (M2*D(1)) > DMIN THEN ILLC = 0;
ELSE ILLC = 1;
IF (PRIN>1)&(SCRD>1) THEN DO;
SO=FACTOR DE ESCALAMIENTO; CALL VECPRINT(SO,Z,N); END;
IF PRIN > 1 THEN DO;
SO=VALORES CARACTERISTICOS DE A; CALL VECPRINT(SO,D,N);
END;
IF PRIN > 3 THEN DO;
SO=VECTORES CARACTERISTICOS DE A; CALL MATPRINT(SO,U,N,N); END;
/*
SE REGRESA A CIRCUITO PRINCIPAL
*/
GO TO L0;
L2: IF PRIN>0 THEN DO;
FLAG=1; FX=F(X,N);
SO='LAS X' SON; CALL VECPRINT(SO,X,N); END;
END;
RETURN(FX);
END PRAXIS;
/*

```

FUNCION PRUEBA

```

F) PROCEDURE(X,N);
DCL X(50) FLOAT(7);
DCL N FIXED BINARY;
DCL (VELOC,NUMER,DENON,OBJ) FLOAT(7) INITIAL(0.0);
DCL S(3) FLOAT(7) INITIAL((1)0.0);
DCL HODO(10) FLOAT(7) INITIAL((10)0.0);
DCL K(50) FLOAT(7) INITIAL((50)0.0);
DO I = 1 TO N; IF X(I)≠0 THEN X(I)=1.0;
K(I) = X(I);
END;
OBJ = 0.0;
/* SE INCERTA LA ECUACION DE RESTRICION EN CASO DE EXISTIR.
ESTA ECUACION ES GENERADA POR EL PROGRAMA "PRO/EMKIN Y SE
ENCUENTRA ALMACENADA EN EL ARCHIVO DE RESULTADOS DEL PROGRAMA
LLAMADO "PANA/DATA".
DO I=1 TO N; X(I)=K(I); END;
DO J=1 TO N; S(1)=VELOC/JIB; S(2)=MIAO-LIB;
NUMER=0.0; DENON=0.0;
HODO=0.0;
/* SE INCERTA LA ECUACION DE VELOCIDAD QUE FUE GENERADA POR EL

```

```

PROGRAMA 'RES.PATH' Y QUE SE ALMACENA EN EL ARCHIVO DE
RESULTADOS DEL PROGRAMA LLAMADO 'RAMA'DATA'.
DEL (SRES;RES) FLOAT(7);
RES: LA DIFERENCIA ENTRE LA VELOCIDAD CALCULADA Y LA OBSERVADA.
SRES: LA DIFERENCIA PONDERADA POR LA VELOCIDAD OBSERVADA
(OTRAS PONDERACIONES PUEDEN SER USADAS)
RES=VELOC-VI(3,JJ3); SRES=RES/VI(3,JJ3);
OBJ = OBJ + RES*RES; /*PARA PONDERAR ; OBJ=OBJ+SRES*SRES;*/
IF FLAG = 1
  THEN PUT SKIP LIST(VI(3,JJ3),VELOC,RES,SRES);
END;
FLAG = 2;
RETURN(2);
END P.

```

PROCEDIMIENTO GENERAL DE PRUEBA

```

TEST: PROCEDURE(S,H,N)
DEL C CHARACTER(30) VARYING;
DEL H FLOAT(7);
/*PRINCIPAL*/
PUT SKIP EDIT(S)(COLUMN(1)-A(80));
PUT SKIP EDIT(1#H, H#H = H)(A(1),F(3,0),A(10),F(20,2));
/*PRINCIPAL DE PRUEBA*/
PUT SKIP(1);
END TEST;

```

ESTE ES EL PRINCIPIO DEL PROGRAMA

