



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDRÓLISIS DE ALQUIL ÉSTERES DE  
SULFATO CATALIZADO POR LA ENZIMA SdsA1 DE *Pseudomonas*  
*aeruginosa* MEDIANTE CALORIMETRÍA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ERIKA EDITH ROMERO PÉREZ

MÉXICO, D.F.

2012





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Silvia del Socorro Pérez Casas.

VOCAL: Profesora: María Eugenia Torres Márquez.

SECRETARIO: Profesor: Luis Fernando Olguín Contreras.

1er. SUPLENTE: Profesora: Yuri Hueda Tanabe.

2° SUPLENTE: Profesor: José Pedraza Chaverri.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Biofísicoquímica 102, Departamento de Fisicoquímica, Edificio B de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

---

Dr. Luis Fernando Olguín Contreras

**Asesor**

---

Erika Edith Romero Pérez

**Sustentante**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al proyecto PAPIIT-DGAPA IN104210-3 y al Programa de Apoyo a la Investigación y al Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM: PAIP 3290-14 por el financiamiento para la realización de esta tesis.

Al Dr. Luis Olguín Contreras por su asesoría, apoyo, comentarios y consejos durante el desarrollo de este proyecto de tesis y por todo lo que he aprendido al trabajar bajo su asesoría. Y sobre todo muchas gracias porque al dirigir esta tesis me ha ayudado a cumplir una importante meta en mi vida. Es una gran persona.

A la Dra. Silvia Pérez Casas por haberme permitido utilizar el calorímetro TAM, por sus consejos y por abrirme las puertas del laboratorio.

Al Dr. Miguel Costas Basín por el otorgamiento de un apoyo económico como ayudante de Investigador Nacional Nivel III y sus valiosos comentarios.

A Miguel A. Pimentel Alarcón por proveer la enzima SdsA1 que se utilizó para realizar los estudios de esta tesis.

A Ana García por ayudarme con el manejo del calorímetro TAM.

Al H. Jurado, por el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo escrito, y por sus observaciones y comentarios.

## *AGRADECIMIENTOS*

*A mi familia, que es lo mejor y más valioso que tengo, los quiero mucho. Sin ustedes no lo hubiera logrado.*

*A mis padres; por su amor, cuidados, confianza, apoyo y porque con su dedicación y esfuerzo me han impulsado a lograr esta meta tan importante para mí. Son lo que más quiero.*

*A mi hermana; por ser mi compañera, por tu apoyo y por estar siempre allí haciéndome reír con tus ocurrencias, y aunque diferimos en algunas cosas sabes que te quiero mucho.*

*A Pilar Granados; por ser mi gran compañera y amiga durante los últimos años, por estar siempre a mi lado echándome porras y por todos los momentos compartidos.*

*A mi amigo preferido, Luis Gutiérrez, por tu amistad, cariño y apoyo incondicional. Eres una persona increíble y un gran amigo.*

*A Narda Castro, gracias amiga por confiar siempre en mí, por tus consejos y por estar cuando te necesito.*

*A mis amigos de las “donas”: Cecilia, Carolina, Maribel, Ingrid, Jasol y Adán; gracias por su amistad, compañía y por todos esos momentos que hemos pasado juntos. Chicos los quiero mucho, mejores amigos en la carrera no pude haber encontrado.*

*A Ana García; por tu amistad y por esa sinceridad que te caracteriza. Simplemente eres ¡genial!*

*A Karla, Adry y Bety porque en los últimos años llegaron a ser personas muy importantes en mi vida, por sus consejos, apoyo, amistad.*

*A Ximena Villegas, gracias por tu amistad, compañía y ayuda en el laboratorio, hiciste que mis últimos meses fueran divertidísimos con tus ocurrencias (lástima que no hubieras llegado antes).*

*A mis compañeros del laboratorio 102 porque aprendí algo de todos. En especial a César, por tus comentarios y tú ayuda con Origin, el ITC, etc., eres un buen compañero y mejor persona.*

*A la Facultad de Química y a la UNAM.*

*A mis padres y  
mi hermana.*

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1. CINÉTICA .....</b>	<b>2</b>
1.1. Cinética química.....	2
1.2. Cinética enzimática .....	6
1.3. Parámetros cinéticos.....	8
<b>CAPÍTULO 2. CALORIMETRÍA.....</b>	<b>10</b>
2.1. Microcalorimetría de titulación isotérmica, ITC.....	10
2.2. Aplicaciones.....	11
2.3. Thermal Activity Monitor (TAM).....	12
<b>CAPÍTULO 3. ALQUILSULFATASA SdsA1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>....</b>	<b>14</b>
3.1. Sulfatasas.....	14
3.2. SdsA1 de <i>P. aeruginosa</i> .....	14
3.3. Hidrólisis de SDS catalizada por SdsA1 de <i>P. aeruginosa</i> .....	16
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>19</b>
4.1. Equipo y material.....	19
4.2. Reactivos utilizados.....	19
4.3. Metodología.....	20
4.3.1. Validación.....	20
4.3.1.1. Método “ampoule” .....	22
4.3.2. Hidrólisis de alquil ésteres de sulfato. ....	23
4.3.2.1. Método de inyección.....	24
4.3.2.2. Preparación de la proteína SdsA1 de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
<b>CAPÍTULO 5. TRATAMIENTO DE DATOS.....</b>	<b>28</b>
5.1. Cálculos para las reacciones químicas. ....	28
5.2. Cálculos para las reacciones enzimáticas.....	30

<b>CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
6.1. Validación del equipo. ....	33
6.2. Hidrólisis enzimática del dodecil sulfato de sodio.....	40
6.2.1. Método “Ampoule”. ....	40
6.2.2. Método inyección.....	43
6.2.3. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática del SDS. ....	56
6.2.4. Efecto del pH sobre la reacción. ....	61
6.2.5. Determinación de la entalpía intrínseca de la reacción.....	65
<b>CAPITULO 7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>73</b>

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las reacciones catalizadas por enzimas es indispensable para entender los procesos que ocurren dentro de las células. Sin embargo, la mayoría de estas reacciones no producen un cambio en absorbancia o fluorescencia y para poder estudiarlas es muy común recurrir a compuestos análogos o ensayos acoplados. Esto limita nuestro conocimiento sobre las reacciones con los sustratos naturales.

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica que permite eliminar el problema de ausencia de cambios en absorbancia o fluorescencia, ya que mide el flujo de calor con respecto al tiempo asociado a cualquier reacción química. Esta técnica permite la observación directa de la reacción sin la necesidad de realizar un muestreo discontinuo y ayuda a estudiar un gran número de enzimas con sustratos naturales de relevancia biológica.

En esta tesis utilicé un microcalorímetro de titulación isotérmica Thermal Activity Monitor (TAM) para determinar los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis del dodecil sulfato de sodio catalizada por la enzima alquilsulfatasa SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a que es la primera ocasión en que se realizan mediciones de cinética con el microcalorímetro (TAM) del laboratorio 102 de la Facultad de Química de la UNAM, la primera parte de este trabajo consistió en implementar y validar una metodología adecuada. Para este fin reproduje algunos experimentos reportados en la literatura y comparé mis resultados con los ya publicados. Ya validada la metodología investigué la reacción de hidrólisis del dodecil sulfato de sodio catalizada por la enzima alquilsulfatasa SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa*, modificando distintas condiciones experimentales como la temperatura, el buffer en que se realiza la reacción, concentración de SDS y pH. Obteniendo las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_M$  y los cambios de entalpía ( $\Delta H$ ) en cada uno.

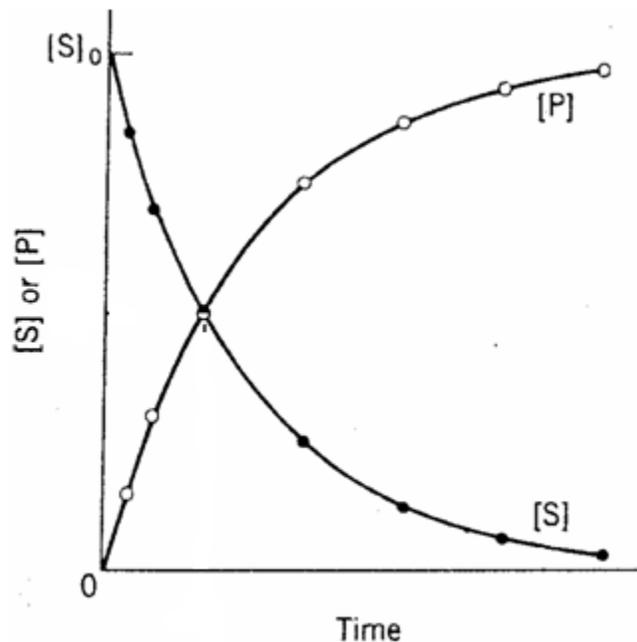
## CAPÍTULO 1

## CINÉTICA

El campo de estudio de la cinética, involucra el estudio de la rapidez y mecanismos de las reacciones químicas.

**1.1. Cinética química.**

En el curso de una reacción química, la concentración cambia con el tiempo conforme los reactivos se transforman en productos (Figura 1.1). Es decir la rapidez de reacción que describe un proceso se define como el cambio en la concentración con el tiempo<sup>1</sup>.



**Figura 1.1. Representación gráfica del cambio en las concentraciones de reactivos y de productos con respecto al tiempo. Tomada de Núñez, I. Enzimología, 2001.**

La rapidez a la que se llevan a cabo las reacciones depende de varios factores como: temperatura, concentración de las especies involucradas, presión, y concentraciones de catalizadores y/o inhibidores. Por ejemplo, la presencia de un catalizador o un inhibidor puede cambiar la rapidez en varias potencias de diez.<sup>2</sup> A partir del estudio de la rapidez

de reacción y de la dependencia de la misma a los diferentes factores que la afectan, es posible conocer más acerca del mecanismo de reacción.

Los valores de rapidez de reacción se determinan experimentalmente midiendo alguna propiedad que se relacione con la composición del sistema en función del tiempo, y además que varíe lo suficiente durante la reacción y que sea fácil de medir. Hay muchos métodos que son utilizados para seguir una reacción con el tiempo, algunos se basan en medir cambios en el espectro de absorción, cambios de pH, cambios de presión, etc.

Considerando la siguiente reacción:



La ecuación de rapidez de la reacción sería la siguiente:

$$rapidez = k[A]^\alpha [B]^\beta \cdots [Z]^\omega$$

donde la  $k$  es la constante de rapidez de la reacción;  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\omega$  son los órdenes de reacción respecto a A, B y Z. Aunque no siempre la expresión de rapidez es tan sencilla, ya que en algunos casos no refleja la estequiometría de la reacción.

El orden global de una reacción es la suma de todos los órdenes de reacción respecto a cada uno de los reactivos de la reacción ( $a + b + \dots + z$ ). El orden de reacción es muy importante debido a que de éste depende la forma en que está dada la ecuación de rapidez de la reacción, y por tanto, la variación de la especie con respecto al tiempo.

Reacciones de orden cero.

Para la siguiente reacción:



La ecuación de rapidez sería<sup>2</sup>:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^\alpha$$

Siguiendo esta reacción, y suponiendo un comportamiento de orden cero, la ecuación de rapidez quedaría<sup>3</sup>:

$$v = - \frac{d[A]}{dt} = k[A]^0 = k$$

$$-d[A] = kdt$$

Al integrar queda:

$$- \int_{A_0}^{A_t} dA = k \int_0^t dt$$

$$[A_t] = [A_0] - kt$$

La gráfica de  $[A]$  vs  $t$  da una línea recta, siendo  $k$  la pendiente de la recta.

Reacciones de primer orden.

Siguiendo la misma reacción y suponiendo que es de primer orden se tiene la siguiente ecuación de rapidez:

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A]^1$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = -kdt$$

Integrando queda:

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_0^t dt$$

O bien:

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt$$

Que también puede expresarse como:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}$$

Esta ecuación es lineal en términos de las variables  $\ln[A]$  y  $t$ . Por lo tanto, la representación gráfica de  $\ln[A]$  vs  $t$  dará una línea recta cuya pendiente es  $-k$ .

Para una reacción de primer orden, la concentración de A disminuye exponencialmente con el tiempo.

Reacciones de segundo orden.

Siguiendo la misma reacción  $A \rightarrow \text{Productos}$ , y suponiendo un comportamiento de segundo orden, la ecuación de rapidez es <sup>2</sup>:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2$$

$$-\frac{d[A]}{[A]^2} = k dt$$

Integrando queda:

$$\int_{[A]_0}^{[A]} -\frac{d[A]}{[A]^2} = k \int_0^t dt$$

De modo que:

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt$$

Al graficar  $1/[A]$  vs  $t$  se obtiene una línea recta, lo que indica que la reacción es de segundo orden. La pendiente de la recta es igual a la constante de rapidez  $k$ .

Las constantes de rapidez de reacciones de orden cero, primer orden y de segundo orden tienen unidades diferentes:

Tabla de unidades de  $k$  para los diferentes ordenes de reacción<sup>4</sup>.

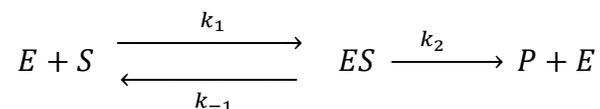
Ecuación de rapidez	Orden de reacción	Unidades de $k$
$v = k$	cero	$M s^{-1}$
$v = k[A]$	primer	$s^{-1}$
$v = k[A]^2$	segundo	$M^{-1}s^{-1}$

\* M es la concentración molar

## 1.2. Cinética enzimática

La cinética enzimática estudia la rapidez de reacciones catalizadas por enzimas y los factores que la pueden afectar<sup>5</sup>, tales como: concentración de enzima, concentración de sustrato, concentración de inhibidores, pH, fuerza iónica y temperatura<sup>6</sup>.

La reacción global más simple de un proceso enzimático está constituida por dos reacciones elementales en las que el sustrato forma un complejo con la enzima que se descompone a continuación en productos y enzima:



aquí, E, S, ES y P representan la enzima, sustrato, complejo enzima-sustrato y productos, respectivamente. De acuerdo con este modelo, cuando la concentración de sustrato es suficientemente elevada para convertir completamente la enzima en el complejo ES, la segunda etapa de la reacción resulta ser la limitante de la rapidez<sup>7</sup>.

Cuando la concentración de sustrato es mucho mayor a la concentración de enzima, la rapidez de la reacción se hace independiente de la concentración de sustrato, es decir, la rapidez es de orden cero y también se representa de forma gráfica como una línea recta.

La siguiente expresión, es la ecuación de rapidez de una reacción enzimática, también conocida como ecuación de Michaelis-Menten. Permite predecir el comportamiento de la enzima en condiciones experimentales diferentes y describe una hipérbola rectangular (Figura 1.2).

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_M + [S]}$$

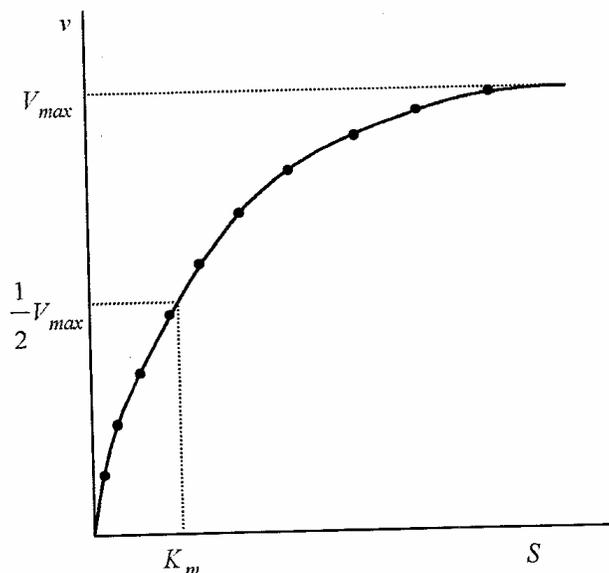
$V_{m\acute{a}x}$ , es la rapidez máxima

$K_M$ , es la constante de Michaelis

$[S]$ , es la concentración de sustrato

$v$ , es la rapidez inicial

Esta ecuación, define una serie de parámetros que son de gran utilidad para el estudio del comportamiento de una enzima.



**Figura 1.2. Representación gráfica de la hipérbola rectangular que describe la ecuación de rapidez de Michelis-Menten. Tomada de Núñez, I., Enzimología, 2001.**

### 1.3. Parámetros cinéticos.

La constante de Michaelis,  $K_M$ , es la concentración de sustrato a la que la rapidez de la reacción es la mitad de la rapidez máxima. La magnitud de esta constante varía ampliamente dependiendo de la enzima, de la naturaleza de sustrato, además de estar en función de la temperatura y el pH.

La  $V_{m\acute{a}x}$  es la rapidez teórica máxima de una reacción, a concentraciones muy altas de sustrato el valor de la rapidez se aproxima a la rapidez máxima de la reacción pero no se llega a ésta.

Los valores de las constantes  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_M$  son característicos de una enzima, dependen de las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción y son determinados a partir de la gráfica de rapidez vs concentración de sustrato.

La constante catalítica de una enzima  $k_{cat}$ , también es uno de los parámetros cinéticos, y se define como:

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]}$$

El valor de  $k_{cat}$ , también es conocido como el número de recambio de una enzima, porque es el número de procesos de una reacción (recambio) que cataliza cada sitio activo por unidad de tiempo<sup>7</sup>, sus unidades son ( $s^{-1}$ ).

La constante  $k_{cat}/K_M$  es una constante de rapidez de segundo orden cuyas unidades son<sup>9</sup> ( $M^{-1}s^{-1}$ ). El valor del cociente  $k_{cat}/K_M$  constituye una medida de la eficiencia catalítica de una enzima, también es útil para comparar la preferencia que tiene una enzima por diferentes sustratos<sup>8</sup>. Esta constante tiene un límite superior el cual es de  $10^8$  a  $10^9 M^{-1}s^{-1}$ , este límite está impuesto por la rapidez a la que E y S pueden difundir en una solución<sup>9</sup>. Siendo las enzimas más eficientes las que tienen un valor de  $k_{cat}/K_M$  más cercano a este límite.

La cinética enzimática es una herramienta muy importante que ayuda a conocer las condiciones a las cuales se puede alcanzar la mayor eficiencia catalítica de una

enzima. Además permite determinar la afinidad de una enzima sobre diferentes sustratos, ayuda a conocer los inhibidores de la actividad catalítica y ayuda a elucidar el mecanismo de reacción entre otras cosas. Entre los métodos más comunes empleados para realizar estudios cinéticos están: espectrofotometría, espectrofluorimetría, determinaciones acopladas y valoración ácido base<sup>10</sup>.

## CAPÍTULO 2

### CALORIMETRÍA

La calorimetría estudia las transferencias de calor que se producen durante procesos químicos y físicos<sup>11</sup>. Los dispositivos que se emplean para medir las transferencias de calor son los calorímetros.

De acuerdo al principio de medición que utilizan, los calorímetros se engloban en dos grupos; calorímetros adiabáticos y calorímetros de conducción de calor (también llamados de flujo de calor)<sup>12</sup>.

Calorímetros adiabáticos. En estos calorímetros no hay un intercambio de calor (energía) entre la celda de reacción y los alrededores<sup>13</sup>. La producción de calor por consecuencia provoca un aumento en la temperatura. La cantidad de calor involucrado es directamente proporcional al cambio de temperatura observada<sup>12</sup>.

Calorímetros de conducción de calor. El calor liberado en la celda de reacción es conducido a los alrededores “disipador de calor”. Estos calorímetros registran una propiedad proporcional al flujo de calor total. Usualmente una termopila se encuentra ubicada entre la celda de medición (unidad calorimétrica) y el disipador de calor; todo el calor transferido pasará a través de la termopila. La señal del instrumento es el voltaje de la termopila, el cual se relaciona con la potencia térmica<sup>12</sup>.

#### **2.1. Microcalorimetría de titulación isotérmica, ITC.**

Esta técnica permite medir el flujo de calor asociado a diferentes procesos a temperatura constante<sup>13</sup>, mediante el uso de un microcalorímetro de conducción de calor, el cual es un instrumento muy sensible que requiere pequeñas cantidades de reactivos y mide cantidades de calor del orden de milijoule, cantidad que corresponde a una sensibilidad en la medición de potencia del orden de microwatt o menor. Es un instrumento adecuado para monitorear procesos lentos.

Permite determinar directamente cambios de entalpía  $\Delta H$ , y por medio de cálculos es posible en algunos casos determinar cambios de entropía  $\Delta S$ , de energía libre de Gibbs  $\Delta G$  y cambios en las constantes de equilibrio  $K$ <sup>12</sup>.

Estos instrumentos constan de dos celdas; una sirve de muestra en la que se lleva a cabo una reacción y la segunda celda funciona como referencia, la diferencia en las señales detectadas entre las dos celdas son registradas y se cancelan las contribuciones equivalentes<sup>12</sup>.

## 2.2. Aplicaciones.

La microcalorimetría de titulación isotérmica es utilizada para realizar mediciones termodinámicas, cinéticas y como una herramienta analítica. Entre algunas de las aplicaciones se encuentran: la evaluación de la estabilidad de fármacos<sup>15</sup>, en el estudio de procesos de asociación o interacción entre ligandos, donde los ligandos pueden ser moléculas pequeñas, iones (protones, iones metálicos, coenzimas, fármacos), o polímeros y en la caracterización de interacciones biopolímero-fármaco<sup>12</sup>.