```

1. INICIO DEL GENERADOR DE NUMEROS ALEATORIOS
DEL IN FIRST RANDOM(7) INITIAL (5000);
DEL W(1) FLOAT(7) INITIAL (50)0.0);
DEL W(2) FLOAT(7);
DEL INVERT FIRST RANDOM;
DEL RANDOMS FLOAT(7);
DEL (NPLAC) FIRST RANDOM;
DEL (NO) FIRST RANDOM; DEL C CHARACTER(30) VARYING;
PRIN = 3.3; FLAG=0; N=0;
2. PRIMERA TARJETA DE DATOS: 1 DE PARAMETROS, 1 DE OBSERVACIONES
1 DE SUSTRATOS, MENOS DEL RECORDING, INVERT 0-90 - 1-91
SET LIST(VARIABLES,SO,INVERT);
PUT PAGE EDIT(2)(COLUMN(10)-A);
PUT EDIT(1) DE PARAMETROS(4); 1 DE DATOS EXPERIMENTALES(4);
1 DE SUSTRATOS (MS)(A-F(4));
3. SEGUNDA TARJETA DE DATOS: PARAMETROS INICIALES
DO I = 1 TO N; SET LIST (X(I)); ENDA;
PUT SKIP(3) EDIT(VALORES DE PARAMETROS INICIALES)(COLUMN(10)-A);
DO I = 1 TO N; PUT LIST(X(I)); ENDA;
4. TERCERA TARJETA DE DATOS: DATOS EXPERIMENTALES EN LA FORMA DE
PRIMER SUSTRATO, ... Y ULTIMA COLUMNA VELOCIDAD OBSERVADA.
PUT SKIP(3) EDIT(OBSERVACIONES EXPERIMENTALES)(COLUMN(10)-A);
DO J=1 TO N;
SET LIST(VI(1),VJ,VELOC,VELOC(3));
IF INVERT=1 THEN VELOC(3)=1-VELOC(3);
PUT SKIP LIST(VI(1),VJ,VELOC,VELOC(3));
END;
5. VALORES DE VELOCIDAD OBSERVADA

```

A P E N D I C E
METODO SIMPLEX

En general el método simplex es un proceso iterativo, en el cual los cálculos son iniciados con un conjunto de valores para las variables independientes que satisfacen las restricciones, y en el cual en cada ciclo iterativo se genera otro conjunto de valores que mejoran el valor deseado de la función objetivo. Este procedimiento se continúa hasta que la mejor función objetivo obtenible es encontrada. Es esencialmente una solución de prueba y error para el procedimiento ya formulado de tal manera que sigue un tratamiento matemático sistemático con el fin de reducir la labor involucrada. La base algebraica del método SIMPLEX del problema generalizado de n dimensiones es:

Ejemplo I. Problema general con restricciones de igualdad. Se sabe que una igualdad puede ser construida para incluir el caso de una restricción de desigualdad por medio del uso de variables de reducción. Por ejemplo: si la restricción toma la forma de:

$$a_{j1} x_1 + a_{j2} x_2 + \dots + a_{jn} x_n \leq b_j$$

una variable de reducción puede ser introducida de tal manera que una igualdad sea obtenida. Así, si x_{n+1} es adicionada con el entendimiento que es positiva, la restricción anterior se transforma en:

$$a_{j1} x_1 + a_{j2} x_2 + \dots + a_{jn} x_n + x_{n+1} = b_j$$

Si el problema original involucra n variables y m restricciones, de las cuales l son desigualdades y $m-l$ adicionales variables de reducción, el problema sería ahora uno de optimización de:

$$Z = \sum_{i=1}^n c_i x_i$$

$$\text{sueto } \sum_{i=1}^n a_{ij} x_i = b_j \text{ para } j = 1, 2, \dots, m.$$

Siendo un problema de N variables y m restricciones, siendo de las b_j y a_{ij} siendo cero o la unidad, con $N = n + l$.

Ejemplo II. Selección de una solución básica en un punto óptimo en la frontera. Como se sabe en cualquier problema lineal que involucra m restricciones donde la función involucra N variables, $N-m$ son las variables independientes que pueden ser asignadas arbitrariamente a las otras m variables no lo son, pero están definidas completamente por las restricciones en términos de las $N-m$ variables independientes.

Relacionando cualquiera de las $N-m$ variables de tal manera que sea cero, la mejor para este elección se dice "no óptimo". Entonces las otras m variables están completamente determinadas. La selección de variables en el lenguaje de programación lineal es llamada la solución básica de las restricciones o restricciones. Se sabe que cualquier una también podría ser el conjunto de N variables y m restricciones, pero no necesariamente así. La solución básica de un problema de programación lineal involucra m variables de restricción y $N-m$ variables independientes.

Se demostrará que el procedimiento para determinar el valor óptimo de la función objetivo (el cual caerá en una frontera) es primero encontrar cualquier solución posible básica del problema y entonces tratar de mejorar esta solución, obteniendo a la vez una secuencia de varias soluciones básicas que den valores mejorados de la función objetivo. Este procedimiento se demostrará que es equivalente a moverse a lo largo de las líneas de restricción en la frontera de vértice a vértice, definido por una solución básica, y no importa que vértice o solución básica es usada como punto de partida, con tal de que este sea posible.

Es una propiedad del sistema que si se determina tal conjunto de X_1 (con a positiva y $N-m = n$ como cero), esta solución representa un punto en un vértice de la región n -dimensional permitida.