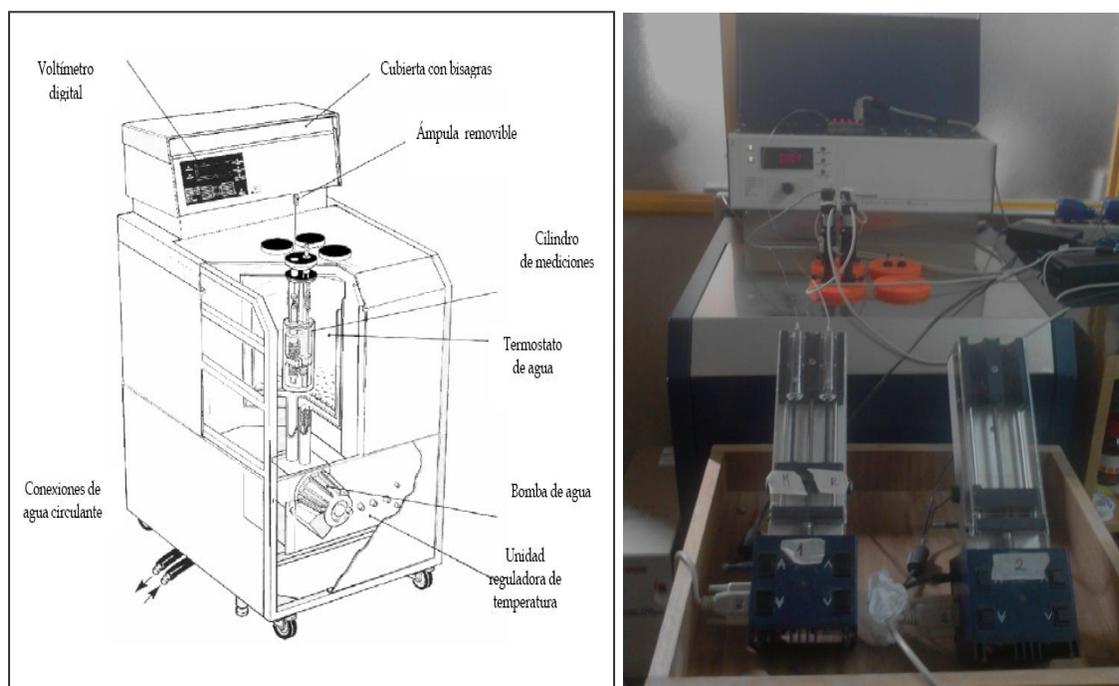
Su aplicación en el estudio de la cinética tanto de reacciones químicas como enzimáticas ha sido relativamente poco utilizada. Sin embargo, tiene la ventaja de que permite realizar ensayos directos de una reacción, utilizando los reactivos o sustratos naturales sin la necesidad de hacer ensayos acoplados que midan alguna propiedad como la absorbancia o fluorescencia que permita seguir la reacción. Permite una medición exacta de los parámetros cinéticos, y también determina parámetros termodinámicos<sup>16</sup>.

Algunos ejemplos de mediciones cinéticas empleando calorimetría son: hidrólisis del metil parabeno en medio básico (reacción química)<sup>19</sup> e hidrólisis de urea por la enzima ureasa de *Helicobacter pylori* (reacción enzimática)<sup>20</sup>, entre otras.

### 2.3. Thermal Activity Monitor (TAM).

El Thermal Activity Monitor (TAM) es un microcalorímetro que cuenta con cuatro unidades calorimétricas independientes y es capaz de monitorear una gran variedad de reacciones químicas y biológicas ya sean procesos exotérmicos o endotérmicos (Figura 2.1).

El TAM utiliza el principio del flujo de calor, lo que quiere decir que el calor generado en la celda fluye en un esfuerzo por restablecer el equilibrio térmico con su entorno. La estabilidad térmica en la celda se logra por el uso de un baño de agua de 25 litros el cual funciona como termostato, dentro del cual está la unidad calorimétrica, permitiendo mantener la temperatura constante en un intervalo de  $\pm 2 \times 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>14</sup>. También utiliza una configuración diferencial, es decir, una de las celdas funciona como referencia y la otra como celda de reacción.



**Figura 2.1.** La imagen de la izquierda es un esquema del TAM (tomada del manual del TAM) y a la derecha se muestra una fotografía de TAM que se encuentra en el laboratorio.

El TAM es capaz de responder a gradientes de temperatura del orden de  $10^{-6}$  °C, este nivel de detección se logra con una alta precisión del termostato y una gran sensibilidad de los detectores. La energía térmica que absorbe o libera la muestra es canalizada directamente a los elementos Peltier, los cuales son termopilas muy sensibles. Los elementos Peltier están hechos de materiales semiconductores que actúan como generadores termoeléctricos y su función es convertir la energía térmica en una señal de voltaje proporcional al flujo de calor. Los resultados son presentados como una medida de la energía térmica producida por la muestra por unidad de tiempo ( $\mu\text{W/s}$ ).<sup>14</sup>

En el TAM se observan fracciones de micro Watt que son generados por los procesos térmicos, por lo tanto los resultados obtenidos de las mediciones generan un potenciograma (potencia vs tiempo), en donde el área bajo la curva es el calor asociado a la proceso (Figura 2.2).

Las reacciones pueden ser monitoreadas a temperaturas que van de 5 – 80°C y a distintas sensibilidades (3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000  $\mu\text{W}$ ).

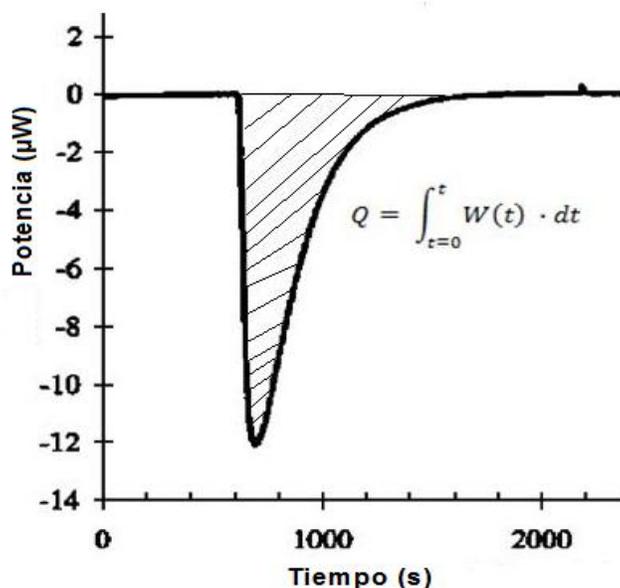


Figura 2.2. Esquema de la respuesta del TAM, donde el área bajo la curva es el calor (Q) del proceso.

## CAPÍTULO 3

### ALQUILSULFATASA SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.1. Sulfatasas.

Las enzimas de la familia de las sulfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces ésteres de sulfato<sup>21</sup> (CO-S) de una gran variedad de sustratos. Las sulfatasas se encuentran tanto en organismos procariontes como eucariontes y están altamente conservadas estructuralmente, en su secuencia y mecanismo.

En humanos los sustratos más comunes son sulfatos de esteroides y carbohidratos sulfonados, incluyendo monosacáridos, oligosacáridos, glucolípidos y proteoglicanos. Las sulfatasas en humanos se han encontrado en varios compartimentos celulares donde son claves en importantes procesos biológicos como: la regulación hormonal, la degradación celular y en la regulación de la señalización celular en la matriz extracelular. Las deficiencias de sulfatasas en el humano conducen a varias enfermedades hereditarias lisosomales<sup>21,22</sup>.

En procariontes las sulfatasas tienen funciones de osmoprotección, participan en procesos patogénicos, pero su principal función es la de proporcionar fuentes de azufre y/o carbono<sup>22</sup>.

#### 3.2. SdsA1 de *P. aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista, que está frecuentemente asociada a enfermedades de los tractos respiratorio y urinario en humanos<sup>23</sup>. Presenta una versatilidad metabólica lo que le permite habitar en una gran variedad de lugares como plantas de tratamiento de aguas o el tracto respiratorio entre otros. Además es capaz de degradar y metabolizar biocidas como el dodecil sulfato de sodio (SDS por sus siglas en inglés). El dodecil sulfato de sodio, también conocido como lauril sulfato de sodio, es un surfactante aniónico que se encuentra en una gran

variedad de detergentes comerciales y otros productos de aseo personal<sup>24</sup>. *P. aeruginosa* es capaz de degradar y utilizar este compuesto como una fuente de carbono y/o azufre<sup>17</sup>.

La degradación de SDS por la bacteria *P. aeruginosa* comienza con la hidrólisis del enlace oxígeno-azufre del grupo funcional éster de sulfato del compuesto (RO-SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). La enzima responsable de este proceso es la alquilsulfatasa SdsA1 de *P. aeruginosa*. Esta proteína cataliza la reacción de hidrólisis de alquilsulfatos de cadenas de diferentes tamaños; como el SDS, decil sulfato, octil y hexil sulfato, pero no puede catalizar la hidrólisis de azúcares sulfatados ni de arilsulfatos<sup>17</sup>. Es la primer sulfatasa descrita del grupo III de la familia de las sulfatasas, grupo distinguido porque las enzimas tienen un dominio de metalo-β-lactamasa. Es un dímero simétrico y cada monómero está formado por tres dominios; el dominio catalítico N-terminal, un dominio de dimerización y el dominio C-terminal (Figura 3.1).

El dominio catalítico N-terminal tiene un pliegue distintivo de las metalo-β-lactamasa y es donde se localizan dos iones de zinc los cuales marcan el sitio activo de la enzima. El dominio de dimerización se encuentra en la parte central de la enzima creando una cavidad central con carácter hidrofílico y es la parte a la que se le atribuye la resistencia a altas concentraciones de SDS. Por último el dominio C-terminal es el que provee un “canal o surco” hidrofóbico el cual recluta los sustratos alifáticos. Juntos, los dominios C-terminal y N-terminal forman un conducto hidrofóbico que conduce hacia el sitio activo.

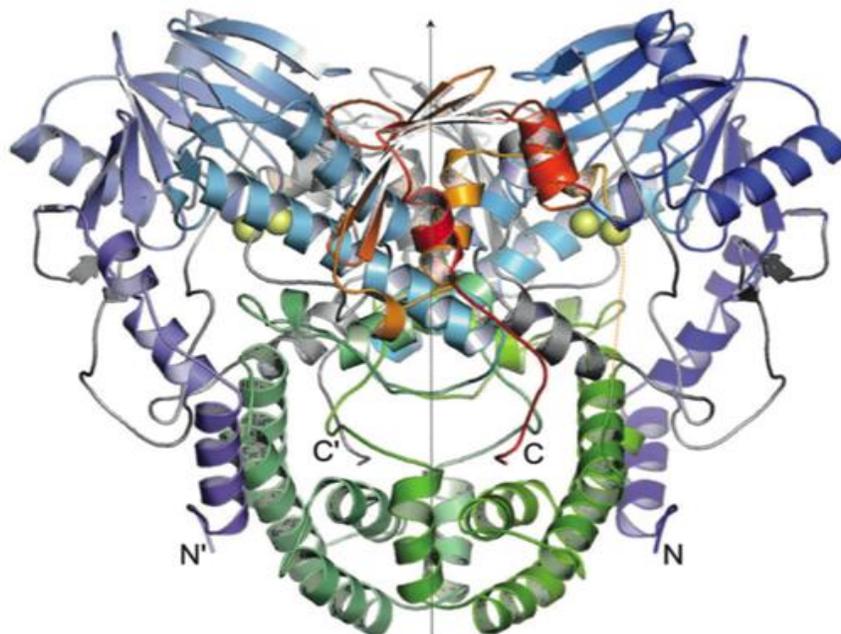


Figura 3.1. Estructura tridimensional de la enzima SdsA1, el dominio catalítico terminal en color azul, dominio de dimerización en color verde, dominio C-terminal en color anaranjado, y los iones Zn están representados como esferas amarillas. Tomada de Hagelueken et al. 2006

### 3.3. Hidrólisis de SDS catalizada por SdsA1 de *P. aeruginosa*.

La reacción de hidrólisis de SDS, da como productos dodecanol, sulfato inorgánico y se libera un protón (Figura 3.2)

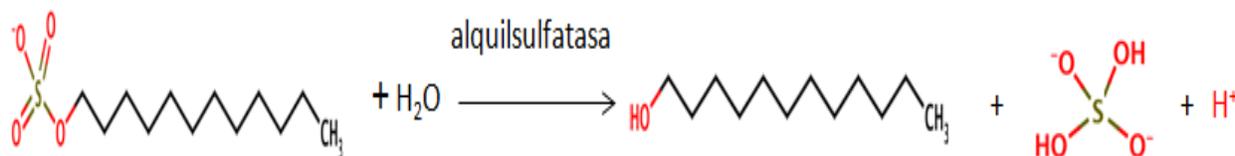


Figura 3.2. Reacción de hidrólisis del SDS.

La estructura de rayos X de la proteína complejada con un análogo de sustrato no hidrolizable (dodecil sulfonato de sodio) revela que en el sitio activo existen dos moléculas de agua denominadas W1 y W2. Una de ellas (W1) conecta a los dos iones de Zn y presumiblemente pudiera ser en realidad un ion hidroxilo<sup>17</sup>. La segunda

molécula de agua en el sitio activo (W2) se encuentra entre W1 y el sustrato (Figura 3.3). Se ha propuesto que W2 puede ser polarizada por las interacciones que tiene con el hidroxilo de W1 y el oxígeno de Glu-299 y que esto le permitiera realizar un ataque nucleofílico sobre los ésteres de sulfato. Así, en un solo paso de adición eliminación se formarían los productos de reacción. El ataque nucleofílico se vería favorecido por la polarización del grupo  $\text{SO}_4^{2-}$  del sustrato, debido a su interacción con los residuos Asn-307, Arg-312, Arg-317 e His-405 (Figura 3.3)<sup>17</sup>.

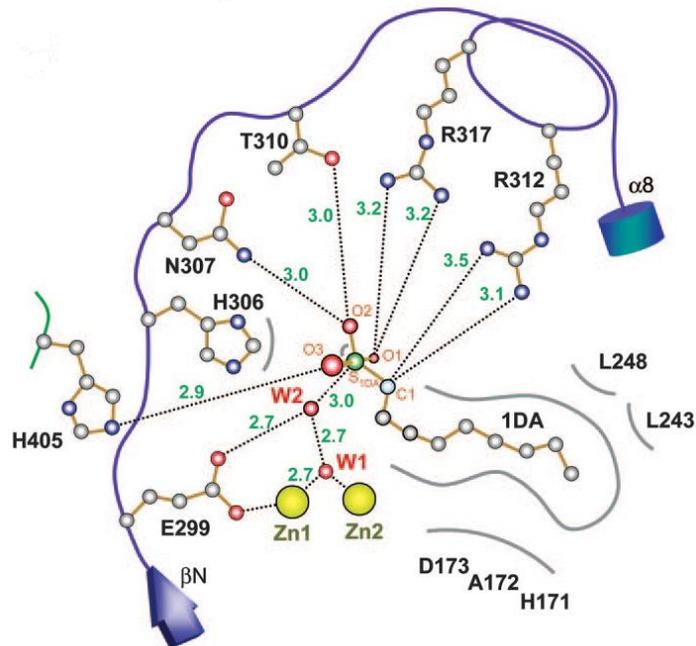


Figura 3.3. Representación esquemática del sitio activo, W1 y W2 son las dos moléculas de agua y 1DA es dodecil sulfonato de sodio. Tomada de Hagelueken et al. 2006

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### Objetivo general.

- Determinar las constantes cinéticas y los cambios de entalpía de la hidrólisis del dodecil sulfato de sodio (alquil éster de sulfato) por la enzima SdsA1 de *P. aeruginosa* bajo diferentes condiciones utilizando calorimetría.

### Objetivos particulares.

- Implementar y validar una metodología para determinar los parámetros que caracterizan la cinética de reacciones químicas utilizando calorimetría y comparar los resultados que se obtengan con los publicados en la literatura.
- Encontrar las condiciones experimentales óptimas que permitan investigar la hidrólisis del SDS catalizada por la enzima SdsA1 de *P. aeruginosa*.
- Determinar la entalpía ( $\Delta H$ ) y las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_M$  de la SdsA1 catalizando la hidrólisis de SDS a diferentes temperaturas.
- Determinar las constantes cinéticas y la entalpía para la hidrólisis de SDS a diferentes valores de pH.
- Determinar la entalpía intrínseca para la misma reacción.

### Hipótesis.

- Si la técnica de microcalorimetría de titulación isotérmica permite medir el flujo de calor con respecto al tiempo asociado a la reacción de hidrólisis del SDS por la alquilsulfatasa SdsA1 de *P. aeruginosa*, entonces será posible determinar las constantes de velocidad y los cambios de entalpía asociados a esta reacción.

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 4.1. Equipo y material.

- Thermal Activiy Monitor (TAM) Thermometric, Suecia Mod. 2277
- Balanza analítica OHAUS Modelo AP25D.
- Balanza analítica METTLER Modelo PM400
- Microcentrífuga refrigerada HERMLE Modelo Z 216 MK
- Espectrofotómetro UV-Vis Varian Modelo Cary 50Bio
- pHmetro ORION 410A
- Desionizador de agua Nanopoure Infinity Mod. D8961
- Destilador de agua Barnstead Mega-Pure® system MP-1
- Jeringas de vidrio de 2.5 mL.

#### 4.2. Reactivos utilizados.

- Agua destilada y desionizada
- 1,2,3-Triacetoxipropano (triacetato de glicerilo),  $\geq 99\%$  (Sigma).
- Ácido acético glacial, 99.8% (J.T. Baker).
- Imidazol,  $\geq 99\%$  titration (Sigma).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Metil 4-hidroxibenzoato (metil parabeno), Sigma Ultra  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich).
- Clorhidrato del etil éster de la N $\alpha$ -benzoil-L-arginina (BAEE), (Sigma).
- Cloruro de Calcio, dihidratado, para biología molecular 99% (Sigma).
- Polietilenglicol 8000, BioUltra (Sigma-Aldrich).
- Ácido clorhídrico, 35% (J.T.Baker).
- 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (TRIS), Sigma 7-9  $\geq 99\%$  (Sigma)
- Tripsina de páncreas bovino, (Sigma).
- Proteína SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa*\*
- Dodecil sulfato de sodio, Sigma Ultra  $\geq 99.0\%$  GC (Sigma).

- Sal de sodio del Ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanesulfónico (HEPES), 99% (Aldrich).
- Trietanolamina, (Distribuidora química ALVI)
- Ácido 1,4-Piperacina dietanosulfónico (PIPES),  $\geq 99\%$  titration (Sigma).
- Fosfato de sodio monobásico, monohidratado, 99.6% (J.T. Baker).
- Fosfato de sodio dibásico, heptahidratado, 100% (J.T. Baker).

\* Preparada por el estudiante Miguel A. Pimentel Alarcón <sup>17</sup>, ver apartado 4.3.2.2 de este capítulo.

### 4.3. Metodología.

La primera parte de esta tesis consistió en conocer el funcionamiento del calorímetro y validar su uso para estudiar cinética de reacciones químicas y enzimáticas y determinar algunos parámetros termodinámicos asociados a ellas. Esto es debido a que es la primera ocasión en la cual es utilizado con este fin en el laboratorio 102 de la Facultad de Química de la UNAM.

En la segunda parte se investigó la hidrólisis del dodecil sulfato de sodio (alquil éster de sulfato) catalizada por la enzima SdsA1 de *Pseudomonas aeruginosa* bajo diferentes condiciones de reacción.

#### 4.3.1. Validación.

Para validar el uso del microcalorímetro de titulación (TAM) se midieron por triplicado tres reacciones de hidrólisis de ésteres ya reportadas en la literatura, las cuales fueron: la hidrólisis de triacetina catalizada por imidazol <sup>18</sup>, la hidrólisis del metil parabeno en medio básico <sup>19</sup> y por último la hidrólisis del etil éster de la benzoilarginina (BAEE) catalizada por la enzima tripsina bovina <sup>20</sup> (Figura 4.1).

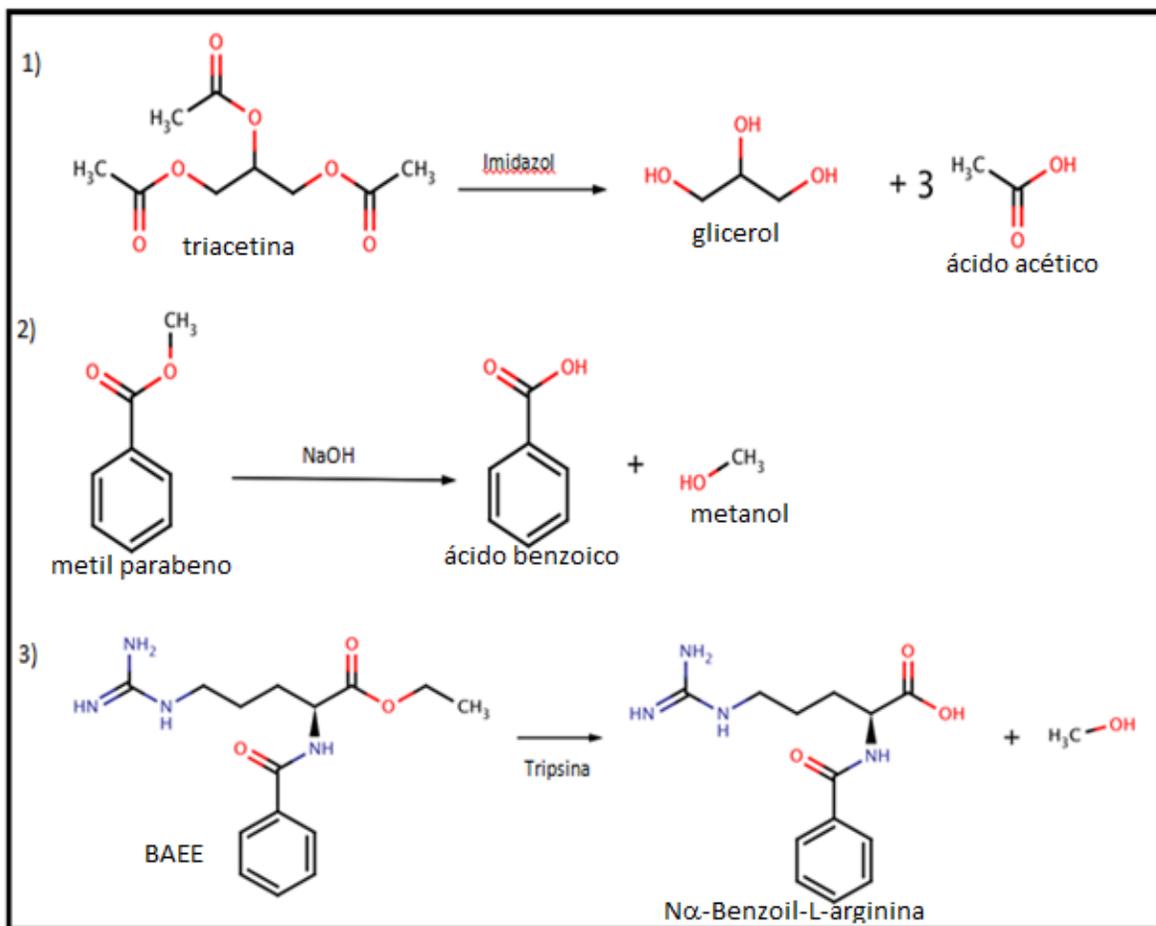


Figura 4.1. Reacciones: 1) Hidrólisis de triacetina, 2) Hidrólisis de metil parabenol y 3) Hidrólisis de BAEE.