Se ha dicho que un valor extremo puede situarse solamente en puntos particulares dentro de la región o en la frontera. Como una función lineal, el óptimo siempre caerá en una frontera. Es fácilmente demostrable que ya que se tienen ecuaciones de restricción lineales, el valor extremo puede normalmente caer solamente en la intersección de dos o más relaciones de restricción. Así en dos dimensiones, se tiene una situación como la que se muestra en la figura (A 5.1). Ya que "Y" se incrementa en la dirección mostrada, el valor extremo caerá en (c), por ejemplo, pero ya que se incrementa a lo largo de ella, el mejor valor al igual que (c) se encuentra que está al final de su región válida, por ejemplo en la intersección con (d). Solamente en el caso especial de las líneas que son paralelas a la restricción (c) se obtendrá el mismo valor de "Y" a lo largo de la línea (c). En este caso se deberá de tener en cuenta este resultado notando que en cada punto de (c) se encontrará el mismo valor de "Y". En otras palabras, no se necesita buscar en todas las fronteras cuando se trabaja con restricciones lineales; solamente se necesita buscar en los vértices de la región válida.

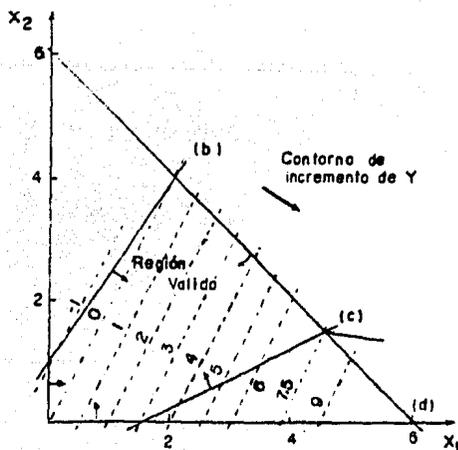


Figura A. 5.1 Gráfico de contorno para optimizar $Y = 2X_1 - X_2$ por las ecuaciones de restricción: (a) $X_1 \geq 0$, $X_2 \geq 0$, (b) $-3X_1 + 2X_2 = 6$, (c) $2X_1 + X_2 = 4$, (d) $X_1 + X_2 = 6$.

Se ha visto que en Problemas de dos dimensiones el vértice se define por la intersección de dos restricciones lineales; en tres dimensiones por tres restricciones lineales (fig. A 5.2); y en n -dimensiones, el vértice está dado por la intersección de n -superficies. Fue el propósito de obtener soluciones válidas, 'soluciones básicas' que caían en un vértice, que se escogió $N-m$ valores de X_i que fueran cero. Así las n variables de decisión permitiendo $N-m$ valores de igualdad de restricción que intersectaran. Las otras m variables se tomaron como no negativas. Una vez que el nuevo problema N -dimensional se ha creado, no se hacen distinciones posteriores entre las variables originales y las variables de reducción.

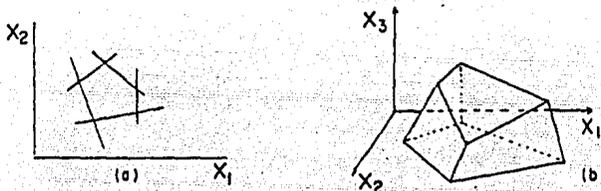


Figura A 5.2 La estructura de los vértices. (a) Polígono en dos dimensiones; (b) Poliedro en tres dimensiones.

Paso III. Reacomodo de las funciones de restricción y objetivo. En esta etapa es conveniente reacomodar las restricciones y las funciones objetivo de tal manera que la función objetivo y las m variables de la base sean expresadas solamente en términos de las restantes $N-m$ variables; las que son iguales a cero en la primera solución básica.

Esto se puede lograr resolviendo las m ecuaciones de restricción para las m variables de la base.

Paso IV. Cambios en X_i para mejorar la función objetivo en la búsqueda de un nuevo vértice. Se ve del paso anterior que ya que las variables no básicas son cero, las variables en la base son tienen su valor según se dio de la primera solución básica. Ahora se alterará una de las variables no básicas con el fin de tratar de mejorar la función objetivo y aún satisfacerla. La selección de la variable más útil se basa en encontrar por consideración de la función objetivo como se describe en el Paso III. Si se desea incrementar la función objetivo se deberá buscar una variable tal que cuando se incrementa el valor (solo puede incrementarse ya que inicia en cero y no puede ser negativo) mejore la función objetivo. Esto será el caso de cualquier variable en la función objetivo que tenga un coeficiente positivo. Si varias variables contienen coeficiente positivo, se escoge el que sea mayor de tal manera que el objetivo es obtenido más rápidamente, porque no hay garantía que esto sea cierto. Por el contrario, si se desea encontrar el valor más pequeño de la función objetivo, se escoge aquella variable cuyo coeficiente sea negativo y de mayor valor.

Después de decidir cuál de las variables no básicas será incrementada de su valor de cero, se debe considerar que tanto se incrementa. Esto es necesario ya que al cambiar cualquier una de las restricciones se mueven los otros vértices y debe asegurarse que cualquier cambio que se haga no viola alguna de las restricciones. Cuando una variable básica es cambiada, una de las restricciones básicas puede ser violada.

Se verá que si la variable no básica tiene un coeficiente positivo la nueva forma de la ecuación de restricción rearrreglada, no habrá límite a su incremento; pero si el coeficiente es negativo, el incremento será limitado por la relación del valor de la variable base a su coeficiente.

Al final del cambio se tiene una nueva base, una nueva solución básica, y un nuevo valor de la función objetivo.

En general, debemos tener una elección de $N-m$ direcciones de movimiento de cada vértice; estas direcciones corresponden a la elección de una X_i de las variables no básicas, y a un movimiento a lo largo de una restricción hacia un nuevo vértice; así en dos dimensiones tendremos dos alternativas de movimiento cuando todas las restricciones sean iguales.

Paso V. Repetición del procedimiento anterior en la búsqueda de otros vértices. Habiendo alcanzado un vértice adyacente representado por una nueva solución básica, deberemos de repetir el mismo procedimiento, pasos III y IV, hasta que una solución básica final (y el vértice) es encontrada cuando no podemos movernos más sin afectar los valores finales de la función objetivo. Este punto será la localización del valor óptimo del valor de la función objetivo. Como se ilustra para el caso de dos dimensiones, el mismo procedimiento algebraico nos proporcionará las direcciones requeridas para cada caso de un vértice, y no está limitado para casos que tienen una representación geométrica en dos o tres dimensiones.