Las tres reacciones se llevaron a cabo a 25°C y empleando el método “ampoule” (del software Digitam for Windows) para monitorearlas, pero se utilizaron distintas sensibilidades; la hidrólisis de triacetina se monitoreó a 100  $\mu\text{W}$ , la del metil parabenol a 300  $\mu\text{W}$  y la del BAEE a 30  $\mu\text{W}$ .

Las soluciones utilizadas para la realización de cada una de estas reacciones fueron:

Reacción	Celda de referencia	Celda de muestra
Hidrólisis de triacetina	Solución buffer de imidazol/ácido acético	Solución 0.245 M de triacetina en buffer de imidazol/ácido acético.
Hidrólisis de metil parabeno	Agua desionizada	Solución 50 mM de metil parabeno en NaOH 0.5M
Hidrólisis de BAEE	Solución de tripsina 9.6 nM en buffer TRIS <sup>20</sup> 200 mM, pH 8	Solución de BAEE 2.5 mM en la solución de la celda de referencia.

Cada una de las soluciones se prepararon al momento, excepto el buffer TRIS que se guardó en refrigeración.

#### 4.3.1.1. Método “ampoule”.

Este método es el que se utilizó en la validación porque es el reportado en la literatura consultada. Como se observa en la Figura 4.2 se usan dos celdas una de referencia y otra de muestra. Una característica particular del método es que la reacción inicia fuera del calorímetro, es decir, tanto la solución buffer como la solución que contiene la mezcla de reacción son preparadas antes iniciar la medición. Por esta razón cuando se prepara la mezcla de reacción se registra ese tiempo como el inicio de la reacción. Ya que se tienen ambas soluciones, se utilizan para llenar las celdas y se cierran.

Antes de meter las celdas se deja que el equipo tome una línea base durante 5 minutos, después de este tiempo se meten las celdas en la posición de equilibrio y se dejan las celdas en esta posición durante 40 minutos acabado este tiempo se bajan las celdas hasta donde se encuentran los detectores y se inicia el monitoreo de la reacción (Figura 4.2).

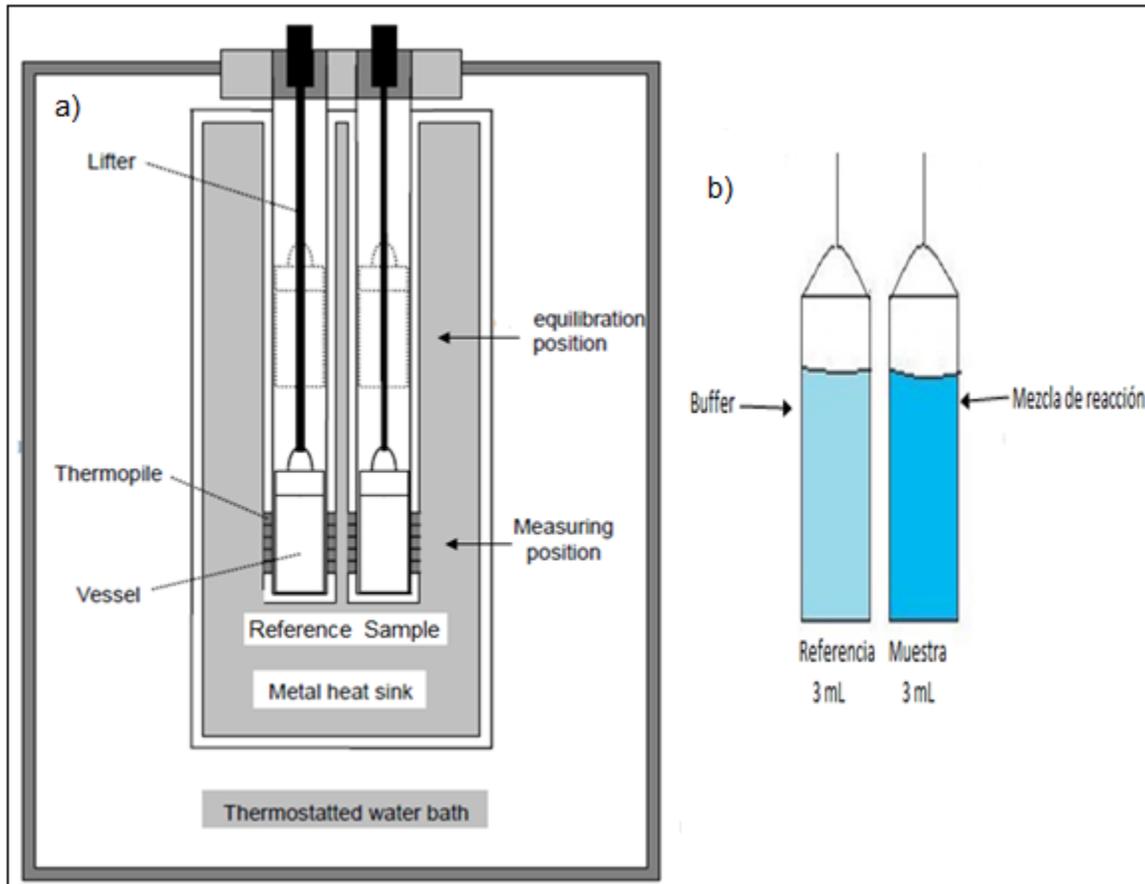


Figura 4.2. Diseño experimental del método ampoule. Imagen adaptada de Urakami K. and Beezer A.E., 2003<sup>25</sup>

#### 4.3.2. Hidrólisis de alquil ésteres de sulfato.

Para la hidrólisis del dodecil sulfato de sodio utilizando la enzima SdsA1 se obtuvieron las entalpías de hidrólisis y las constantes cinéticas  $K_M$ ,  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_M$ . Las reacciones se midieron a 25 °C, pH 7.5, [buffer]= 20 mM, [enzima]= 20 nM, [SDS]= 100  $\mu$ M y a una sensibilidad de 100  $\mu$ W.

La reacción fue estudiada en diferentes condiciones de reacción, en primer lugar se variaron las concentraciones de SDS utilizando 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ M en buffer HEPES manteniendo las demás condiciones experimentales.

La hidrólisis del SDS también fue estudiada en los buffers HEPES, PIPES, fosfatos, trietanolamina (TEA) y TRIS. Se utilizaron estos buffers porque se conocen sus entalpías de ionización y al obtener las entalpías de hidrólisis en los cinco buffers se

puede conocer la entalpía intrínseca de hidrólisis<sup>20</sup> además de conocer el efecto de los mismos en la reacción.

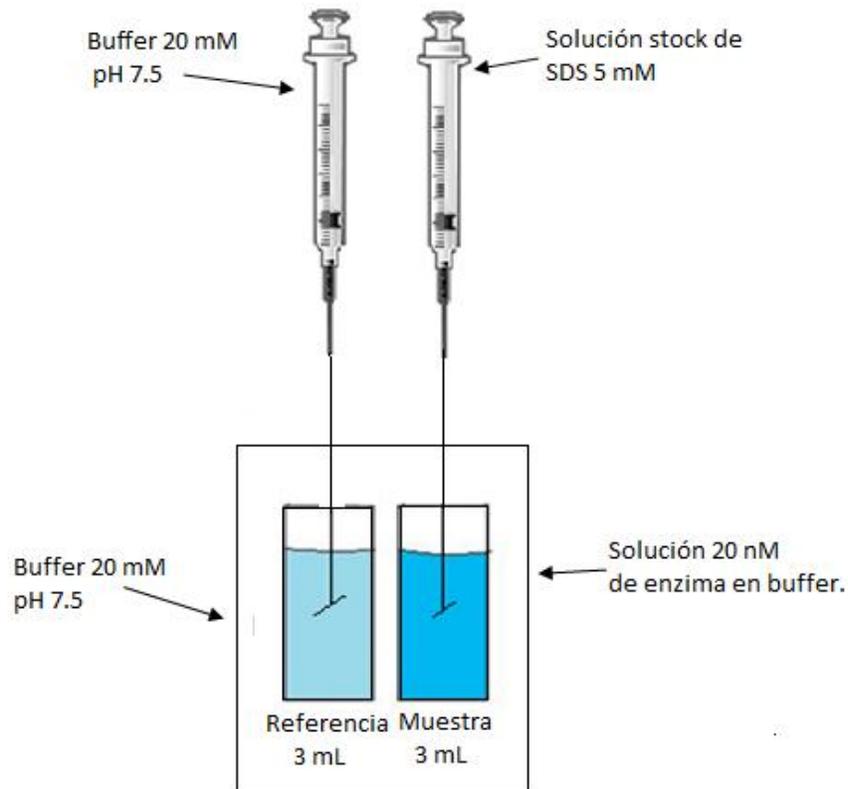
También se estudió la reacción en HEPES cambiando la temperatura a 15, 20, 30 y 35°C conservando el resto de las condiciones experimentales mencionadas arriba. Y por último se estudió la reacción a valores de pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5 en buffer fosfatos 20 mM a 25°C y [SDS] 50  $\mu$ M. Todos los experimentos fueron realizados bajo diferentes condiciones cuatro veces.

#### **4.3.2.1. Método de inyección.**

Se utilizó en las mediciones de las hidrólisis de los alquil ésteres de sulfato, porque el método “ampoule” no permitía observar claramente la reacción debido a que al bajar las celdas se genera una perturbación que en este caso fue mayor a la señal observada por la liberación de calor de la reacción, provocando que se enmascare el inicio de la medición y como consecuencia no se podía observar con claridad en el potenciograma donde iniciaba la reacción.

Para solucionar este problema se decidió utilizar el método de inyección, en el que se utilizan 2 jeringas de vidrio de 2.5 mL, la jeringa de muestra se llena con solución stock de SDS y la de referencia con buffer. Se inyecta simultáneamente un volumen de 60  $\mu$ L de ambas soluciones a cada celda para tener una concentración final en la celda de reacción de 100  $\mu$ M de SDS, durante todo el experimento se tiene agitación constante.

Como se muestra en la Figura 4.3 ambas celdas fueron llenadas con un volumen de 3 mL de la solución correspondiente.



**Figura 4.3 Montaje experimental para el método de inyección**

Con este método es importante conocer que el área bajo la curva es el calor no solo de la hidrólisis sino también está incluido el calor de dilución del alquil éster de sulfato. Para conocer el calor de dilución se realizó un segundo experimento el cual consiste en el mismo montaje experimental de la Figura 4.3 solo que en este caso la celda de muestra contiene buffer sin la enzima, todo lo demás es igual. El área bajo la curva correspondiente a la inyección de SDS en buffer se resta al área de la reacción.

La enzima SdsA1 se tiene en solución, alicuotada en tubos ependorff en el congelador; para conocer la concentración de la enzima se descongeló un tubo y se puso en la centrifuga por 10 minutos. Después, en una celda de cuarzo se colocaron 650  $\mu\text{L}$  de buffer y se midió su absorbancia a 280 nM, posteriormente a esa misma celda se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de la enzima centrifugada, se mezcló bien y se midió la absorbancia.

Con los valores de absorbancia y la ley de Lambert y Beer se conocía la concentración de la nueva disolución de enzima.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

A= absorbancia

$\varepsilon$ = coeficiente de extinción molar =  $92250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

C= concentración molar

l= distancia = 1 cm

$$A_{buffer+enzima} - A_{buffer} = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

$$C = \frac{\Delta \text{absorbancia}}{\varepsilon \cdot l}$$

El coeficiente de extinción molar de la proteína fue calculado utilizando la aplicación ProtParm del programa expasy, la cual computariza distintos parámetros como la masa molecular, el punto isoeléctrico (pI) teórico, la composición de aminoácidos y el coeficiente de extinción molar entre otros. En este programa lo único que se hace es copiar la secuencia de aminoácidos de la proteína y hace el cálculo.

El coeficiente de extinción molar de una proteína, se calcula siguiendo lo escrito por Gill and von Hippel<sup>26</sup>. A partir de la secuencia de aminoácidos el programa cuenta el número de triptófanos, tirosinas y de cistinas de la proteína y emplea la siguiente ecuación para obtener el coeficiente de absortividad molar de dicha proteína.

$$\varepsilon = a\varepsilon_{Tyr} + b\varepsilon_{Trp} + c\varepsilon_{Cys}$$

Donde a, b y c son el número de residuos de tirosina, triptófano y cistina por molécula de proteína respectivamente y  $\varepsilon_{Tyr}$ ,  $\varepsilon_{Trp}$  y  $\varepsilon_{Cys}$  son los coeficientes de absortividad molar de los mismos residuos a una longitud de onda de 280 nm. Se emplean estos residuos porque a una  $\lambda$  de 280 nm son los que tienen mayor contribución en la medida de absorbancia y porque a esta longitud de onda estos residuos absorben bastante bien.

**4.3.2.2. Preparación de la proteína SdsA1 de *P. aeruginosa*.**

La proteína SdsA1 fue preparada por el estudiante Miguel Ángel Pimentel Alarcón siguiendo el protocolo descrito por Hagelueken et al (2006)<sup>17</sup>. A grandes rasgos el protocolo es el siguiente: se amplificó el gen PA0740 of *P. aeruginosa* PAO1, posteriormente se clonó el producto obtenido de la PCR en el vector de expresión pBBR22bII utilizando las enzimas de restricción NdeI y BglII, dando como resultado la proteína de fusión SdsA1-His6. Esta proteína se expresó en células de *E. coli* C41 que fueron cultivadas hasta una OD<sub>600</sub> de 0.77 a 37°C y la expresión fue inducida mediante 0.5 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a temperatura ambiente durante una noche. Después las células fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de lisis. La purificación de la enzima se realizó utilizando en primer lugar cromatografía de afinidad (His Trap), seguida de una cromatografía de exclusión molecular.

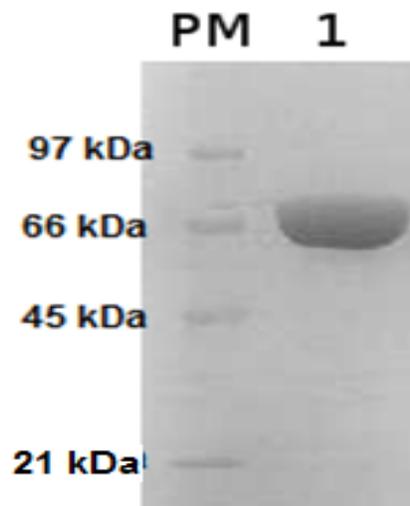


Figura 4.4. Electroforesis SDS-PAGE, en la que se observa una banda cercana a los 66 kDa (peso molecular de la SdsA1 es 72.6 kDa). Gel elaborado por César Aguirre.

**CAPÍTULO 5****TRATAMIENTO DE DATOS**

El método calorimétrico para estudiar la cinética de una reacción se basa en medir la rapidez a la cual se produce o libera calor (Q) durante un proceso, el cual puede ser resultado de la conversión de reactivos o sustratos a productos, dando una medida de rapidez de reacción.

Los resultados son almacenados por el calorímetro en forma de potenciograma, potencia térmica (W) vs tiempo (s).

El calor medido en función del tiempo se define como potencia térmica (o flujo de calor):

$$\text{Potencia} = W(t) = \frac{dQ}{dt} \quad [1]$$

Por lo tanto, el calor asociado a la reacción es el área bajo la curva de la señal obtenida por el calorímetro.

$$Q = \int_{t=0}^t W(t) \cdot dt \quad [2]$$

**5.1. Cálculos para las reacciones químicas.**

Para obtener los valores de las constantes cinéticas y de entalpía de las hidrólisis de la triacetina y del metil parabeno, se utilizó la aplicación de “Análisis cinético” del software digitam del calorímetro; el cual ajusta los datos experimentales de acuerdo al modelo y orden de reacción. Además permite extrapolar el ajuste de los datos experimentales al tiempo en el que se inició la reacción, al considerar los minutos transcurridos a partir de que se hizo la mezcla de reacción hasta el tiempo en que se comenzó a medir la reacción en el calorímetro.

El modelo de reacción, el orden de reacción, la concentración de reactivo y el volumen de la mezcla de reacción es información que se suministra al programa para que ajuste

los valores experimentales al modelo general que utiliza el software del TAM. Al final da como resultado los valores de la constante de rapidez,  $k$  y de entalpía,  $\Delta H$  para la reacción además de proporcionar una gráfica en la que se observan los datos experimentales y el ajuste hecho por el programa.

El software digitam ofrece un método de cálculo para el desarrollo de un modelo cinético de los datos de calor isotérmico, y es el siguiente<sup>27, 28</sup>:

Considerando la siguiente reacción química:  $A + B \longrightarrow C$

La ecuación de rapidez se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{d[C]}{dt} = k ([A] - x)^m ([B] - x)^n \quad [3]$$

$x$  = incremento en la concentración de producto =  $[C] - [C]_0$

$k$  = constante de rapidez

$m$  = orden de reacción respecto a  $A$

$n$  = orden de reacción respecto a  $B$

$m + n$  = orden de reacción

$[A]$ ,  $[B]$  y  $[C]$  = concentraciones de reactivos y producto.

Considerando que el flujo de calor ( $dQ/dt$ ) medido es directamente proporcional a la rapidez de formación de producto, siendo el producto del volumen y la entalpía molar la constante de proporcionalidad, se tiene:

$$\frac{dQ}{dt} = V\Delta H \frac{d[C]}{dt} \quad [4]$$

$\Delta H$  es la entalpía molar de la reacción

$d[C]/dt$  es la rapidez de cambio en la concentración de producto.

$V$  es el volumen total.

Dividiendo ambos lados de la ecuación [4] entre el volumen se tienen medidas de flujo de calor por unidad de volumen:

$$\frac{dQ_v}{dt} = \Delta H \frac{d[C]}{dt} \quad [5]$$

$dQ_v / dt$  es el flujo de calor por unidad de volumen.

$$\text{Integrando la ecuación anterior: } Q_v(t) = \Delta H \cdot \Delta C \quad [6]$$

$$\text{Por lo tanto: } x = \Delta C = \frac{Q}{\Delta H} \quad [7]$$

Tomando la ecuación [5] y la expresión [6], y sustituyendo ambos términos en la ec. [3]:

$$\frac{dQ_v}{dt} = \Delta H \cdot k \left( [A] - \frac{Q_v}{\Delta H} \right)^m \left( [B] - \frac{Q_v}{\Delta H} \right)^n \quad [8]$$

Esta es la ecuación general que utiliza el software del calorímetro, para obtener los valores de  $k$  y  $\Delta H$ .

Por ejemplo en las dos reacciones estudiadas el modelo de reacción es:  $A \rightarrow C$ ; lo cual hace que la ecuación 8 se simplifique:

$$\frac{dQ_v}{dt} = \Delta H \cdot k \left( [A]_0 - \frac{Q_v}{\Delta H} \right)^m \quad [9]$$

## 5.2. Cálculos para las reacciones enzimáticas.

Para las reacciones enzimáticas se obtuvieron los valores de  $k$  y  $\Delta H$  empleando las siguientes ecuaciones<sup>20</sup>.

Utilizando la ecuación [2], se tiene el calor generado dado por la integración del área descrita por la curva, pero a este calor se le debe restar el calor asociado al evento de dilución y así conocer el calor generado en la reacción. Para convertir los valores de potencia a valores de rapidez de reacción enzimática se requiere primero conocer la entalpía aparente ( $\Delta H_{app}$ ), y se obtiene dividiendo el calor generado en la reacción entre el número de moles de sustrato involucrado en la reacción:

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]_{total} \cdot V} \int_{t=0}^t \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad [10]$$

$[S]_{total}$  es la concentración de sustrato.

V es el volumen de solución de reacción.

$\Delta H_{app}$  es la entalpía aparente

Teniendo el valor de  $\Delta H_{app}$  se puede convertir los datos de potencia a valores de rapidez de reacción.

$$Potencia = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt} \cdot V \cdot \Delta H_{aparente}. \quad [11]$$

$d[P]/dt$  es la rapidez de reacción (formación de producto en función del tiempo).

V es el volumen.

acomodando los términos tenemos:

$$Rapidez = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dQ}{dt} \quad [12]$$

Para conocer la concentración de sustrato a diferentes tiempos se parte de conocer la concentración de producto a cada tiempo:

$$[P]_{(t)} = \frac{\int_{t=0}^t Q_{(t)}}{\Delta H_{app} \cdot V} \quad [13]$$

Una vez que se conoce las concentraciones de producto y sabiendo la concentración inicial de sustrato que se inyectó se puede conocer la cantidad de sustrato a distintos tiempos:

$$[S]_{(t)} = [S]_{total} - [P]_{(t)} \quad [14]$$

Ya que se tienen los valores de concentración de sustrato y de rapidez, son graficados en el programa Origin y se ajusta la gráfica utilizando la función hipérbola que

corresponde al modelo Michaelis-Menten, dando como resultado los valores de  $V_{\text{máx}}$  y de  $K_M$ , utilizando la siguiente ecuación:

$$y = \frac{P1 \cdot x}{P2 + x} \quad [15]$$

P1 es  $V_{\text{máx}}$

P2 es  $K_M$

x es la concentración de sustrato

y es la rapidez

## CAPÍTULO 6

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primero se presentan los resultados obtenidos en la etapa de validación del calorímetro, y posteriormente los resultados obtenidos para la hidrólisis del dodecil sulfato de sodio por la enzima SdsA1.

## 6.1. Validación del equipo.

En esta parte de la tesis se realizaron tres reacciones de hidrólisis de ésteres para comparar los valores obtenidos de entalpía, constantes de rapidez y constante de Michellis-Menten con los publicados en la literatura (Figura 6.1)

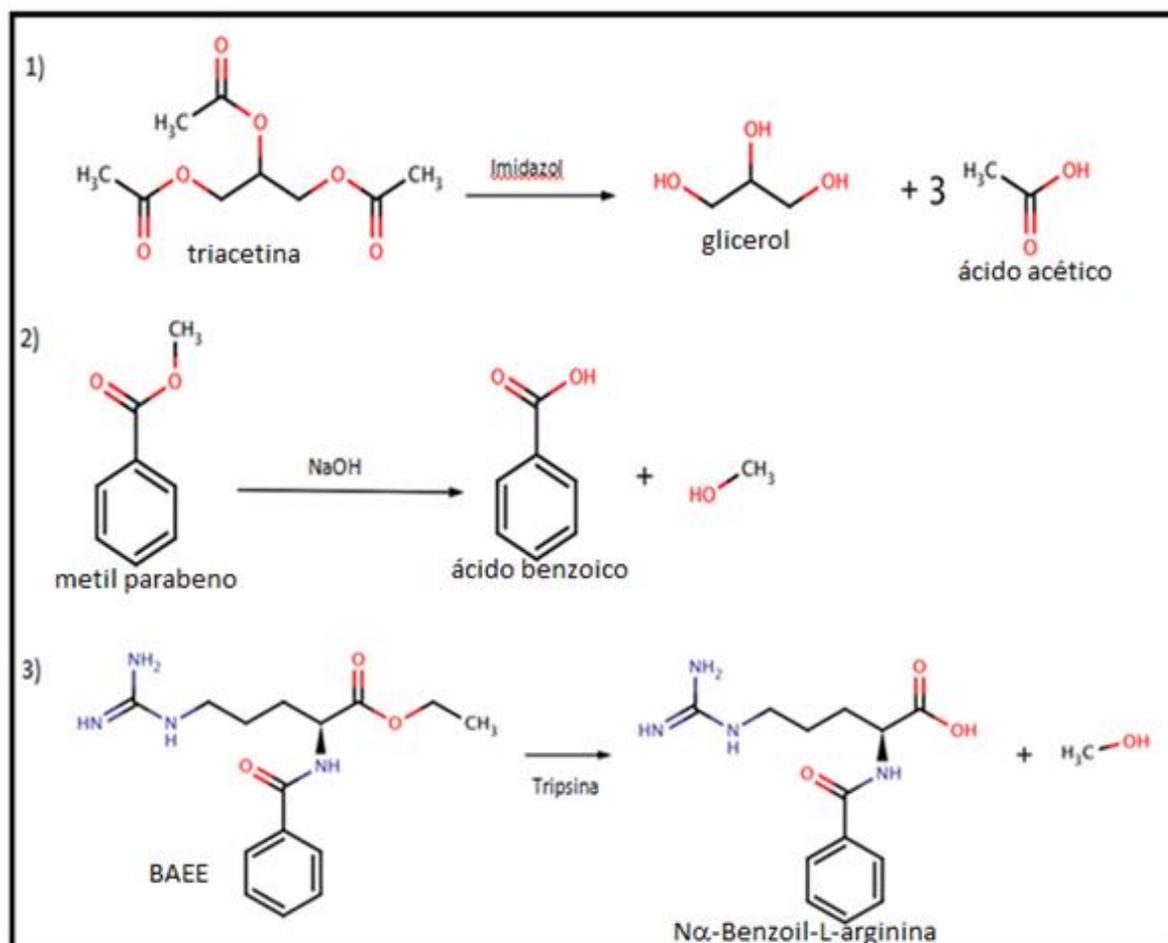


Figura 6.1. Reacciones realizadas para la validación del calorímetro TAM: 1) Hidrólisis de triacetina, 2) Hidrólisis de metil paraben y 3) Hidrólisis enzimática de BAEE.

A continuación, en las Figuras 6.2, 6.4 y 6.6 se presentan los potenciogramas ( $P$  vs  $t$ ) de las tres reacciones. En ellos se observa cómo la señal registrada por el calorímetro pasa de cero a valores negativos de potencia ( $\mu\text{W}$ ), lo cual nos indica que las reacciones son exotérmicas. En el caso de las reacciones de hidrólisis del BAEE y del metil parabeno, una vez finalizada la reacción la señal regresa a cero. Sin embargo, en caso de la hidrólisis de la triacetina, la reacción es muy larga (aproximadamente de 100 días)<sup>18</sup> razón por la cual sólo se midió la reacción durante 72 horas, tiempo suficiente para poder obtener por extrapolación los parámetros ( $\Delta H$  y  $k$ ).

En las Figuras 6.3 y 6.5, se encuentran las gráficas que proporciona el software “digitam” del microcalorímetro (TAM) al procesar y ajustar los datos experimentales (valores de potencia con respecto al tiempo) al modelo cinético explicado en el apartado 5.1. En color rojo están los valores experimentales y en verde el ajuste de los datos obtenido al aplicar un modelo de orden de reacción. La hidrólisis de la triacetina sigue una cinética de segundo orden y la del metil parabeno de primer orden. En ambos casos se aprecia un buen ajuste de los datos experimentales al modelo, dando para la reacción de la triacetina un error cuadrático medio =  $2.42 \times 10^{-15}$ , y para el metil parabeno de  $4.89 \times 10^{-14}$ .

En el caso de la hidrólisis del BAEE, el TAM no cuenta con un modelo para cinética enzimática, por lo tanto se realizó el tratamiento de datos de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.2 del capítulo cinco. En la Figura 6.7 se presenta la gráfica rapidez vs [BAEE]. En la gráfica la línea negra son los valores experimentales y la línea de color rojo es el ajuste que realiza el programa “Origin”. El ajuste tiene un coeficiente de correlación al cuadrado ( $R^2$ ) de 0.988.

En cuanto a la entalpía de la reacción, el software del calorímetro permite conocer el calor asociado a la reacción, al integrar el área bajo la curva de la señal obtenida para un proceso.

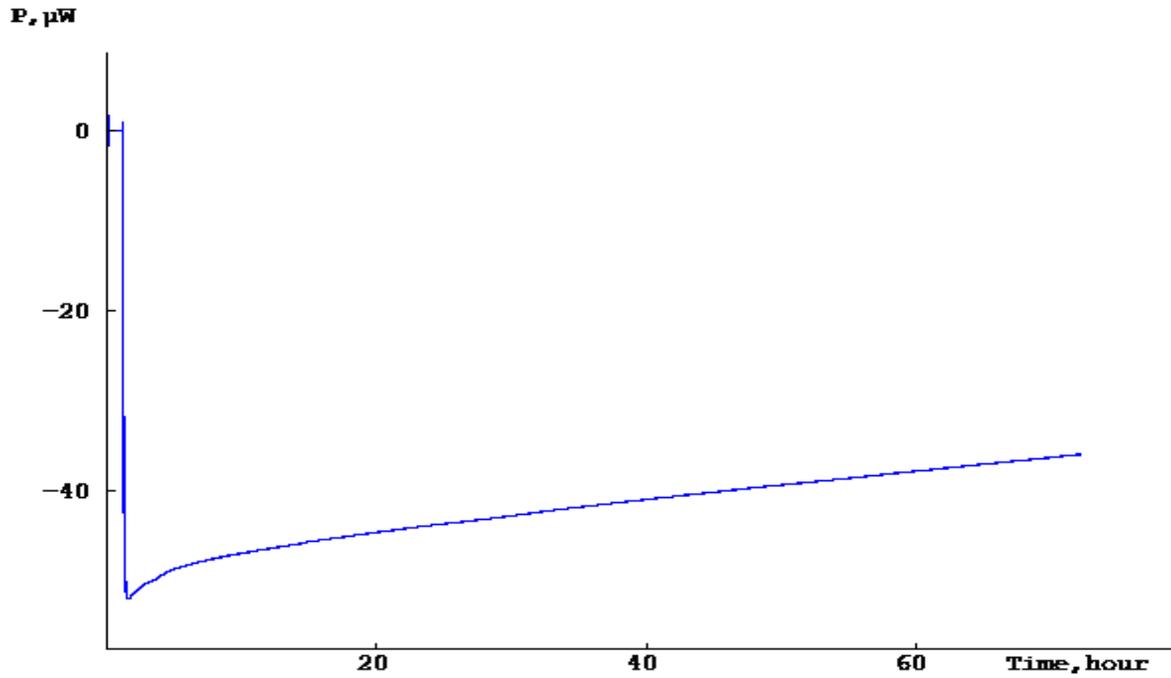


Figura 6.2. Potenciograma de la hidrólisis de triacetina a 25°C, [triacetina]= 0.25 M.

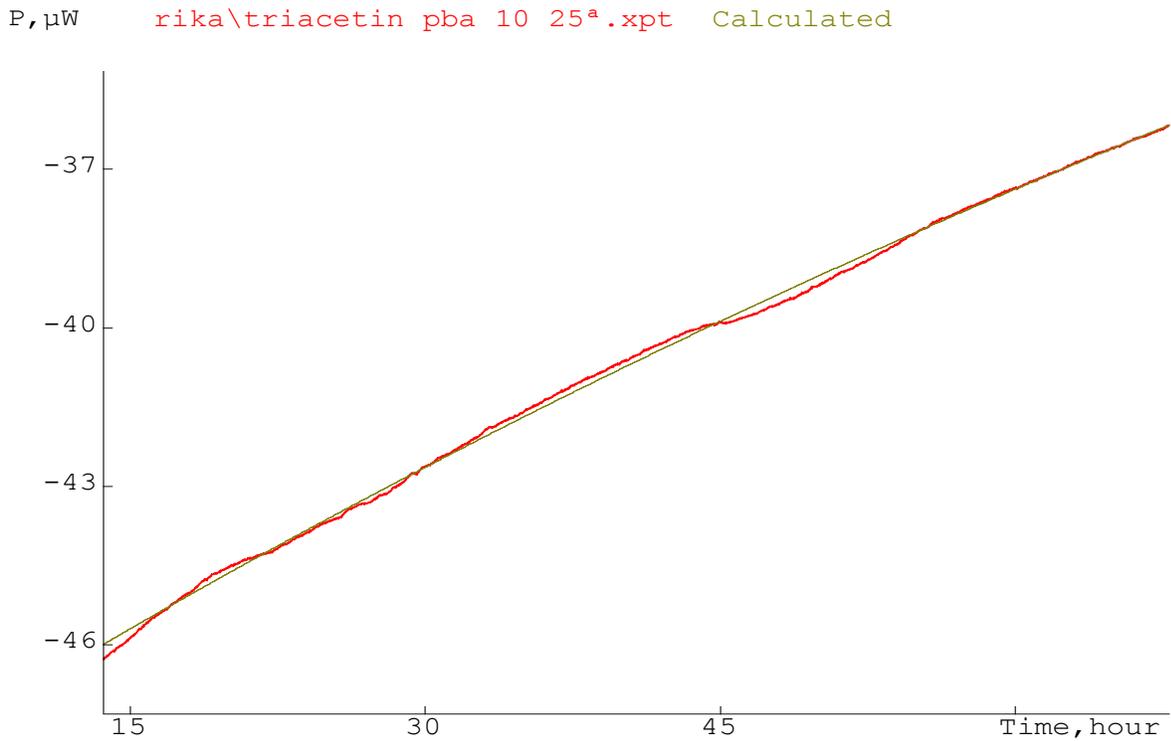
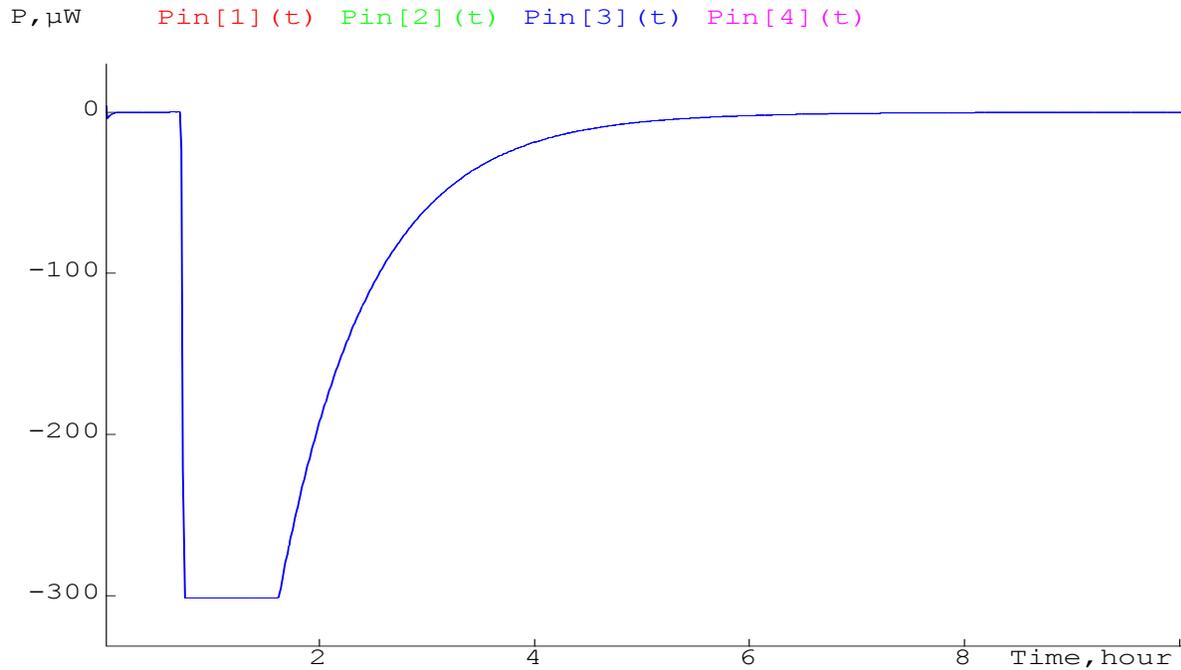
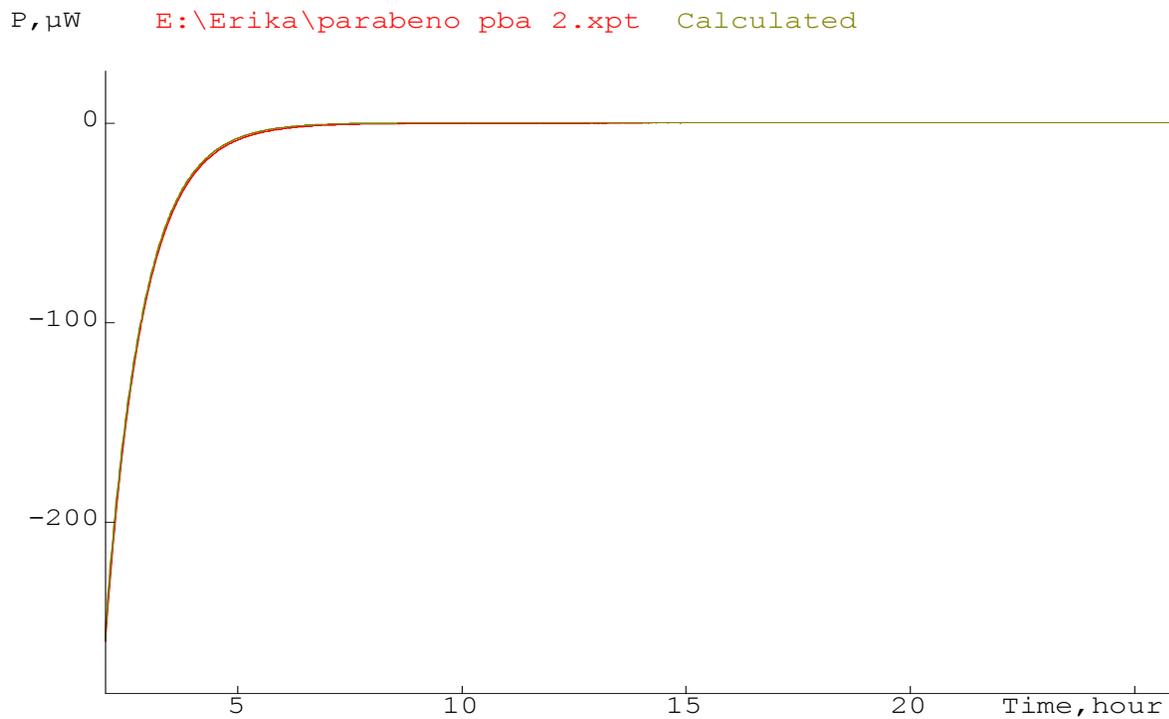


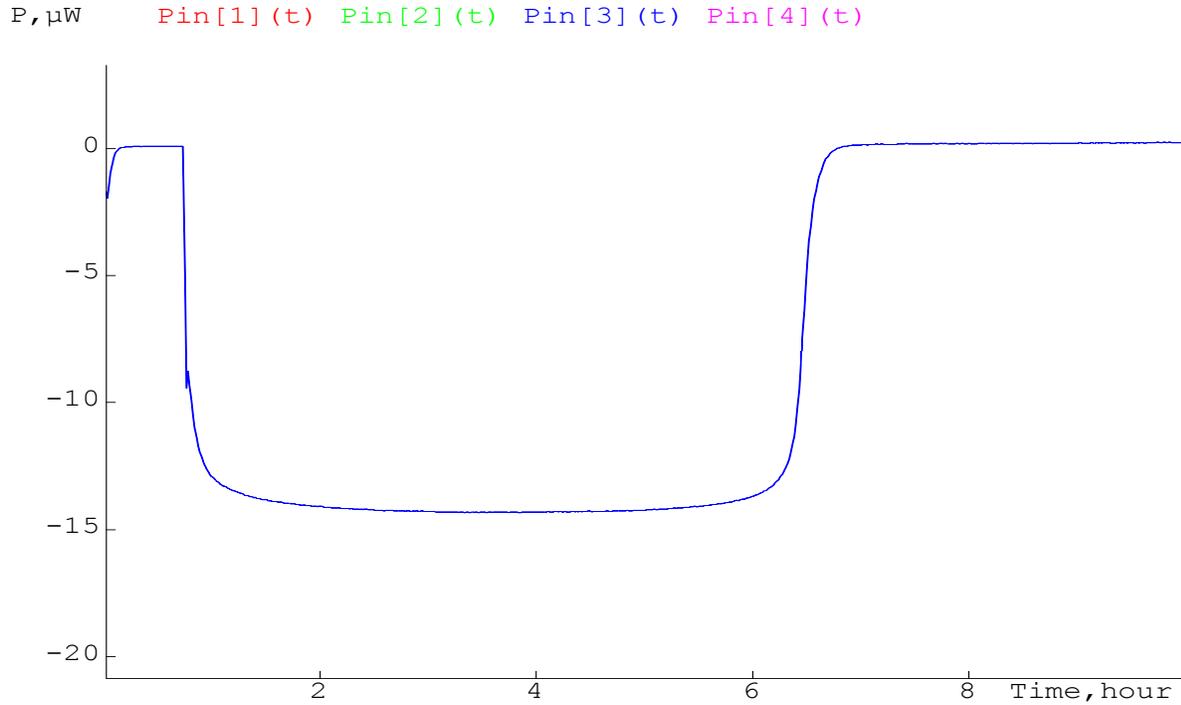
Figura 6.3. Ajuste de datos experimentales de la hidrólisis de triacetina siguiendo una cinética de segundo orden<sup>18</sup>.



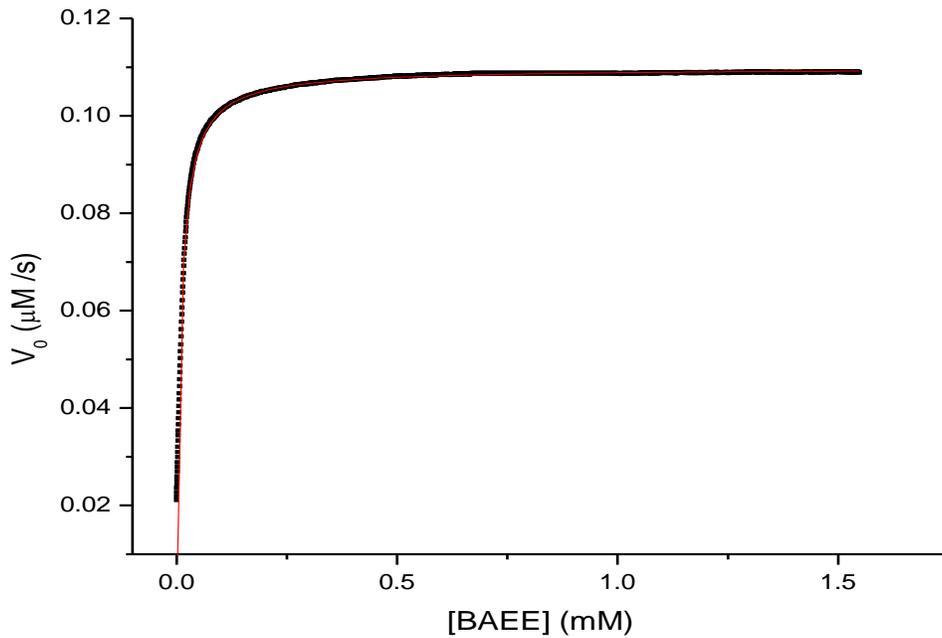
**6.4. Potenciograma de la hidrólisis de metil parabeno en medio básico a 25°C, [metil parabeno]= 0.05 M.**



**Figura 6.5. Ajuste de datos experimentales de la hidrólisis de metil parabeno siguiendo una cinética de primer orden<sup>19</sup>.**



**Figura 6.6.** Potenciograma de la hidrólisis del BAEE catalizada por tripsina bovina a 25°C, [BAEE] 2.5mM, [tripsina] 9.6 nM, en buffer TRIS 200mM y pH 8.0.



**Figura 6.7.** Gráfica rapidez vs concentración de BAEE. Ajuste con un  $R^2 = 0.988$

Tabla 6.1. Parámetros termodinámicos y cinéticos de las reacciones de validación.