En la práctica, el procedimiento algebraico que acabamos de ilustrar no es usado en esta forma. El método SIMPLEX presenta un método más corto de obtener el mismo resultado que el método algebraico, pero lo hace de una manera tal, usando un conjunto de reglas que no hacen necesario considerar la transformación algebraica, requiriendo solamente seguir un procedimiento fijo equivalente.

Algunas dificultades resultantes en el método SIMPLEX.

Las dificultades que pueden aparecer en el método SIMPLEX son las siguientes:

1) En la elección de una solución básica primaria ninguna puede ser obvia o puede existir.

2) Habiendo construido el primer arreglo, la variable que será introducida en la base debe ser seleccionada; esto es llevado a cabo normalmente seleccionando el coeficiente más negativo para un máximo o el más positivo para un mínimo. Obviamente pudiera no haber teoría en la función objetivo si solamente permanecen coeficientes de signo contrario. En el caso de coeficientes iguales o iguales a cero resulta una solución múltiple.

3) La variable que será retirada de la base se decide usando la relación positiva más pequeña entre los coeficientes de la primera columna y la columna pivote (que corresponden a la variable que se adiciona a la base). Si no hay solución positiva o solamente hay valores iguales a cero el resultado es infinito y si hay más de un valor idéntico con la relación positiva más pequeña el resultado será arbitrario de las elegidas.

El desarrollo de este estudio fue el método SIMPLEX para el problema de los coeficientes de igualdad y una restricción de igualdad.

debera ser insertada en la subrutina QBJFUT. El programa tal como se presenta aqui, no permite hacer calculos con expresiones de velocidad que tengan restricciones. Los detalles de los demás datos se dan en el Programa (ver Tabla A 5.1).

El resultado del programa se forme con: (a) los valores iniciales de las constantes y el intervalo de variación que se determina como dato del problema (si se alimentaron valores máximos y mínimos de las constantes, también apareceran estos); (b) valor de la función objetivo con los valores iniciales; (c) el valor de las constantes que el programa determinó en ser por que cumplio con los límites de error asignados o bien al final de las (HTR) iteraciones, que se permite con el programa calcularse, de cualquier forma el programa informa en esta iteración tallo; y (d) el valor de la velocidad calculada; la velocidad experimental y la diferencia entre el valor calculado y el experimental.

Tabla A 5.1 Datos de entrada para el programa del Apéndice U.

TARJETA	DATO	COLUMNAS	OBSERVACIONES
1	N	1 - 6	NUMERO DE CONSTANTES A ESTIMAR CONDICION DE RESTRICCIÓN NUMERO DE ITERACIONES
	M	7 - 12	
	HTR	13 - 18	
2	ERROR	1 - 20	ERROR PERMITIDO
3	X ₀	4120	VALOR INICIAL (X), VARIACION DE (X)
	Max		VALOR MAXIMO Y MINIMO DE (X) DONDE
	Min		(X) ES EL VALOR DE LAS CONSTANTES
4	V(I ₀)	24000	VALOR DE LAS CONCENTRACIONES DE
	I = 1:2:100	de	TRAZO LOS SUBSTRATOS Y POR ULTIMO
	datos experimentales		LA VELOCIDAD EXPERIMENTAL
	número de control		
	los "velocidad"		
	observada		

Formato de salida del programa del Apéndice V.

.25000E+09 .10000E+07

.35000E+03 .10000E+02

.10000E+08 .50000E+06

.10000E+05 .50000E+03

.10000E+10 .10000E+08

.36000E+04 .10000E+03

.10000E+05 .50000E+03

.40000E+06 .50000E+04

VALOR DE LA FUN DEJ: .805776E+07

EL MINIMO ESTA EN

X(1) = .2517887E+09

X(2) = .3792167E+03

X(3) = .9755176E+07

X(4) = .1016129E+05

X(5) = .9290745E+09

X(6) = .3640655E+04

X(7) = .1052738E+05

X(8) = .4033872E+06

EL MINIMO ES: .6867982E+07

TAMAÑO DE SIMPLEX= .2891322E+16

INTER. NO= 15

EN EL VALOR DEL PARAMETRO:

.64107E+05 .12820E+04 .15599E-04

.28950E+05 .12490E+04 .34533E-04

.12427E+05 .77208E+03 .80472E-04

.88651E+04 .74348E+03 .11280E-03

.48864E+04 .65770E+03 .20435E-03

.35009E+04 .61004E+03 .28544E-03

.38293E+01 .16585E+04 .26114E+00

.26806E+01 .15300E+04 .37305E+00

.19138E+01 .13730E+04 .52252E+00

.11979E+01 .11440E+04 .83337E+00

.89355E+00 .99610E+03 .11191E+01

.57433E+00 .70920E+03 .17411E+01

.29350E+00 .43300E+03 .34071E+01

PRINCIPIO

PASAR EL SISTEMA A LA FORMA ESTANDAR
AGREGANDO VARIABLES DE HOLGURA Y
DEJAR TODOS LOS TERMINOS INDEPENDIEN
TES POSITIVOS

ESCRIBIR LA FUNCION OBJETIVO EN
TERMINOS DE VARIABLES NO BASICAS

¿SON TODOS LOS
COEFICIENTES DE LA FUNCION
OBJETIVO POSITIVOS
O CERO?

LA SOLUCION
ES UN MAXIMO

ESCOGER LA VARIABLE ENTRANTE COMO AQUELLA
QUE TENGA EL COEFICIENTE MAYOR NEGATIVO
DENTRO DE LA FUNCION OBJETIVO

ESCOGER LA VARIABLE SALIENTE COMO AQUELLA
QUE SE HACE MAS PRONTO CERO AL INCREMENTAR
LA VARIABLE SALIENTE

¿EXISTE VARIABLE
SALIENTE?

SOLUCION NO
ACOTADA

FIN

Fig. A 5.3 Diagrama de flujo del programa del Apéndice V.

Listado del Programa del Apéndice V.