Hidrólisis	Datos experimentales		Datos de la literatura		Ref
	Entalpías ( $\Delta H$ )	Constantes cinéticas ( $k$ )	Entalpías ( $\Delta H$ )	Constantes cinéticas ( $k$ )	
triacetina	$(-102.65 \pm 4.11)$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(2.50 \pm 0.12) \times 10^{-6}$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	$(-91.7 \pm 3.0)$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(2.80 \pm 0.10) \times 10^{-6}$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	18
metil parabeno	$(-60.58 \pm 0.15)$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(3.23 \pm 0.11) \times 10^{-4}$ s <sup>-1</sup>	$(-56.4 \pm 0.2)$ kJ mol <sup>-1</sup>	$(3.15 \pm 0.11) \times 10^{-4}$ s <sup>-1</sup>	29
BAEE	$(-48.70 \pm 6.69)$ kJ/mol ó $(-11.65 \pm 1.6)$ kcal mol <sup>-1</sup>	$K_M = 9.6 \pm 1 \mu\text{M}$ $k_{cat} = (12.22 \pm 1.1) \text{ s}^{-1}$	-11.45 kcal mol <sup>-1</sup>	$K_M = 5 \mu\text{M}$ $k_{cat} = 16 \text{ s}^{-1}$	20

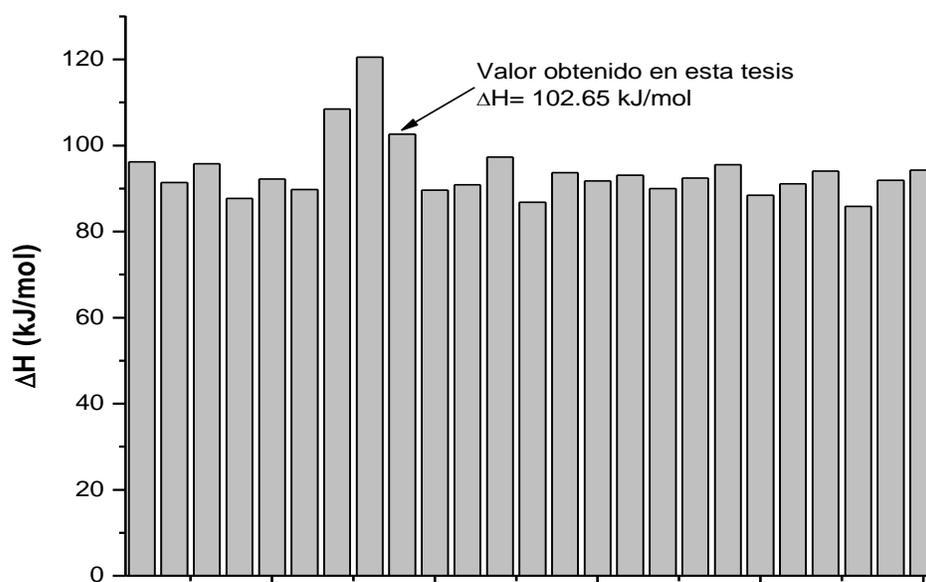
En la Tabla 6.1 se presentan los promedios de las constantes de rapidez ( $k$ ), entalpías de reacción ( $\Delta H$ ), constantes de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) y constantes catalíticas ( $k_{cat}$ ) según sea el caso de la reacción y las desviaciones estándar obtenidos de hacer por triplicado cada reacción. Así mismo se incluyen valores reportados en la literatura para hacer una comparación. Los valores experimentales que yo obtuve presentan una desviación estándar entre el 4 y el 14%.

Analizando los valores de  $\Delta H$  para las tres reacciones, se aprecia que son mayores a los reportados; aunque para los casos del BAEE y del metil parabeno la diferencia es menor al 8%. Para la triacetina esta diferencia aumenta a un 12% con respecto al valor promedio reportado por varios laboratorios. Sin embargo entra dentro del rango máximo de valores de entalpía publicados (Figura 6.8).<sup>18</sup>

Los valores de la  $k$  de rapidez de las hidrólisis de triacetina y del metil parabeno son muy parecidos a los publicados (difieren en < 10%). En cambio en la hidrólisis del BAEE la diferencia para la  $K_M$  es casi el doble de la reportada en la literatura y la  $k_{cat}$  es aproximadamente un 25% menor. A pesar de que estos últimos resultados parecieran tener un gran error, están dentro del rango normal de variación de las constantes cinéticas para reacciones enzimáticas<sup>31</sup>. En general los valores de  $k_{cat}$  y  $K_M$  reportados

para una misma reacción enzimática en la literatura llegan a variar por un factor de 2.5 a 2.9 en promedio respectivamente<sup>31</sup>. Entre los factores que pudieron afectar los resultados de las mediciones están: que cada vez que realizaba la reacción preparaba en fresco los reactivos, y al emplear cantidades muy pequeñas de enzima y sustrato, es posible que haya generado errores en el pesado. También al tratarse de reacciones de hidrólisis puede ser que los reactivos se hayan hidrolizado un poco, antes de comenzar la medición de la reacción.

Las diferencias entre las entalpías de reacción de los resultados que se obtuvieron en este trabajo y los reportados en la literatura para las tres reacciones estudiadas son muy similares, lo cual puede sugerir que haya una diferencia sistemática entre nuestro calorímetro y el utilizado en otras publicaciones. Sin embargo como ya se mencionó anteriormente, esta diferencia entra dentro del rango máximo de valores de entalpía publicados. A partir de esto, podemos decir que el TAM nos permitirá hacer mediciones de cinética confiables.



**Figura 6.8.** Gráfico en el cual se presentan los valores de entalpía reportados por diferentes laboratorios<sup>18</sup> para la reacción de triacetina y el valor que obtuve en esta tesis (señalado por la flecha).

## 6.2. Hidrólisis enzimática del dodecil sulfato de sodio.

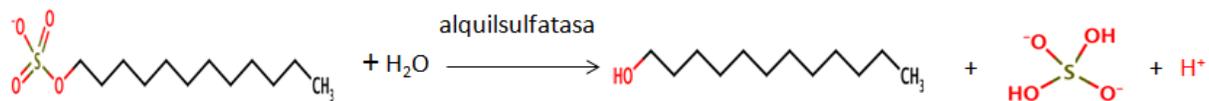


Figura 6.9. Reacción de hidrólisis del dodecil sulfato de sodio.

La primera tarea consistió en encontrar las condiciones experimentales a las cuales la reacción pudiera ser estudiada. Se partió de una temperatura de 25°C y de un buffer de HEPES 20mM a pH 7.5 y se fueron cambiando las concentraciones de enzima y de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se eligieron ese pH, buffer y temperatura porque ya se han reportado valores de  $K_M$  para la hidrólisis del SDS a estas condiciones<sup>17</sup>. Estas primeras mediciones se realizaron con el mismo método que la validación (método Ampoule).

### 6.2.1. Método “Ampoule”.

En la Figura 6.10 se muestran dos de los primeros potenciogramas obtenidos. En el A indico el momento en el cual se bajan las celdas completamente al detector y que corresponde a cuando el TAM empieza a registrar las mediciones. Se puede ver cómo la señal de potencia baja de cero hasta los -60  $\mu W$  aproximadamente y después regresa a -10  $\mu W$  y a partir de aquí comienza a decrecer la señal lentamente hasta que termina la reacción. En la Figura 6.10B se muestra el potenciograma de la reacción pero utilizando una concentración mayor de SDS que la del potenciograma A. Se puede ver que la perturbación en este caso es menor a la que se observa en el primer potenciograma. La razón de esto podría ser que las celdas se bajaron más lentamente o a que la diferencia de temperaturas entre las celdas y el calorímetro era menor en este caso.

En ambos potenciogramas se observa el mismo comportamiento, lo cual indica que al bajar las celdas se está perturbando demasiado al calorímetro, un fenómeno conocido como shock térmico<sup>25</sup>. Este shock tarda tiempo en disiparse y por lo tanto sólo se puede

medir el calor asociado al final de la reacción. Esto no se observa en los potenciogramas de las reacciones hechas en la validación, porque el calor liberado por las tres reacciones es mayor a la perturbación generada al bajar las celdas provocando que quede enmascarada la perturbación por el calor asociado a la reacción.

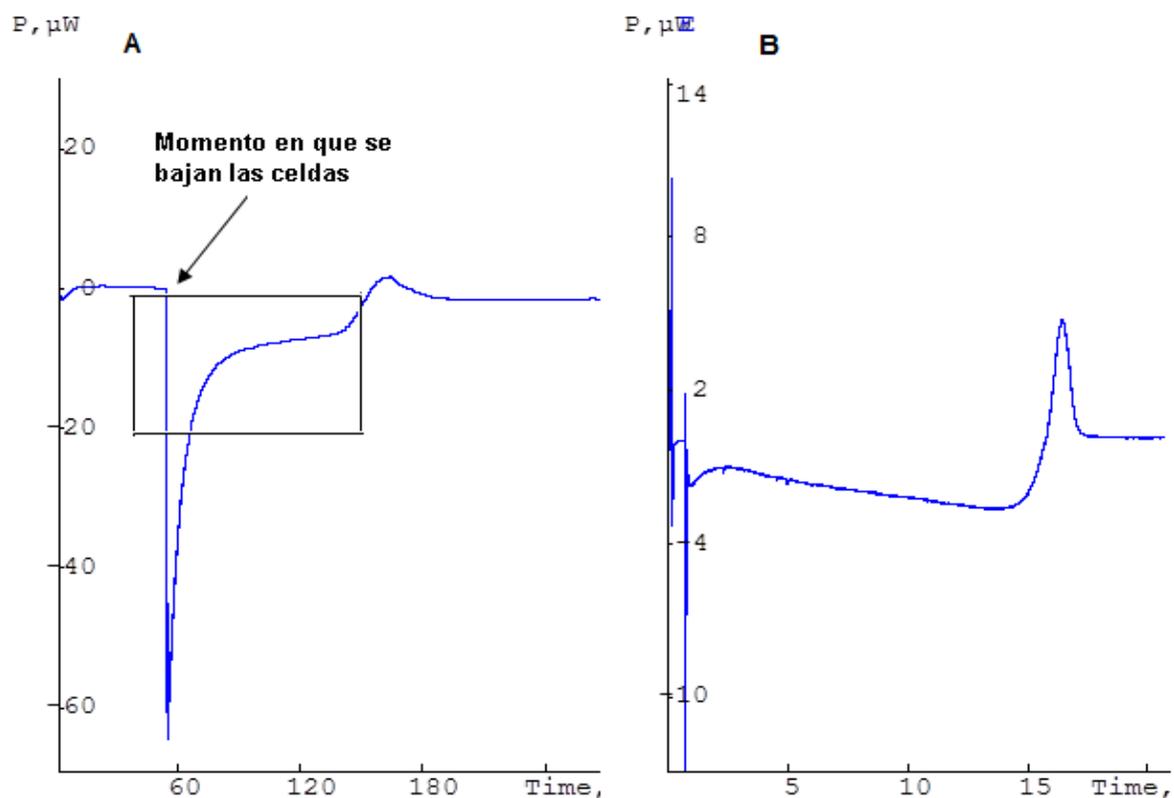
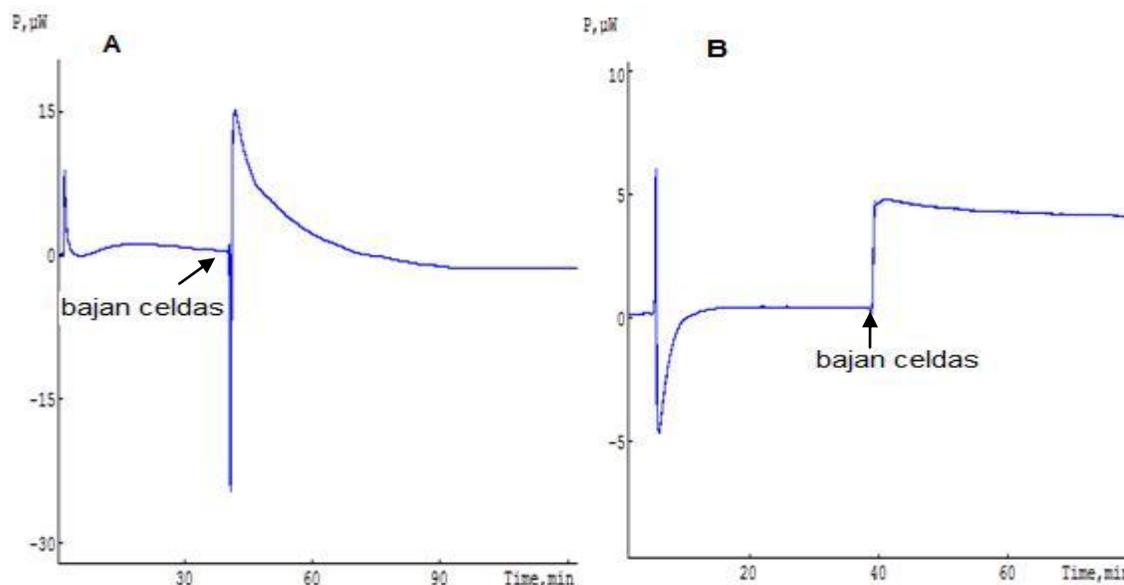


Figura 6.10. Ambos potenciogramas son de la reacción de hidrólisis de SDS catalizada por SdsA1 a 25°C, en buffer HEPES 20mM pH 7.5. (A) [SDS] 250 $\mu\text{M}$  y [enzima] 6nM; (B) [SDS] 400 $\mu\text{M}$  y [enzima] 6nM.



**Figura 6.11.** Potenciogramas donde se muestran perturbaciones resultado solo de bajar las celdas. En ambos casos las celdas contenían solo 3 mL de agua destilada.

En los potenciogramas de la Figura 6.11, se muestra la señal generada al bajar las celdas, que contenían solo 3 mL de agua desionizada. Como se puede observar, las perturbaciones generadas no muestran un mismo comportamiento, en ocasiones puede ser muy grande y en otras menor. Esto puede depender de qué tan rápido se bajan las celdas, de la diferencia de temperaturas entre el TAM y las celdas, etc.<sup>25</sup>, lo que representa un problema al medir porque no podemos saber qué tanto influirá esto a las mediciones.

Con esto podemos saber que la hidrólisis del SDS, es un proceso en el cual el calor liberado al llevarse a cabo la reacción es pequeño y el método que empleamos no permite identificar un punto de inicio de las mediciones del calor. En consecuencia es difícil poder realizar un ajuste cinético de los valores experimentales. Además, pierdo 50 minutos de medición de la reacción, porque como se describe en el apartado del método “ampoule” del capítulo cuatro, en este método la reacción se inicia fuera del calorímetro y se dejan que las celdas se equilibren con la temperatura del TAM dentro del mismo cerca de 40 minutos, este tiempo es considerable tomando en cuenta que la

reacción no va a durar demasiado tiempo y que el calor asociado a ella da como resultado una señal pequeña.

### 6.2.2. Método inyección.

Debido a los problemas mencionados en la sección anterior se cambió de método “ampoule” al de “inyección”, el cual fue descrito en el capítulo 4. Los potenciogramas que se obtienen con este nuevo método son como el de la Figura 6.12, en el cual el primer pico que se observa representa la calibración electrónica que hace el calorímetro, después de la cual toma una segunda línea base para que posteriormente haga la inyección del SDS. El resto de los potenciogramas que se muestran en este trabajo, se les ha recortado la parte de la calibración y sólo se presenta la parte de la reacción para su mejor apreciación.

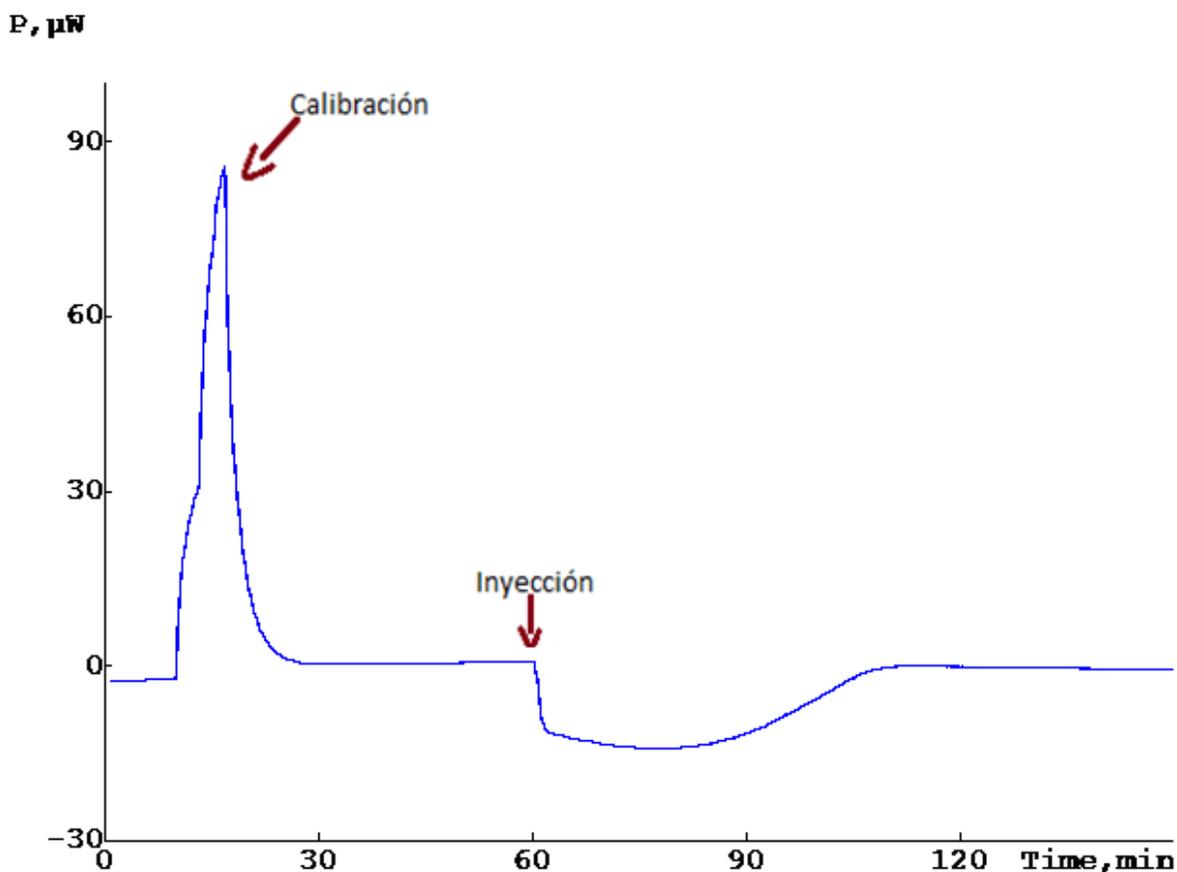
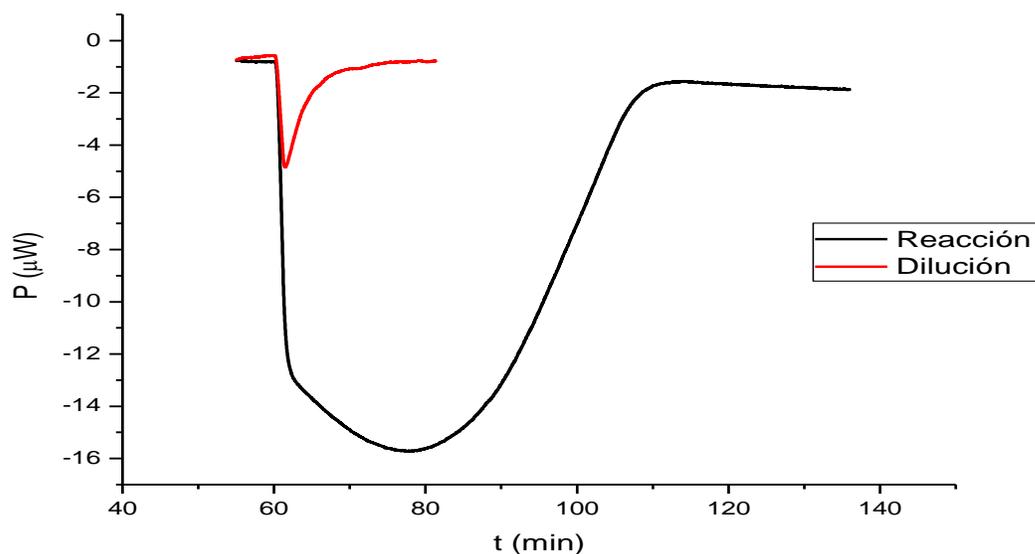


Figura 6.12. Potenciograma de la hidrólisis de SDS por la enzima SdsA1 obtenido utilizando el método de inyección.

Al emplear el método de inyección es importante considerar que el calor obtenido del calorímetro no sólo corresponde al calor asociado a la hidrólisis del SDS, también incluye el calor asociado a la dilución de la enzima además del calor de dilución del SDS. Por lo tanto es importante medir este calor asociado a la dilución, y para esto se realizó el procedimiento descrito en el capítulo 4, resultando que en promedio el calor de dilución representa de un 3 a 3.5 % del calor liberado durante la reacción. Este valor fue restado de los calores totales de la reacción y fue medido cada vez que se cambió alguna condición experimental (temperatura, buffer, pH). En la Figura 6.13 se muestra un ejemplo del potenciograma que se obtiene de medir el calor de dilución (rojo) en comparación con el calor medido de la reacción (negro).



**Figura 6.13.** Potenciogramas de un experimento para medir el calor de dilución (área bajo la curva= 972.72  $\mu\text{J}$ ) y de un experimento para medir la hidrólisis de SDS (área bajo la curva= 30.502 mJ).

Ya con este nuevo método se continuó buscando las concentraciones de SDS y de enzima a las cuales se pudiera apreciar claramente la reacción. Para lograrlo se hicieron experimentos manteniendo fija la concentración de enzima en 20nM y variando sólo la concentración de SDS. Las concentraciones utilizadas de SDS fueron: 10, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{M}$ , obteniendo los siguientes potenciogramas (Figuras 6.14 – 6.18).

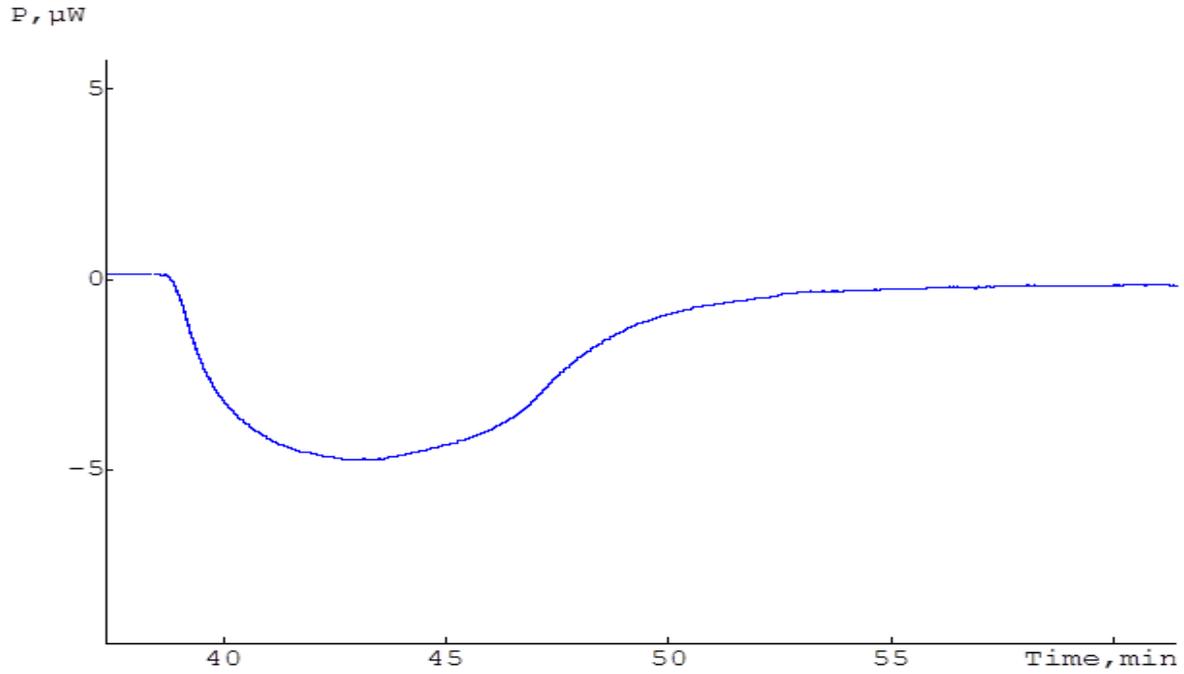


Figura 6.14. Potenciograma, reacción de hidrólisis de SDS 10  $\mu\text{M}$ , [enzima] = 20 nM en HEPES 20 mM, pH 7.5, 25°C.

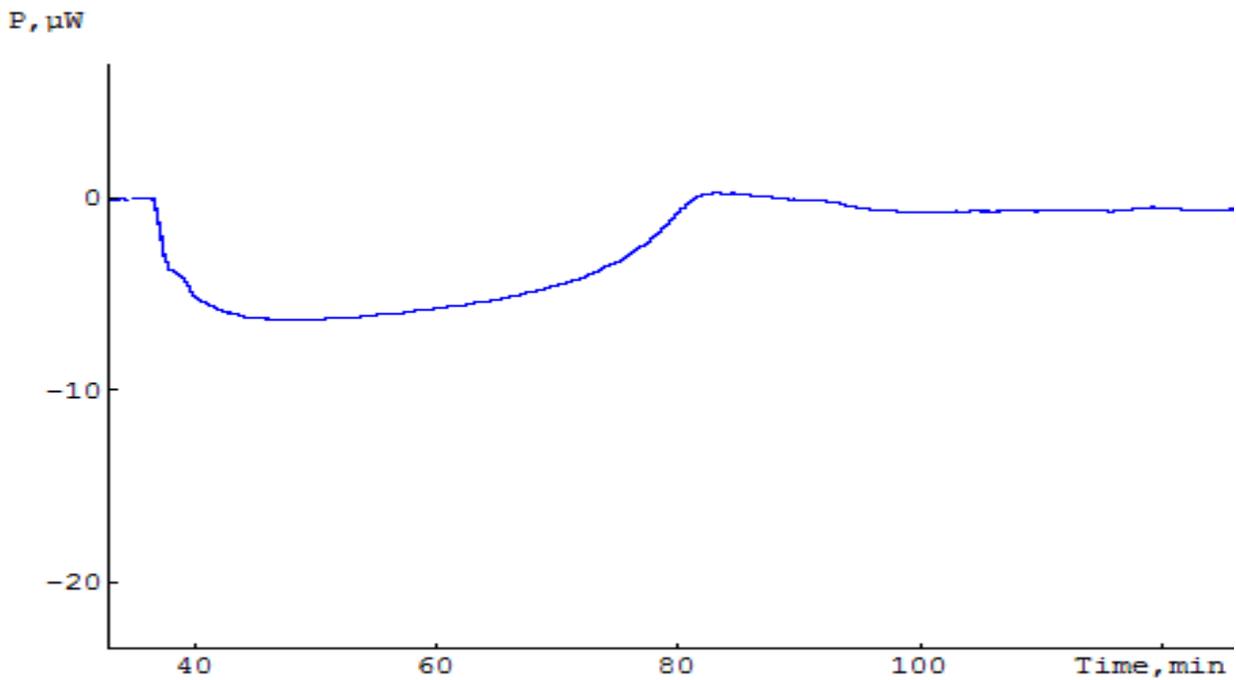


Figura 6.15. Potenciograma, reacción de hidrólisis de SDS 50  $\mu\text{M}$ , [enzima] = 20 nM en HEPES 20 mM, pH 7.5, 25°C.

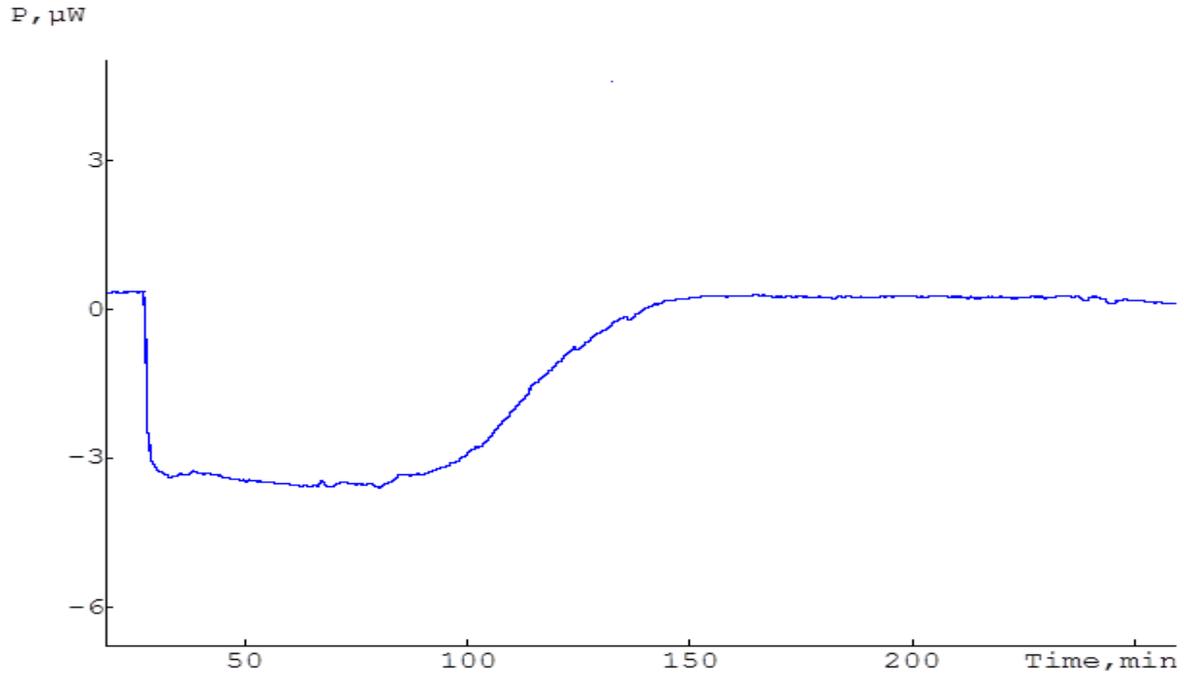


Figura 6.16. Potenciograma, reacción de hidrólisis de SDS  $100 \mu\text{M}$ , [enzima] =  $20 \text{ nM}$  en HEPES  $20 \text{ mM}$ , pH 7.5,  $25^\circ\text{C}$ .

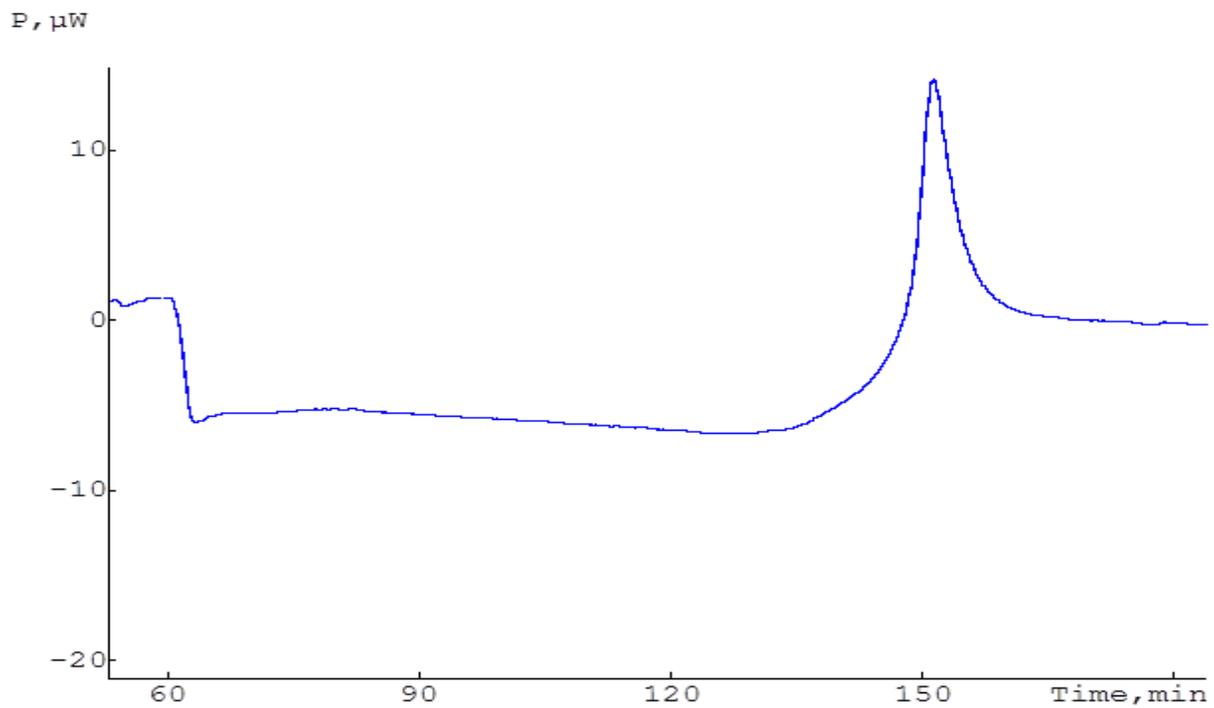
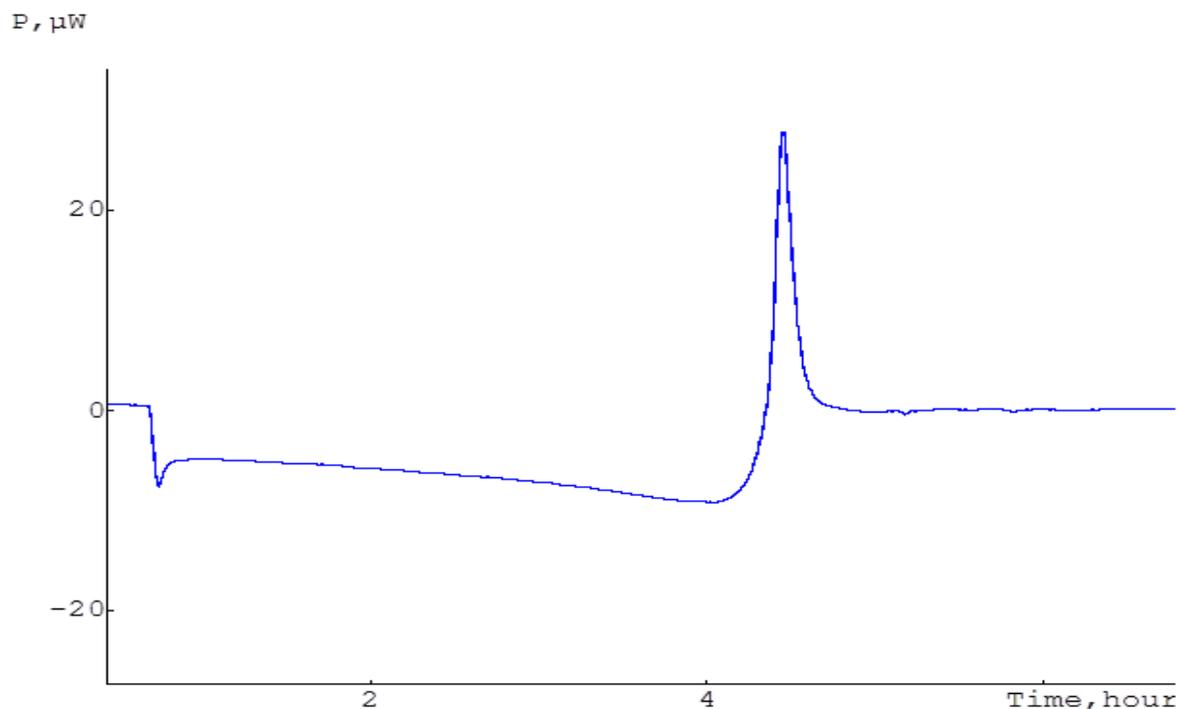


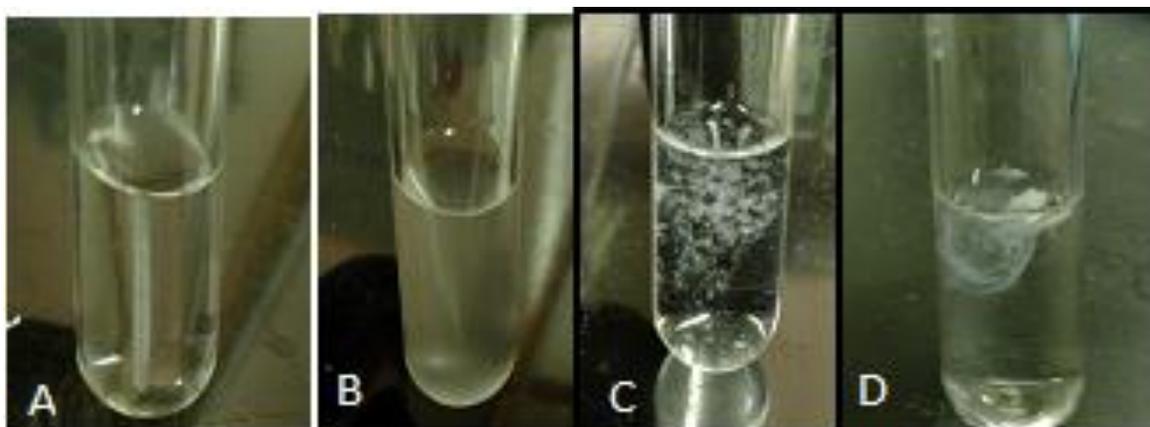
Figura 6.17. Potenciograma, reacción de hidrólisis de SDS  $200 \mu\text{M}$ , [enzima] =  $20 \text{ nM}$  en HEPES  $20 \text{ mM}$ , pH 7.5,  $25^\circ\text{C}$ .



**Figura 6.18. Potenciograma, reacción de hidrólisis de SDS 400  $\mu\text{M}$ , [enzima] = 20 nM, en HEPES 20 mM, pH 7.5, 25°C.**

En todos los potenciogramas anteriores se observa cómo las señales son pequeñas en comparación con las que se presentan en las reacciones de validación. En el caso particular de las [SDS] = 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , las reacciones terminan en menos de 1 hora, las señales mostradas se observan claramente. Por el contrario, a las [SDS] = 200 y 400  $\mu\text{M}$  casi al final de la reacción presentan un comportamiento anómalo. Como se ve en las Figuras 6.17 y 6.18, la señal registrada a partir de que inicia la reacción va decreciendo hasta llegar a un punto mínimo en los valores negativos a partir del cual se espera que la señal comience a regresar a cero (como se observa en las otras tres concentraciones). Pero esto no ocurre, sino que la señal continúa hasta llegar a valores positivos de potencia donde también llega a un valor máximo y comienza a decrecer hasta llegar a cero y tomar una línea. Este pico que aparece casi al final de la reacción corresponde a un proceso endotérmico y es aún más notorio en la concentración de 400  $\mu\text{M}$  de dodecil sulfato de sodio. En un principio este comportamiento se atribuyó a la separación del dodecanol (producido en la reacción) de la fase acuosa, teniendo al final dos fases.

Para comprobar esta idea, se llevó a cabo la reacción fuera del calorímetro en tubos de ensayo con y sin agitación y se observó que casi al tiempo en que se esperaba que terminara la reacción se comenzaba a observar una turbidez en los tubos (Figura 6.19). Después de realizar la reacción en los tubos de ensayo, pudimos ver que el pico endotérmico en el potenciograma es provocado por la expulsión del dodecanol producido en la reacción de la fase acuosa cuando alcanza, su límite de solubilidad.



**Figura 6.19** Fotografías de la reacción de hidrólisis del SDS con la enzima SdsA1 en tubos de ensayo. En las fotografías A, B y C se muestra la reacción de hidrólisis de [SDS]= 400  $\mu\text{M}$ , en buffer HEPES 20 mM, pH 7.5 y [enzima] 30 nM a  $\approx 22^\circ\text{C}$ . En la fotografía A se muestran la reacción al tiempo cero. En la B, la reacción después de 24 hr bajo agitación. La mezcla de reacción muestra gran turbidez. En la C, se muestra la reacción 24 horas después sin agitación. En la D, se muestra el final de la reacción de 1 mM de SDS y utilizando 20 nM de enzima.

Otra observación importante que se aprecia en los potenciogramas, especialmente a concentraciones de SDS = 200 y 400  $\mu\text{M}$ , es que la señal registrada por el TAM a partir de que inicia la reacción comienza a descender hacia los valores negativos ( $\mu\text{W}$ ), pero este descenso se da gradualmente hasta llegar a un punto máximo para después comenzar a disminuir, este comportamiento indica que la reacción está presentando una inhibición por sustrato.

En el caso de las concentraciones 200 y 400  $\mu\text{M}$ , es difícil procesar y ajustar los datos experimentales debido a que el área del proceso endotérmico va aumentando al incrementarse la concentración de SDS y no es posible saber exactamente cuál es el área correspondiente a la reacción y cuál es el área del proceso endotérmico o si este



Tabla 6.2. Valores de los parámetros fisicoquímicos y cinéticos de la reacción de la hidrólisis de SDS con SdsA1 a distintas [SDS].

[SDS] ( $\mu\text{M}$ )	Q (mJ)	$\Delta H$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$\Delta H$ ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
10	$2.39 \pm 0.14$	$-79.74 \pm 4.60$	$-19.06 \pm 1.10$	$2.23 \pm 0.22$	$1.62 \pm 0.17$	$(7.28 \pm 1.04) \times 10^5$
50	$12.0 \pm 0.68$	$-83.31 \pm 4.73$	$-19.91 \pm 1.13$	$1.58 \pm 0.49$	$1.32 \pm 0.11$	$(8.88 \pm 2.84) \times 10^5$
100	$20.56 \pm 1.89$	$-71.64 \pm 6.60$	$-17.12 \pm 1.58$	$5.96 \pm 2.15$	$1.19 \pm 0.14$	$(2.18 \pm 0.83) \times 10^5$
200	$32.95 \pm 5.43$	$-55.76 \pm 9.19$	$-13.33 \pm 2.20$	$3.85 \pm 0.70$	$2.24 \pm 0.54$	$(6.15 \pm 1.85) \times 10^5$
400	$95.34 \pm 4.45$	$-81.00 \pm 3.78$	$-19.36 \pm 0.90$	$8.38 \pm 2.81$	$1.99 \pm 0.65$	$(2.58 \pm 1.21) \times 10^5$

En la Tabla 2 se muestran los valores promedio obtenidos de hacer cuatro veces la reacción y los errores son la desviación estándar excepto para  $k_{\text{cat}}/K_M$  donde el error mostrado fue calculado utilizando  $\Delta X = \sqrt{(\Delta A/A)^2 + (\Delta B/B)^2}$ .

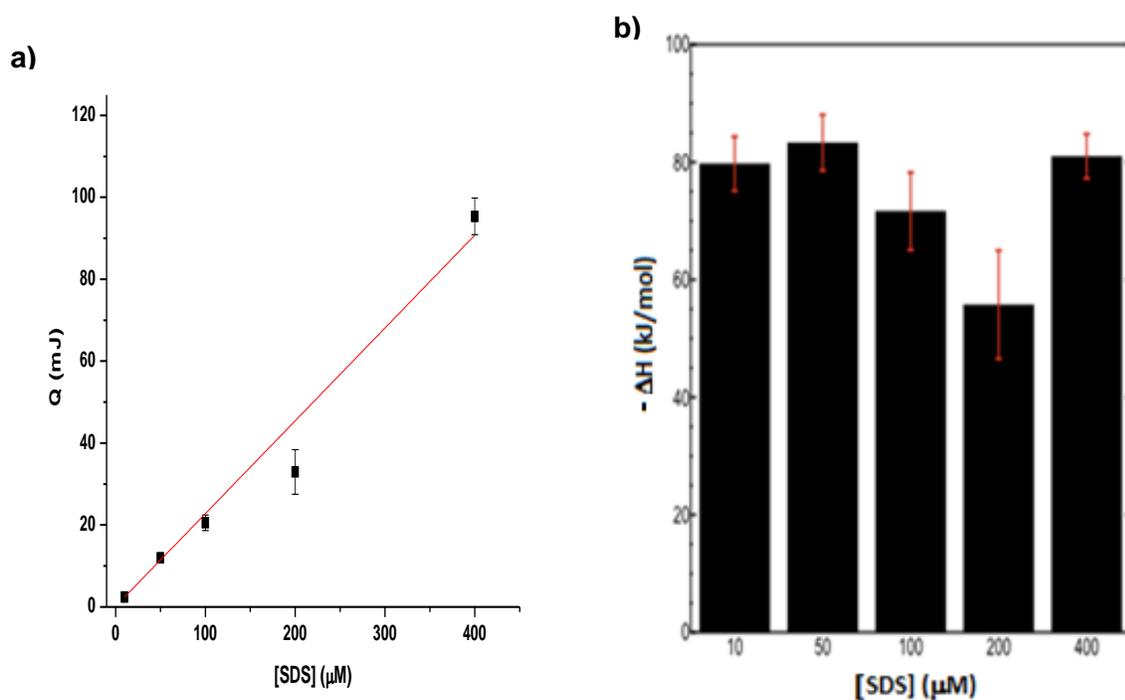


Figura 6.21. a) Gráfica de Q (mJ) vs [SDS] ( $\mu\text{M}$ ). b) Gráfica  $\Delta H$  ( $\text{kJ mol}^{-1}$ ) vs [SDS] ( $\mu\text{M}$ ).