```

C *****
C * ESTE ES UN PROGRAMA DE OPTIMIZACION USANDO EL METODO *
C * S I M P L E X *
C *****
C ESTE PROGRAMA ESTA EN FORTRAN.
C ESTE ES EL PROGRAMA PRINCIPAL. LA FUNCION OBJETIVO RESIDE EN
C LA SUBROUTINA OBJFUT.
C EL PROGRAMA REQUIERE DE LAS SIGUIENTES SUBROUTINAS: ARRANG,
C POINT, OBJFUT, OBJFUN, LAS SUBROUTINAS OPCIONALES SON: INITIA
C Y RANDUM.
C UNO ALIMENTA EL NUMERO DE VARIABLES (N) Y EL NUMERO DE CONDI-
C CIONES DE RESTRICCION (M), N=0 PARA PROBLEMAS SIN RESTRICCION
C N=-1 LIMITE SOBRE VARIABLES- M= NUMERO DE RESTRICCIONES FUN-
C CIONALES ( TAMBIEN TIENE CONDICIONES A LA FRONTERA), CON FUN-
C CION DE RESTRICCION EXTERNA SE DEBE AGREGAR AL PROGRAMA UNA -
C SUBROUTINA LLAMADA CONFUN.
C EL CRITERIO DE DETENCION ES NECESARIO ENTENDERLO BIEN PARA
C PODER MODIFICARLO CUANDO SEA NECESARIO.
C
C ESTE PROGRAMA ES DE PRECISION SENCILLA EN FORTRAN IV.
C LA VARIABLE NCONF ESTA DISPONIBLE PARA QUE EL USUARIO CONTROLE
C LA OPCION EN OBJFUN Y OBJFUT.
C EL USUARIO PROPORCIONA LA SUBROUTINA OBJFUT QUE CONTIENE LA --
C FUNCION OBJETIVO A SER MINIMIZADA-----
C ----- VER COMENTARIOS EN ESTA SUBROUTINA PARA MAYOR EXPLI-
C CACION AL RESPECTO.
C
C LOS DATOS DE ENTRADA REQUERIDOS POR EL PROGRAMA SON:
C (1) N DE PARAMETROS- CONDICIONES DE RESTRICCION(M=0,-1 ETC.),
C Y MAXIMO NUMERO DE ITERACIONES (316 FORMAT).
C (2) ERROR TOLERABLE (E20.5 FORMAT).
C (3) PARA CADA PARAMETRO: ENTRADA DE ESTIMACION INICIAL, TAMAÑO
C DE PASO Y LIMITE SUPERIOR Y LIMITE INFERIOR DE LOS PARAME-
C TROS, SI SON APROPIADOS (4E20.5 FORMAT).
C (4) PARA LOS DATOS EXPERIMENTALES: ENTRADA DE LA CONCENTRACION
C DE SUSTRATO ADECUADA (S) Y VELOCIDAD OBSERVADA
C (E20.5 FORMAT).
C PARA MAS DETALLES VER COMENTARIOS EN LA SUBROUTINA OBJFUT.
C
C
C FILE 1(TITLE='ARCH'/'SPX',KIND='DISK',MAXRECSIZE=10,BLOCKSIZE=0,
C 1 ARCAD=1,AREASIZE=14,SAVEFACTOR=3,NEWFILE=TRUE)
C DIMENSION X(20),Y(20),P(20),CEN(20),PMAX(20),PNTN(20),
C 1 DEL(20),XTEMP(20),V(3,60)
C 05 0000 N=1,20
C 06 0000
C 07 0000
C 08 0000
C 09 0000
C 10 0000
C 11 0000
C 12 0000
C 13 0000
C 14 0000
C 15 0000
C 16 0000
C 17 0000
C 18 0000
C 19 0000
C 20 0000
C 21 0000
C 22 0000
C 23 0000
C 24 0000
C 25 0000
C 26 0000
C 27 0000
C 28 0000
C 29 0000
C 30 0000
C 31 0000
C 32 0000
C 33 0000
C 34 0000
C 35 0000
C 36 0000
C 37 0000
C 38 0000
C 39 0000
C 40 0000
C 41 0000
C 42 0000
C 43 0000
C 44 0000
C 45 0000
C 46 0000
C 47 0000
C 48 0000
C 49 0000
C 50 0000
C 51 0000
C 52 0000
C 53 0000
C 54 0000
C 55 0000
C 56 0000
C 57 0000
C 58 0000
C 59 0000
C 60 0000
C 61 0000
C 62 0000
C 63 0000
C 64 0000
C 65 0000
C 66 0000
C 67 0000
C 68 0000
C 69 0000
C 70 0000
C 71 0000
C 72 0000
C 73 0000
C 74 0000
C 75 0000
C 76 0000
C 77 0000
C 78 0000
C 79 0000
C 80 0000
C 81 0000
C 82 0000
C 83 0000
C 84 0000
C 85 0000
C 86 0000
C 87 0000
C 88 0000
C 89 0000
C 90 0000
C 91 0000
C 92 0000
C 93 0000
C 94 0000
C 95 0000
C 96 0000
C 97 0000
C 98 0000
C 99 0000
C 100 0000

```