Los valores de entalpía molar en las concentraciones 10, 50 y 400  $\mu\text{M}$  son prácticamente iguales dentro del error experimental (Figura 6.21b), la concentración de 100  $\mu\text{M}$  difiere aproximadamente un 12% respecto a los valores de estas concentraciones y para 200  $\mu\text{M}$  los valores son más bajos en comparación con el resto de las concentraciones. En el caso de Q sus valores van aumentando a mayor concentración de sustrato, lo cual es lógico porque al haber mayor cantidad de SDS se espera que la señal obtenida corresponda a un área mayor debido a que la reacción dura más tiempo. Este aumento se espera que sea proporcional al aumento en la concentración de SDS, pero no se cumple para la concentración de 200  $\mu\text{M}$  donde el valor de Q está muy por debajo del esperado ( $\approx 47$  mJ), Figura 6.21a, esto podría deberse a que el proceso endotérmico está reduciendo el área correspondiente al proceso exotérmico.

Los valores de las constantes cinéticas presentados en la Tabla 6.2 se realizaron utilizando el modelo de Michaelis-Menten (Figura 6.22), pero al conocer que la reacción presenta inhibición por sustrato<sup>30</sup>, los datos experimentales se ajustaron al modelo, que considera este tipo de inhibición (Figura 6.23). En la Tabla 6.3 se presentan los valores para las constantes cinéticas utilizando este modelo, el ajuste de los datos experimentales se realizó utilizando el software Origin, en el cual se generó la siguiente función<sup>30</sup>:

$$v = \frac{V_{max} * [S]}{K_M + [S] + [S]^2 / k_{is}}$$

Donde  $k_{is}$ , es la constante de inhibición por sustrato.

Tabla 6.3. Constantes cinéticas obtenidas con el modelo de inhibición por sustrato

[SDS] ( $\mu\text{M}$ )	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_M$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{is}$ (M)
100	$6.34 \pm 1.49$	$1.35 \pm 0.26$	$(2.16 \pm 0.55) \times 10^5$	$0.009 \pm 0.019$
200	$4.72 \pm 0.75$	$2.44 \pm 0.65$	$(5.37 \pm 1.67) \times 10^5$	$(5.05 \pm 2.45) \times 10^{-4}$
400	$13.17 \pm 5.91$	$2.45 \pm 0.87$	$(1.94 \pm 1.11) \times 10^5$	$(3.07 \pm 1.60) \times 10^{-4}$

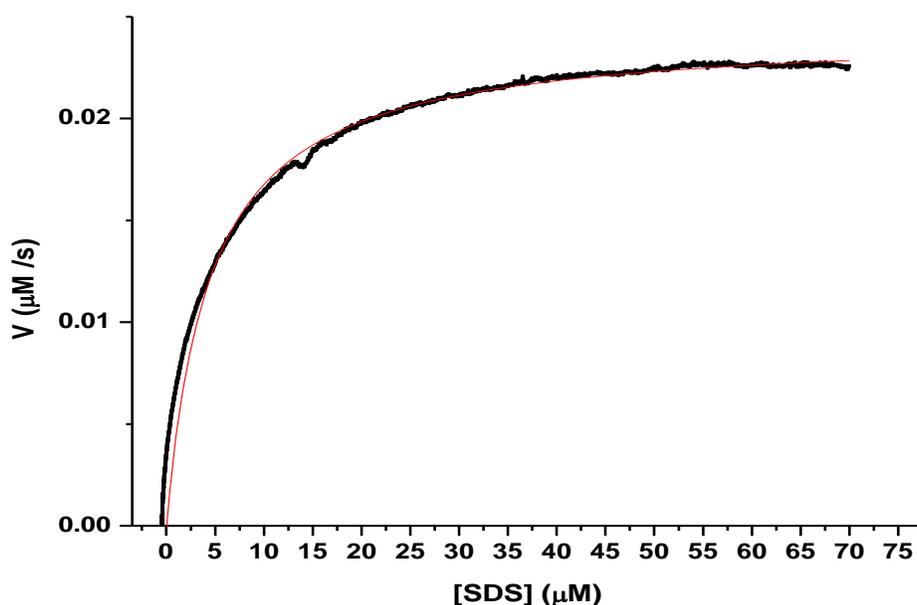


Figura 6.22. Ajuste de los datos experimentales de [SDS] y rapidez inicial, con el programa Origin utilizando el modelo de Michaelis-Menten. En negro se muestran los datos experimentales graficados y en rojo el ajuste que hace el programa a los datos, el ajuste da una  $R^2 = 0.97$ . [SDS] 100  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES, 25°C, pH 7.5.

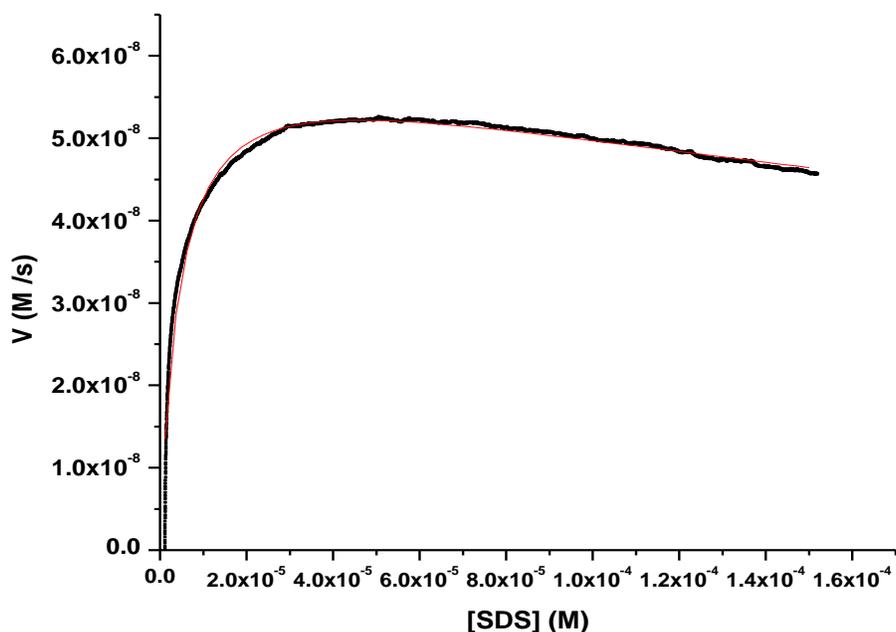


Figura 6.23. Ajuste de los datos experimentales de [SDS] y rapidez inicial, utilizando el modelo de inhibición por sustrato. En negro se muestran los datos experimentales graficados y en rojo el ajuste que hace el programa a los datos, el ajuste da una  $R^2 = 0.98$ . [SDS] 200  $\mu\text{M}$  en buffer HEPES, 25°C, pH 7.5.

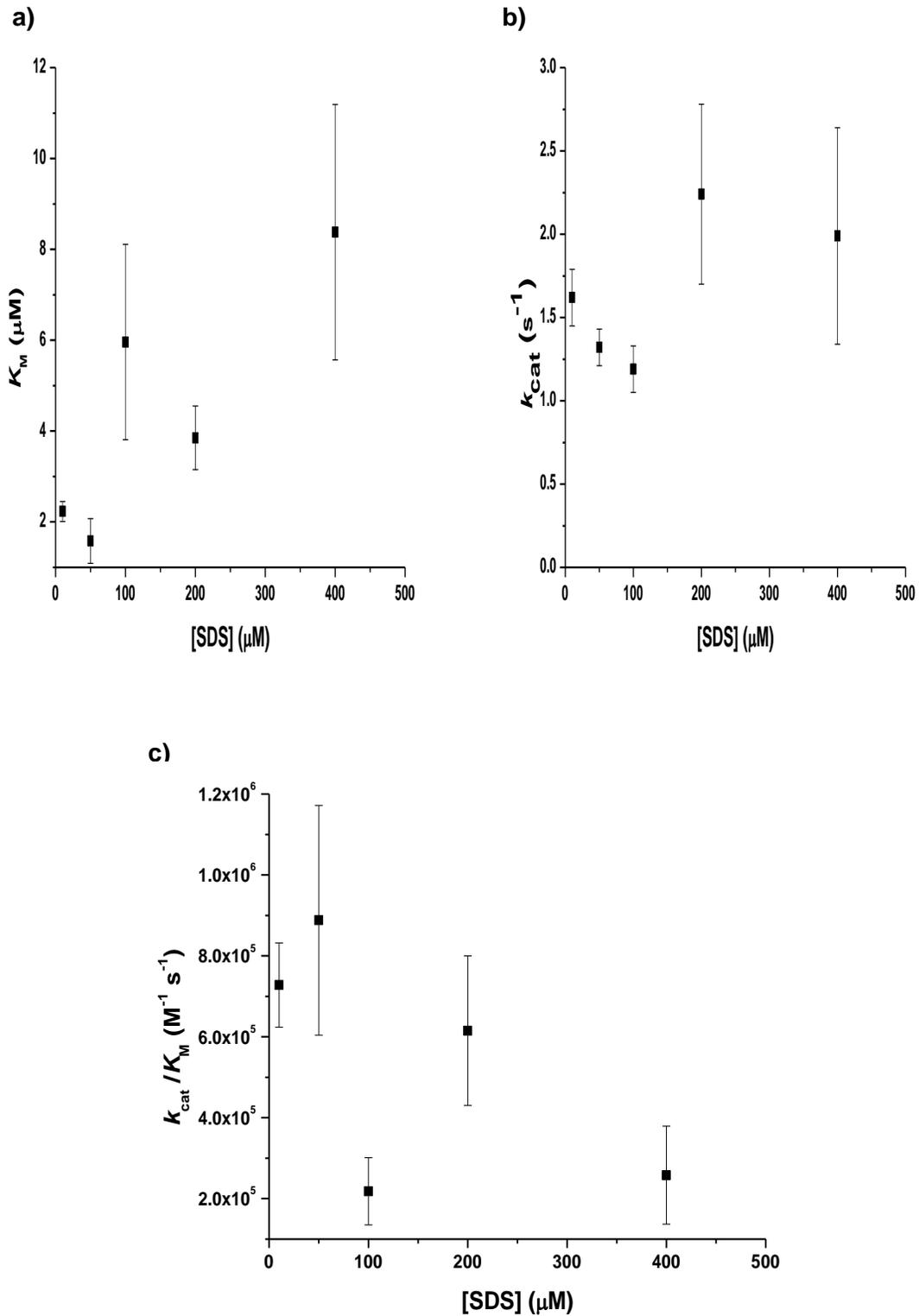


Figura 6.24. a) Gráfica  $K_M$  ( $\mu\text{M}$ ) vs [SDS] ( $\mu\text{M}$ ). b) Gráfica de  $k_{\text{cat}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) vs [SDS] ( $\mu\text{M}$ ). c) Gráfica  $k_{\text{cat}}/K_M$  ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) vs [SDS] ( $\mu\text{M}$ ). Se muestran los valores obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten.

Al utilizar el modelo de inhibición por sustrato con los datos experimentales, para las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  no se presentan los valores de las constantes  $K_M$  y  $k_{\text{cat}}$  en la Tabla 6.3 porque el ajuste con este modelo da valores de la constante  $k_{\text{is}}$  incongruentes de concentración de SDS  $> 10^{15}$ , debido a que este modelo no hace un buen ajuste de los datos experimentales. El hecho de que el valor numérico es muy grande nos puede llevar a concluir que a estas concentraciones no se presenta inhibición por sustrato.

A la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de SDS, al comparar los valores de las constantes cinéticas de las Tablas 6.2 y 6.3 no se presenta mucha diferencia entre ellos ya que no es muy notoria la inhibición por sustrato. Sin embargo, al ajustar los datos experimentales al modelo de inhibición por sustrato nos da un valor de constante de inhibición ( $k_{\text{is}}$ ) unas mil veces mayor que la  $K_M$  con un gran error el cual es  $>100\%$ . Esto es debido a que el ajuste de los datos experimentales de cada repetición no ajustan muy bien a este modelo pues casi no hay inhibición a esta concentración. Y en el caso de las concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  de SDS, el modelo de inhibición por sustrato ajusta bastante bien.

Tomando en cuenta todas las concentraciones estudiadas junto con sus errores experimentales, se observa que los valores para la  $K_M$ ,  $k_{\text{cat}}$  y  $k_{\text{cat}}/K_M$  no cambian su tendencia al ajustar los datos experimentales al modelo de inhibición por sustrato (Tabla 6.2 y 6.3).

En el caso de la  $K_M$  los valores aumentan conforme lo hace la [SDS], para los valores obtenidos del ajuste de Michaelis-Menten sería lógico este comportamiento porque también va aumentando la inhibición en la reacción, pero al observar los valores obtenidos al ajustar al modelo de inhibición por sustrato la tendencia no desaparece, lo cual podría ser causado a que a concentraciones bajas de [SDS] el calorímetro registra mediciones cercanas al ruido del equipo y al regresar más rápido la señal se podrían estar subestimando los valores de potencia. Y a concentraciones mayores de SDS, se tiene el problema de la aparición del pico endotérmico, el cual no sabemos qué tanto influye en el área del proceso exotérmico.

Para la  $k_{\text{cat}}$  como se muestra en la Figura 6.24b, se observa que a las concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  la  $k_{\text{cat}}$  aumenta lo cual puede ser porque el ajuste que se hace para obtener el calor del proceso exotérmico no es el mejor y como se mencionó anteriormente quizás el proceso endotérmico esté restándole calor al proceso exotérmico. A las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$  se observa que los valores son prácticamente iguales (están dentro del error experimental), pero el valor para 10  $\mu\text{M}$  de SDS es mayor al que se tiene en las dos concentraciones anteriores, esto se puede deber a que a bajas concentraciones de SDS el calorímetro está dando mediciones cercanas al ruido del mismo.

Las concentraciones de 200 y 400  $\mu\text{M}$  son en las que se observa una mayor diferencia con respecto al resto de las concentraciones, esto quizá se deba a que el ajuste hecho para conocer el Q de la reacción no es el mejor y se está perdiendo información.

Al observar variación en los valores de  $K_M$ , se realizó la Figura 6.25 en la cual se grafican los valores de rapidez iniciales obtenidos a las concentraciones 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  y a partir de esto se construyó la gráfica de Michaelis-Menten la cual después de hacer el ajuste se obtuvo una  $K_M = 4.71 \mu\text{M}$  y una  $k_{\text{cat}} = 2.52 \text{ s}^{-1}$ . Como se observa la  $K_M$  aumenta en comparación con la que se presenta en la Tabla 6.2 para  $[\text{SDS}] = 200 \mu\text{M}$  y lo mismo ocurre con la  $k_{\text{cat}}$ , pero son muy parecidas con las obtenidas ajustando los datos al modelo de inhibición por sustrato (Tabla 6.3) para 200  $\mu\text{M}$  de SDS.

A partir de estos resultados se decidió utilizar una concentración de 100  $\mu\text{M}$  para proseguir con los demás experimentos, porque a esta concentración no se observa una contribución del pico atribuido a la producción de dodecanol, al proceso de la reacción y aseguramos que la enzima se encuentre saturada de dodecil sulfato de sodio, el resto de las condiciones empleadas fueron: [enzima] 20nM, [HEPES] 20mM, pH 7.5 a 25°C.

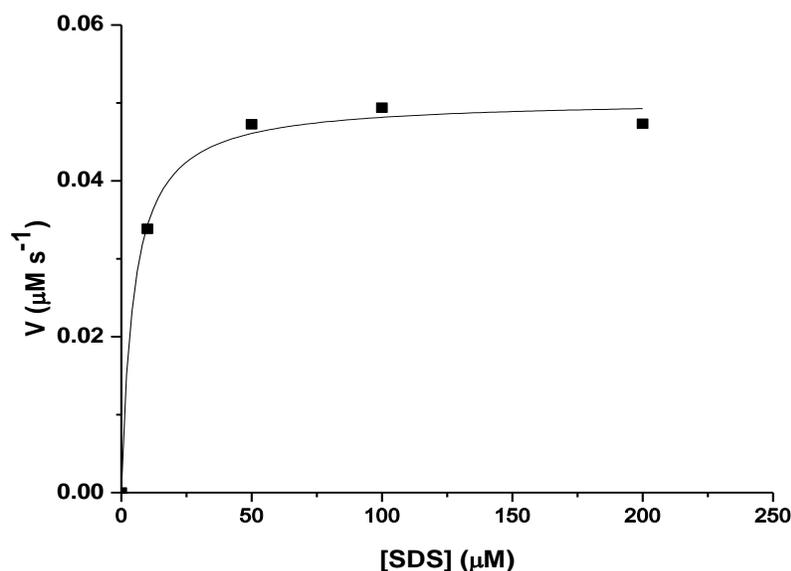


Figura 6.25. Gráfica de Michaelis-Menten para la reacción a 25°C, pH 7.5 en HEPES.

### 6.2.3. Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática del SDS.

Ya establecidas las condiciones experimentales, se realizó la reacción a las temperaturas de 15, 20, 25, 30 y 35°C. En todas las temperaturas se trabajó a una [SDS] de 100 μM excepto a 30°C en donde se utilizó una [SDS] = 25 μM y 15 nM de enzima porque a 100 μM, se observó nuevamente el pico endotérmico atribuido a la separación del dodecanol de la fase acuosa de la reacción. A 25 μM de SDS este comportamiento anómalo no se observa y es por eso que se decidió trabajar esta temperatura a esas condiciones.

En la Figura 6.26 se muestra las gráficas de rapidez inicial vs temperatura. Se aprecia que al aumentar la temperatura se alcanzan valores de rapidez inicial mayores debido a que los reactivos tienen mayor energía cinética provocando que las colisiones entre las moléculas tengan una mayor productividad, esto se refleja en los valores de  $k_{cat}$  que se muestran en la Tabla 6.4, los cuales aumentan conforme lo hace la temperatura. En el intervalo de temperaturas que se trabajó no se llega a presentar un descenso en la  $k_{cat}$  y la incubación de la enzima a las temperaturas de trabajo durante 1 hora tampoco

disminuyó la actividad de la enzima, lo que indicaría que no se llegan a ver indicios de que la enzima se esté desnaturalizando.

En la Tabla 6.4 se presentan los valores de los parámetros tanto cinéticos como fisicoquímicos, los valores de  $\Delta H$  aunque varían entre ellos se puede ver que tienden a disminuir a mayor temperatura (Figura 6.27a); en el caso de la  $K_M$  los valores no presentan una gran variación y de igual forma entran dentro del error de los mediciones, excepto a 30°C donde  $K_M$  da menor que en el resto de las temperaturas, la razón podría ser la concentración de SDS que se utilizó para medir.

Tabla 6.4 Parámetros cinéticos y termodinámicos a diferentes temperaturas.

T (°C)	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$K_M$ (μM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
15	-77.18 ± 6.28	-18.45 ± 1.50	5.20 ± 1.60	0.70 ± 0.14	(1.47 ± 0.53) × 10 <sup>5</sup>
20	-80.02 ± 3.46	-19.12 ± 0.83	6.65 ± 2.31	1.04 ± 0.17	(1.67 ± 0.64) × 10 <sup>5</sup>
25	-71.64 ± 6.60	-17.12 ± 1.58	5.96 ± 2.15	1.19 ± 0.14	(2.18 ± 0.83) × 10 <sup>5</sup>
30	-64.10 ± 4.30	-15.33 ± 1.03	3.91 ± 1.67	2.25 ± 0.57	(7.04 ± 3.0) × 10 <sup>5</sup>
35	-66.78 ± 1.95	-15.96 ± 0.47	5.05 ± 0.77	3.25 ± 0.44	(6.46 ± 1.31) × 10 <sup>5</sup>

En la Tabla 4 se muestran los valores promedio obtenidos de hacer cuatro veces la reacción y los errores son la desviación estándar excepto para  $k_{cat}/K_M$  donde el error mostrado fue calculado utilizando  $\Delta X = \sqrt{(\Delta A/A)^2 + (\Delta B/B)^2}$ .

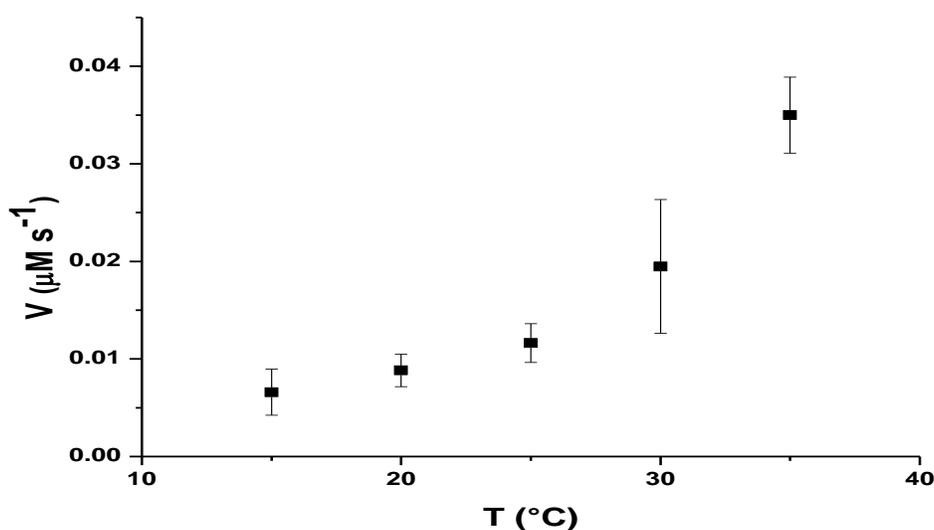


Figura 6.26. Gráfica de rapidez inicial vs T.