```

1000 FORMAT (3I6)
      NF=0
      N1=N+1
      N2=N+2
      AN=N
      A2N=2./N
      A1=-1.
      B1=-2.
      C1=-0.5
      D1=0.5
C     WRITE (IOPT,1334)
1334  FORMAT(///'ALIM. ERROR PERMITIDO,EN FORMAT E20.5//')
      READ (5,1977) ERROR
1977  FORMAT(E20.5)
      NOBJ=0
130   CONTINUE
      HALF=0.5
      OLDSBY=1.0E11
      BB= 5
      CC=2.0
      IGOOD=0
      NRUN=0
      INIT=1
C     WRITE (IOPT,1447)
1447  FORMAT(///'ALIM. PARA CADA VARIABLE EL PUNTO/
1     ' INICIAL DE ARRANQUE, TAMANO DE PASO, (RANGO MAX Y/
1     ' RANGO MIN SI ES APROPIADO), EN FORMAT 4E20.5//')
      DO 1 I=1,N
      IF (N.NE.0) GO TO 1979
      READ (5,1702) X(1,I),DEL(I)
1702  FORMAT (2E20.5)
      GO TO 1335
1979  READ (5,1001) X(1,I),DEL(I),PMAX(I),PMIN(I)
1001  FORMAT(4E20.5)
1335  CONTINUE
      IF (N.NE.0) GO TO 1336
      WRITE (1,1337) X(1,I),DEL(I)
1337  FORMAT(/2(2X,E14.5))
      GO TO 1338
1336  CONTINUE
      WRITE (1,1002) X(1,I),DEL(I),PMAX(I),PMIN(I)
1002  FORMAT (/4(2X,E14.5))
1338  CONTINUE
1     F(I)=X(1,I)
      NRUN=0
      CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CCN,IACC,NFUN+NOBJ,M)
      WRITE (1,1003) OBJ
1003  FORMAT(/// VALOR DE LA FUN OBJ:  (E14.5)
1     Y(1)=OBJ
      DO 2 IJ=1,N
      DO 3 J=1,N
      IF (IJ.EQ.J) GO TO 5
      X(IJ+1,J)=X(1,J)
      GO TO 3
5     X(IJ+1,J)=X(1,J)+DEL(IJ)
3     F(J)=X(IJ+1,J)
      NRUN=2
      CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CCN,IACC,NFUN+NOBJ,M)
1     Y(IJ+1)=OBJ
2001  CONTINUE
      CALL ARRANG(M,N,NBY,NBY)

```

```

DO 6 J=1,N
X(N2,J)=0.0
DO 7 I=1,N1
IF (I.NE.MAXY) X(N2,J)=X(N2,J) + X(I,J)
7 CONTINUE
CEN(J)=X(N2,J)/AN
6 CEN(J)=X(MINY,J)
CONTINUE
DO 8 I=1,N
8 XTEMP(I)=X(MAXY,I)
NFUN=2
CALL POINT(A1,P,XTEMP,CEN,N)
CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
DO 9 I=1,N
9 X(N2,I)=P(I)
OBJ1=OBJ
IF(OBJ.GE.Y(MINY)) GO TO 20
IF(IACC-1)10,104,10
10 CALL POINT(BJ,P,XTEMP,CEN,N)
NFUN=2
CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
IF (OBJ.GE.Y(MINY)) GO TO 104
IF (OBJ1.LT.OBJ) GO TO 104
Y(MAXY)=OBJ
DO 11 I=1,N
11 X(MAXY,I)=P(I)
GO TO 500
104 OBJ=OBJ1
Y(MAXY)=OBJ1
DO 12 I=1,N
12 X(MAXY,I)=X(N2,I)
P(I)=X(N2,I)
GO TO 500
20 IC=20
DO 21 I=1,N1
IF (I.EQ.MAXY) GO TO 21
IF (OBJ1.GT.Y(I)) IC=IC+1
21 CONTINUE
IF (IC.NE.N) GO TO 104
103 CALL POINT(C1,P,XTEMP,CEN,N)
NFUN=2
CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
IF (OBJ.GT.Y(MAXY)) GO TO 23
Y(MAXY)=OBJ
DO 22 I=1,N
22 X(MAXY,I)=P(I)
GO TO 500
23 CALL POINT(D1,P,XTEMP,CEN,N)
NFUN=2
CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
IF (OBJ.LT.Y(MAXY)) GO TO 41
DO 107 I=1,N1
IF (I.EQ.MINY) GO TO 107
DO 24 J=1,N
24 X(I,J)=(X(I,J)+X(MINY,J))/2.0
C(I,J)=X(I,J)
NFUN=2
CALL OBJFUN(OBJ,P,N,M,PMAX,PMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
OBJ=OBJ1
DO 25 I=1,N
25 X(I,J)=P(I,J)

```

```

-107 CONTINUE
      GO TO 500
41    Y(MAXY)=OBJ
      DO 42 I=1,N
42    X(MAXY,I)=F(I)
500   SQY=0.0
      DO 105 I=1,N1
          IF (I.EQ.MINY) GO TO 105
      DO 1997 JJJ=1,N
          SQYY=X(I, JJJ)-X(MINY, JJJ)
1997  SQY=SQY+SQYY*SQYY
          SQYY=Y(I)-Y(MINY)
          SQY=SQY+SQYY*SQYY
105   CONTINUE
      EGY=SQY*1.0
          IF (Y(MINY).GE.OLDSQY) GO TO 66
          OLDSQY=Y(MINY)
          IGOOD=IGOOD+1
C     SALIDA INTERMEDIA CADA NN VEZ UN PUNTO MEJOR HA SIDO ENCONTRADO
C     NN=5 EN ESTE EJEMPLO
          NN=5
          IF (IGOOD.LE.NN) GO TO 66
1932  IGOOD=0
          WRITE (1,1101) SQY,MRUN
1101  FORMAT(// ' TAMANO DE SIMPLEX=(E14.7, ' INTER. NO= '
1     1 I4//5X, EN EL VALOR DEL PARAMETRO: //)
          DO 43 J=1,N
43    WRITE (1,1102) X(MINY, J)
1102  FORMAT(10X, E14.6)
          WRITE (1,1103) Y(MINY)
1103  FORMAT(// ' VALOR DE LA FUNCION OBJETIVO=(E14.7)
36    IF(Y(MINY).GE.ERROR) GO TO 67
          IF(SQY.LT.ERROR) GO TO 2000
67    MRUN=MRUN+1
          IF(MRUN-MTR)2001,2000,2000
2000  CALL MFRANG(N1, Y-MAXY, MINY)
          WRITE (1,1105)
1105  FORMAT(/// ' EL MINIMO ESTA EN ' /)
          DO 52 I=1,N
          P(I)=X(MINY, I)
52    WRITE (1,1106) I, X(MINY, I)
1106  FORMAT(// ' X(12, ) = (E14.7)
          WRITE (1,1107) Y(MINY)
1107  FORMAT(// ' EL MINIMO ES: ' (E14.7)
          WRITE (1,1101) SQY,MRUN
          NFUN=10
          CALL OBJFUT(OBJ,P,NFUN,U)
          LOCK 1
          STOP
C     F I N   D E L   P R O G R A M A .
      END
C     B L O Q U E   D E   S U B R U T I N A S .
SUBROUTINE OBJFUN(OBJ,X,N,M,XMAX,XMIN,HALF,CEN,IACC,NFUN,NOBJ,U)
DIMENSION X(20),XMAX(20),XMIN(20),CF(20),CEN(20)
DIMENSION U(3,60)
NOBJ=NOBJ+1
IACC=0
IF(M) 100,104,102
100  DO 1 I=1,M
      IF (X(I).GT.XMAX(I)) GO TO 102
      IF (X(I).LT.XMIN(I)) GO TO 102

```

```

1     CONTINUE
      IF(M,LE,0) GO TO 104
      CALL CONFUN(M,N,X,CF)
      DO 2 I=1,M
1     IF(CF(I)) 2,2,103
      CONTINUE
      GO TO 104
103   IACC=1
      IC=0
      DO 3 I=1,N
          X(I)=HALF*X(I)+(1,0-HALF)*CEN(I)
          IF (ABS(X(I)-CEN(I)-.0001)) 4,3,3
4     IC=IC+1
      CONTINUE
      IF (IC,LT,N) GO TO 102
104   CALL OBJFUT(OBJ,X,NFUN,U)
      RETURN
      END
      SUBROUTINE CONFUN(N,M,X,CF)
      DIMENSION X(20),CF(20)
C     LA FUNC DE RESTRICCION BUSCA CF(I) MENOR O IGUAL A CERO
      RETURN
      END
      SUBROUTINE POINT(A,P,PH,CEN,N)
      DIMENSION P(20),PH(20),CEN(20)
      DO 1 I=1,N
          P(I)=A*PH(I)+(1,0-A)*CEN(I)
1     CONTINUE
      RETURN
      END
      SUBROUTINE ARRANG(N,X,MAXX,MINX)
      DIMENSION X(21)
      MAXX=N
      MINX=N
      NM1=N-1
      DO 1 I=1,NM1
          IF (X(I).GT,X(MAXX)) MAXX=I
          IF (X(I).LT,X(MINX)) MINX=I
1     CONTINUE
      RETURN
      END
C     SUBROUTINA DE LA FUNCION OBJETIVO
      SUBROUTINE OBJFUT(OBJ,X,NF,U)
C     NP: # DE DATOS (PUNTOS)
C     X(1),X(2),ETC.,SON PARAMETROS QUE SERAN AJUSTADOS POR EL PROGRAMA
C     U(1,I): LA CONCENTRACION DEL SUBSTRATO
C     U(2,I): CA, CONCENTRACION DEL SUBSTRATO
C     U(3,I): LA VELOCIDAD DE REACCION OBSERVADA
C     ANUM: EL NUMERADOR DE LA ECUACION DE VELOCIDAD
C     ADE: EL DENOMINADOR DE LA ECUACION DE VELOCIDAD
C     OBJ: VALOR DE LA FUNCION OBJETIVO
      DIMENSION X(20),S(2),U(3,60)
      NP=21
      IF (NF.GT,1) GO TO 10
      DO 20 I=1,NP
          READ(S,1)U(1,I),U(2,I),U(3,I)
          FORMAT (3E0,5)
20     CONTINUE
      OBJ=0.
      DO 30 I=1,NF
          Z(I)=U(1,I)
          Z(I)=U(1,I)

```

```
S(2)=V(2,I)
A1=S(1)*S(2)
A2=S(1)*A1
ANUM=X(1)*S(2)+X(2)*A1+X(3)*A2
ADE=1.+X(4)*S(1)+X(5)*S(1)*S(1)+X(6)*S(2)
ADE=ADE+X(7)*A1+X(8)*A2
VEL=ANUM/ADE
C   VEL----VELOCIDAD CALCULADA
V1=(VEL-V(3,I))/VEL
C   V1 ----DIFERENCIA ENTRE LA CALCULADA Y LA OBSERVADA COMPARADA
C           ENTRE LA CALCULADA. OTROS FACTORES DE COMPARACION PUEDEN
C           SER USADOS
DEJ=DEJ+V1*V1
IF(NF.NE.10) GO TO 30
V1=1./VEL
WRITE (1,2)VEL,V(3,I),V1
2  FORMAT(3E15,5)
30  CONTINUE
RETURN
END
C   FIN DEL BLOQUE DE SUBROUTINAS
```

B I B L I O G R A F I A

- 1) Aunstrup, K.; Production of Extracellular Enzymes, A. Biochem. & Bioeng., Vol. 2, pp. 20-35, Academic Press, 1977.
- 2) Bresin, I. V.; Varfolomeev, S. D.; Energy Related Applications of Immobilized Enzymes, A. Biochem. & Bioeng., Vol. 2, pp. 259-260, 274-277, Academic Press 1977.
- 3) Beveridge & Schecliter; Optimization, Theory and Practice, MacGraw Hill, --- Tokio 1970.
- 4) Bhagavan, N. V.; Bioquímica; Cap. 2; 1a. edición; Interamericana; México 1980.
- 5) Bohinski, R.C.; Bioquímica, Cap. 6, pp. 150-160, Fondo Educativo Interamericano, EUA 1978.
- 6) Brent, R. P.; Algorithms for Minimization without Derivatives; Cap. 7, Prentice Hall, New Jersey 1973.
- 7) Bruchmann, E. E.; Bioquímica Técnica; Cap. 2, pp. 34-35; Ed. Acribia, España - 1980.
- 8) Cha, S.; A simple method for derivation of rate equations for enzyme catalyzed reactions under rapid equilibrium assumption or combined assumption of equilibrium and steady state; The J. of Biological Chem., Vol. 76, pp. 104-137, (1963).
- 9) Cleland, W. W.; The kinetics of enzyme catalyzed reactions with two or more -- substrates or products, I. Nomenclature and rate equations; Biochem. et Biophys. Acta, Vol. 67, pp. 104-137, (1963).
- 10) Conn, E. E.; Stumff; Bioquímica Fundamental; Cap. 8, pp. 213-216, 3a. edición; LIMUSA; México 1980.
- 11) Dixon, M.; Webb, E. C.; Thorne, C. J.; Tipton, D. F.; Enzymes; 3a. Ed.; Cap. 4; pp. 96-103; Longman Group Ltd., 1979.
- 12) Hanes, C. S., et al.; Can. J. Biochem.; 50, 1385 (1972).
- 13) Holland, C. D.; Anthony, R. G.; Fundamentals of Chemical Reaction Engineering; Sec. I, Cap. 1; Prentice Hall; USA 1979.
- 14) Huang, C. V.; Derivation of initial velocity and isotope exchange rate ---- equations; Methods in Enzymology; Vol. 63, Cap. 4, pp. 56-62; Academic Press, -- 1979.
- 15) King, E. F., & Altman, C.; A schematic method of deriving the rate law for - enzyme catalyzed reactions; J. of Physical Chem., Vol. 6; pp. 1375-1378 (1965).
- 16) Kuo, S. S.; Computer Applications of Numerical Methods, Cap. 8, pp. 176-199, - Adison Wesley, USA 1972.
- 17) Lam, C. F., & Priest, D. G.; Enzyme kinetics systematic generation of valid King-Altman patterns, Biophysical J., Vol. 12, pp. 240-250, (1972).

- 18) Lam, C. F.; Techniques for analysis and modelling of enzyme Kinetics mechanisms; Research Studies Press, Cap. 1, 1982.
- 19) Lehninger, A. J.; Bioquímica; Parte I, Cap. 8 y 9; Ediciones Omega; España 1980.
- 20) Lilly, M. D.; Production of Intracelular Microbial Enzymes; Applied Biochem. & Bioeng.; Vol. 2, pp. 1-4, Academic Press 1977.
- 21) Luthe, R., Olivera, A., Schutz, F.; Métodos numéricos; Ed. LIMUSA, -- México 1978.
- 22) Messing, R. A.; Immobilized Enzymes for Industrial Reactors; Cap. 1, -- pp. 6-7; Academic Press, Londres 1975.
- 23) Powell, M. L. D.; A method for minimizing a sum of squares of nonli---near function without calculating derivatives; Computer J.; pp. 303-307, -- (1965).
- 24) Reference Manual. FORTRAN, B 6000/B 7000 SERIES; BURROUGHS; USA 1978.
- 25) Reference Manual. CANDE Language. B 6000/B 7000 SERIES; BURROUGHS, USA-1981.
- 26) Reference Manual, PL/I, B 6000/B 7000 SERIES; BURROUGHS, USA 1978.
- 27) Segel, I. H.; Enzymes Kinetics behavior and analysis of rapid equili---brium and steady enzyme systems; Wiley, N.Y., 1975.
- 28) Smith, C.S., 1962; The automatic computation of maximum likelihood estima---tes; NCD Sci. Dept. Report SC 846/MR/40. (7.1.7.3).
- 29) Sweigart, R. D.; Industrial Applications of Immobilized Enzymes; A. Biochem. & Bioeng.; Vol. 2, pp. 209-210, Academic Press 1977.
- 30) VanDogen, B. D.; Cooney, D. O.; Effect of Dissociation and Association---on Enzyme Kinetics; AIChE J., Vol. 22, No. 5, 921 (1976).
- 31) Wang, J.T.; Kinetics of Enzyme Mechanims, Cap. 2, pp. 15-17, Academic - Press, 1975.
- 32) Wang, K.T.; On a new method for the analysis of electric networks; Aca---demic Sinica Inst. Eng. Momoir 2, 1934.
- 33) Watson, J.D.; Biología Molecular del Gen; Cap. 2 pp. 30-40 y 48-52; Fon---do Educativo Interamericano; 3a. Ed., España 1978.
- 34) Weinberg, G. M.; Programación PL/I; Ed. LIMUSA; México 1973.
- 35) Weiss, E.; PL/I para usuarios de FORTRAN; Ed. LIMUSA; México 1981.
- 36) White, Handler, Smith; Principles of Biochemistry; Parte 2, Cap. 10, - 11 y 12; McGraw Hill; Japon 1973.
- 37) Wong, J. T.; Kinetics of enzyme mechanisms: Cap. 1, 9, 10 y 11; Aca---demic Press; 2a. Ed.; Londres 1977.