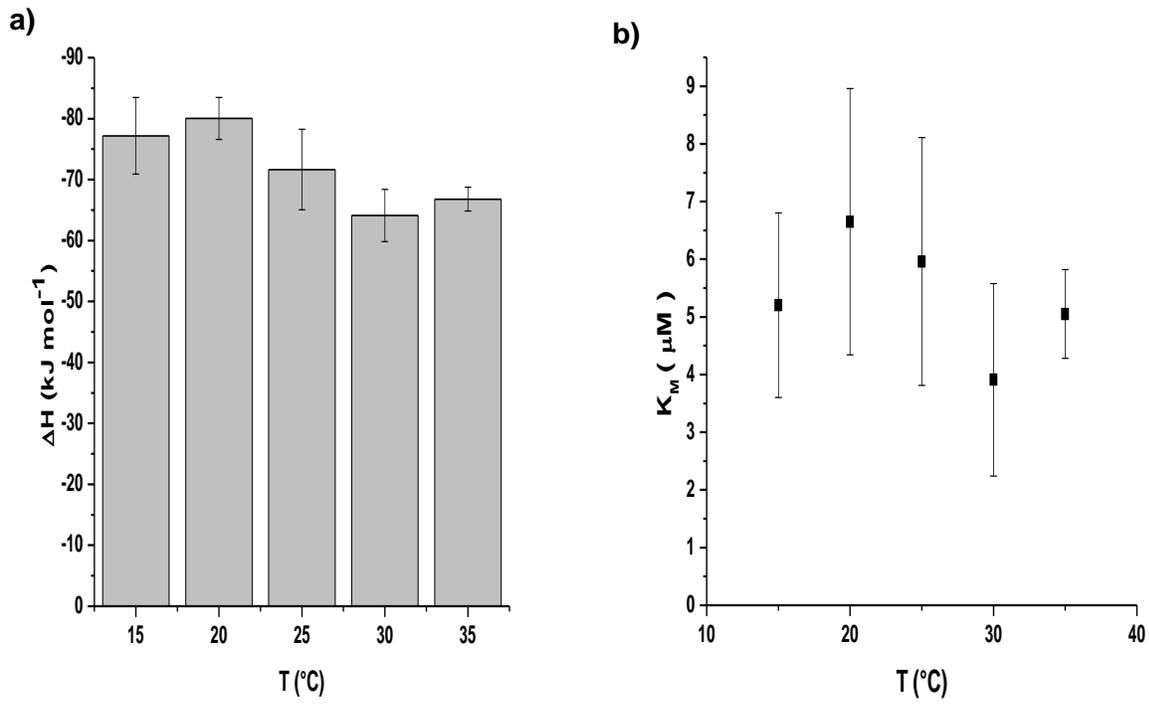


Figura 6.27. a) Gráfica  $\Delta H$  vs  $T$ . b) Gráfica de  $K_M$  vs  $T$ .

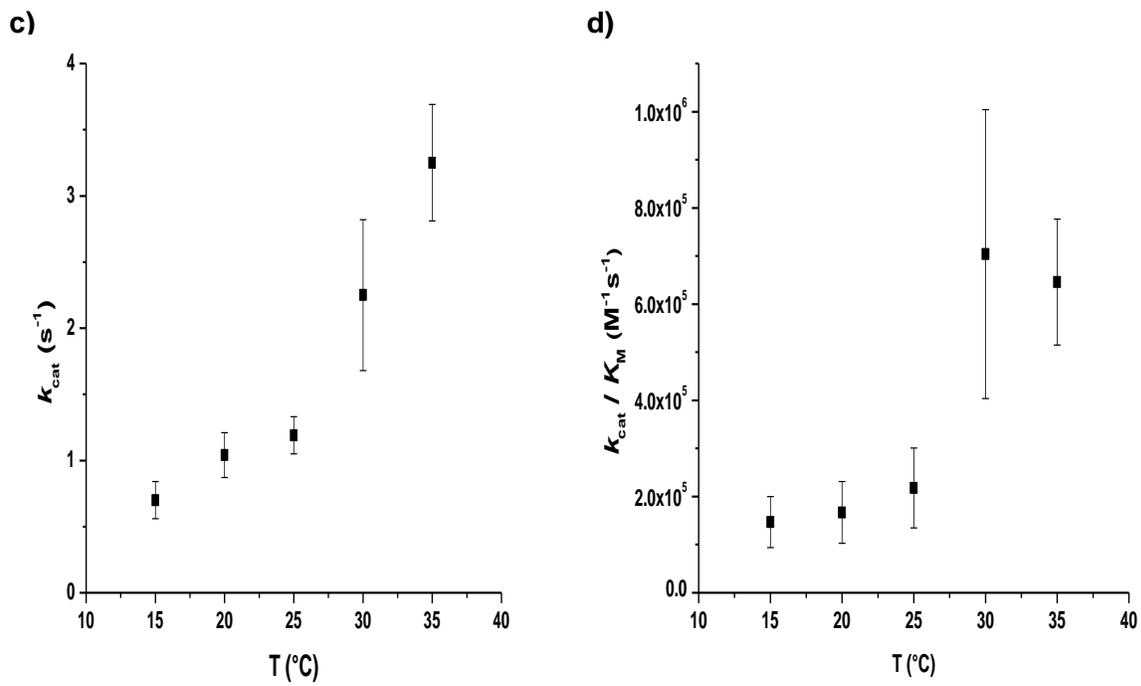
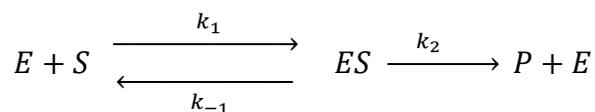


Figura 6.28. c) Gráfica de  $k_{\text{cat}}/K_M$ . d) Gráfica de  $k_{\text{cat}}/K_M$  vs  $T$ .

A partir de los valores de  $k_{\text{cat}}$  se realizó un gráfico de Arrhenius<sup>32</sup> (Figura 6.29), del cual se obtuvo un comportamiento lineal en el rango de temperaturas estudiadas, a partir de la pendiente de la gráfica se calcula la  $E_a = + 57.41 \text{ kJ/mol}$  ó  $+ 13.73 \text{ kcal/mol}$ .

Para la mayoría de las reacciones enzimáticas que siguen el siguiente modelo de catálisis enzimática (Esquema 6.1), se propone como paso limitante de la reacción la disociación del complejo ES para la posterior liberación de los productos, paso que es descrito por la  $k_{\text{cat}}$ .



**Esquema 6.1**

Suponiendo que la enzima SdsA1 siga este comportamiento, es posible a partir del gráfico de Arrhenius para  $k_{\text{cat}}$  caracterizar termodinámicamente ese paso de la catálisis al poder calcular los siguientes parámetros termodinámicos de activación:  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta G^\ddagger$ ,  $T\Delta S^\ddagger$  (entalpía, energía libre de Gibbs y entropía de activación). En la Tabla 6.5 se presentan la energía de activación y el resto de parámetros termodinámicos a 25°C, obtenidos con este gráfico.

La  $\Delta H^\ddagger$ ,  $\Delta G^\ddagger$  y  $T\Delta S^\ddagger$  describen el paso de reactivos al estado de transición para después dar los productos. La entalpía de activación está relacionada con la facilidad de ruptura y formación de enlaces para la conformación del complejo activado. La entropía de activación da información sobre la estructura del complejo activado respecto a la de los reactivos<sup>34</sup>. La  $E_a$ , es la energía necesaria para que se lleve a cabo la reacción química<sup>2</sup>.

Estos parámetros son importantes para saber qué tan buen catalizador de una reacción es la enzima al comparar estos parámetros con los mismos pero de la reacción sin catalizar.

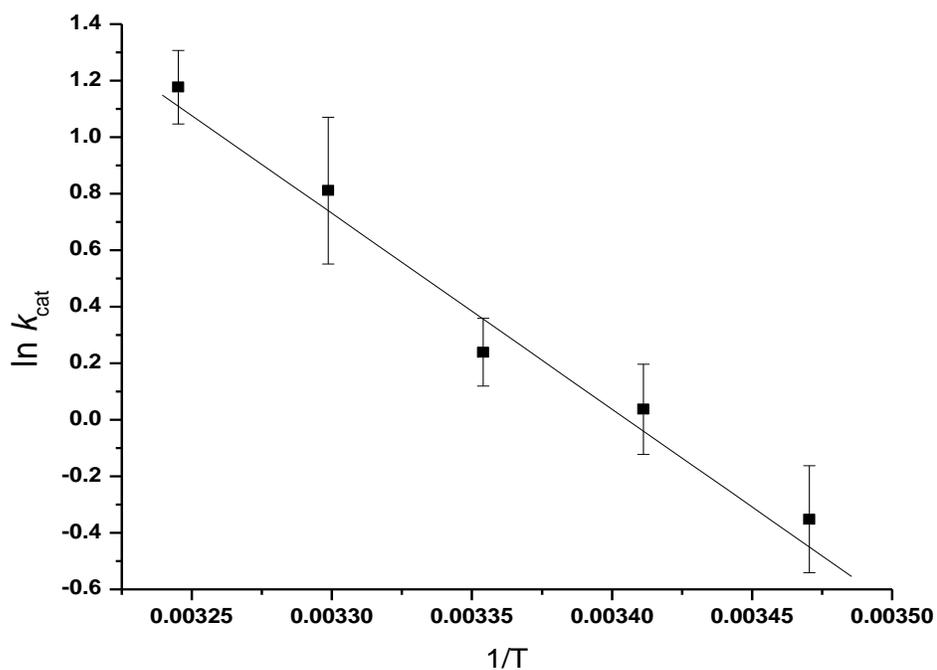


Figura 6.29. Gráfico de Arrhenius para  $k_{cat}$ . La  $E_a = +57.41$  kJ/mol,  $E_a = +13.73$  kcal/mol.

Tabla 6.5. Parámetros termodinámicos a 25°C, calculados a partir del gráfico de Arrhenius para  $k_{cat}$ .

Parámetro	kJ mol <sup>-1</sup>	kcal mol <sup>-1</sup>
$E_a$	+ 57.41	+ 13.73
$\Delta H^\ddagger$	+ 54.94	+ 13.14
$\Delta G^\ddagger$	+ 72.92	+ 17.43
$T\Delta S^\ddagger$	- 17.98	- 4.29

Para obtener los valores de los parámetros termodinámicos que se muestran en la Tabla 6.5, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad \text{donde:}$$

$E_a$  = energía de activación

$T$  = temperatura en K

$R$  = constante de los gases

$\Delta H^\ddagger$  = entalpía de activación

Para calcular la  $\Delta G^\ddagger$ , se despejó de la siguiente ecuación:

$$k = \frac{k_B \cdot T}{h} \cdot e^{\Delta G^\ddagger / RT}$$

$k_B$  = es la constante de Boltzmann

$T$  = temperatura en K

$h$  = en la constante de Planck

y para obtener  $T\Delta S^\ddagger$  se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

#### 6.2.4. Efecto del pH sobre la reacción.

La reacción se realizó en buffer fosfatos 20mM a los pH's 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5, para ver el efecto que tiene el cambio de pH sobre la reacción, en la Figura 6.32 se muestra la gráfica de rapidez vs pH.

A partir de la Figura 6.31b y de los datos de la Tabla 6.6, se sabe que la reacción enzimática tiene un pH óptimo alrededor de 6.5 y que a pH's mayores o menores a 6.5 la constante de especificidad disminuye.

Tabla 6.6 Parámetros fisicoquímicos y cinéticos.

pH	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
5.5	-51.46 $\pm$ 1.50	-12.30 $\pm$ 3.59	7.58 $\pm$ 3.89	0.89 $\pm$ 0.15	(1.46 $\pm$ 0.83) $\times 10^5$
6.5	-39.25 $\pm$ 1.01	-9.38 $\pm$ 2.42	2.45 $\pm$ 1.00	2.17 $\pm$ 0.11	(11.49 $\pm$ 4.71) $\times 10^5$
7.5	-50.44 $\pm$ 7.62	-12.05 $\pm$ 1.82	1.90 $\pm$ 0.68	1.45 $\pm$ 0.15	(7.57 $\pm$ 2.60) $\times 10^5$
8.5	-54.09 $\pm$ 6.88	-12.93 $\pm$ 1.64	1.63 $\pm$ 0.52	1.19 $\pm$ 0.15	(7.83 $\pm$ 2.45) $\times 10^5$

En la Tabla 4 se muestran los valores promedio obtenidos de hacer cuatro veces la reacción y los errores son la desviación estándar excepto para  $k_{cat}/K_M$  donde el error mostrado fue calculado utilizando  $\Delta X = \sqrt{(\Delta A/A)^2 + (\Delta B/B)^2}$ .

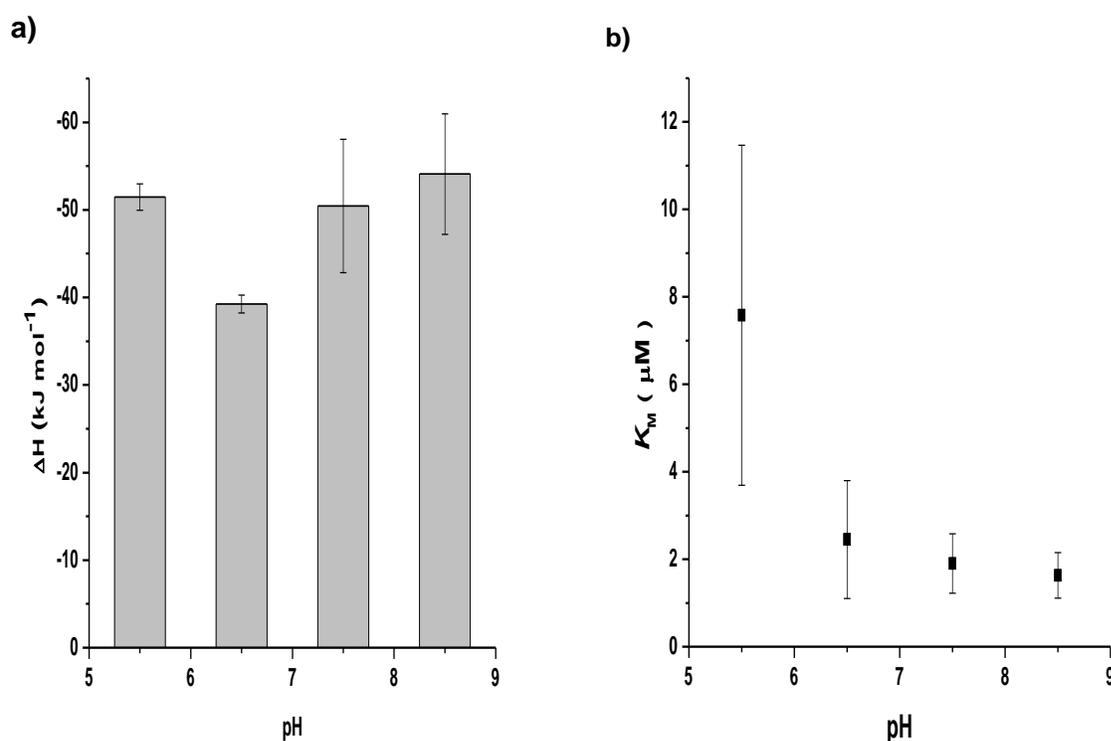


Figura 6.30. a) Gráfica de  $\Delta H$  vs pH. b) Gráfica de  $K_M$  vs pH.

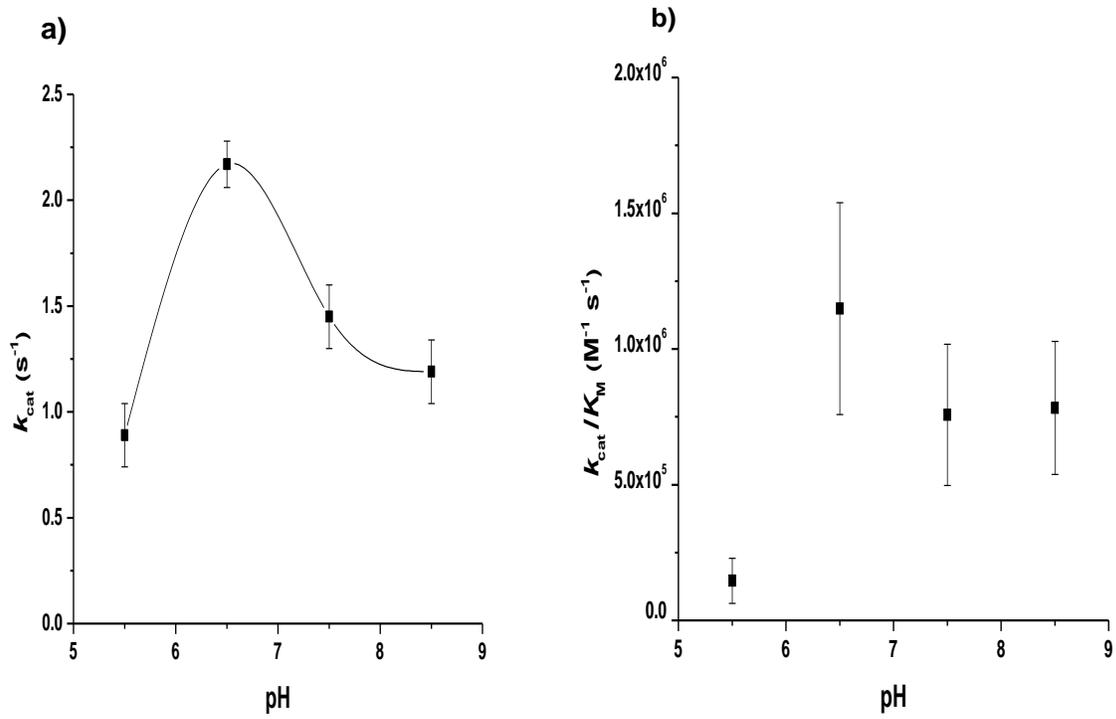


Figura 6.31. a) Gráfica de  $k_{cat}$  vs pH. b) Gráfica de  $k_{cat} / K_M$  vs pH

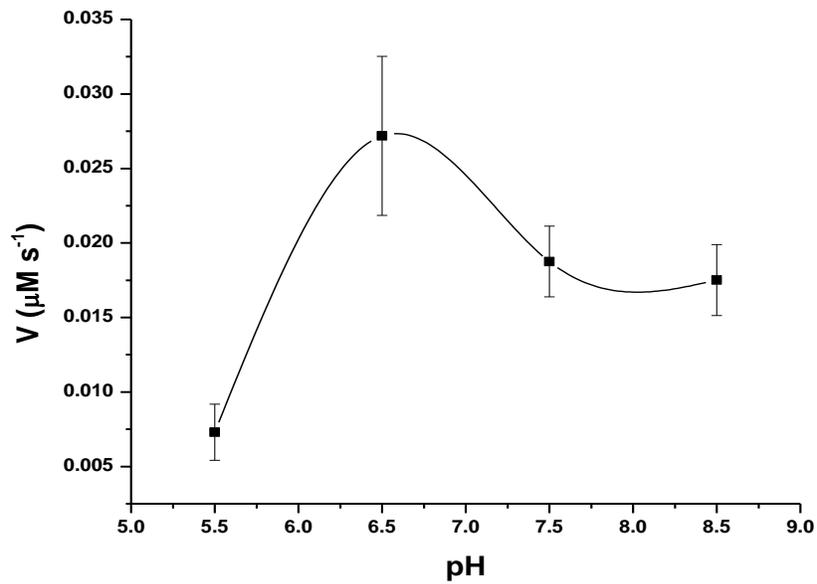


Figura 6.32 Gráfica de rapidez inicial vs pH

La curva de la gráfica de  $k_{cat}/K_M$  vs pH muestra que hay una disminución drástica de la rapidez de reacción de pH 6.5 a 5.5. Por otro lado, a pH mayores de 6.5 se observa también una disminución de la rapidez pero esta se da paulatinamente formando una meseta. El comportamiento descrito en la Figura 6.31b, indicaría que en el mecanismo de reacción están involucrados posiblemente más de dos residuos del sitio activo, los cuales son tanto ácidos como básicos y puede descartarse un efecto debido al sustrato, pues en el rango de estudio el éster de sulfato se encuentra siempre desprotonado.

La disminución de la actividad a pH menores de 6.5 indica que uno o más residuos pierden efectividad al estar protonados. Entre los posibles residuos de la SdsA1 que pudieran estar involucrados, está el ácido glutámico 299 que interacciona con el hidroxilo de la molécula de agua W2 (descrito en la Figura 3.3 en el capítulo 3). A medida que disminuye el pH el grupo carboxilo se protona y pierde efectividad para interaccionar con el protón del hidroxilo del agua. Por el contrario, la disminución de la actividad catalítica a valores de pH mayores a 6.5 con forma de meseta sugiere la participación de dos o más residuos que pierden efectividad al desprotonarse. Algunos candidatos podrían ser la histidina 405 ( $pK_a$  de la histidina libre es 6.04), la cual al perder su carga positiva a  $pH > 6.5$ , dejaría de interactuar favorablemente con el sulfato negativo del SDS (Figura 3.3). Los otros candidatos son las argininas 317 y 312 que al desprotonarse pierden también su carga positiva y su capacidad de interaccionar favorablemente con el sulfato negativo del sustrato (Figura 3.3).

Sin embargo, la interpretación descrita arriba sobre el efecto del pH, fue realizada con pocos puntos experimentales, por lo tanto para tener mayor seguridad del comportamiento de la reacción al variar el pH se tendría que obtener más puntos intermedios.

Esta técnica de calorimetría permite realizar mediciones a diferentes pHs sin problema alguno, utilizando los reactivos naturales y llevándose a cabo toda la reacción bajo las mismas condiciones de pH. Este estudio sería muy difícil realizarlo por ejemplo por espectrofotometría, ya que la metodología realizada para poder estudiar esta reacción por espectrofotometría se basa justamente en el cambio de pH durante la reacción<sup>17</sup>.

### 6.2.5. Determinación de la entalpía intrínseca de la reacción.

La reacción fue hecha en diferentes buffers HEPES, TRIS, PIPES, trietanolamina (TEA) y fosfatos (Figura 6.33) a pH 7.5, con el fin de conocer el valor de entalpía asociado sólo a la ruptura del éster de sulfato (entalpía intrínseca). Como se sabe uno de los productos de la reacción es un protón (Figura 6.9), por lo tanto el calor medido por el calorímetro no sólo involucra el calor asociado a la ruptura del enlace O – S, sino también contribuye el calor debido a la interacción de las moléculas de buffer con el protón (ionización del buffer), el cual varía significativamente entre ellos. Si se conoce el valor de entalpía de ionización del buffer se puede realizar una gráfica de entalpía aparente (entalpías experimentales) vs entalpías de ionización del buffer y obtener de una manera más exacta el valor intrínseco de la reacción.

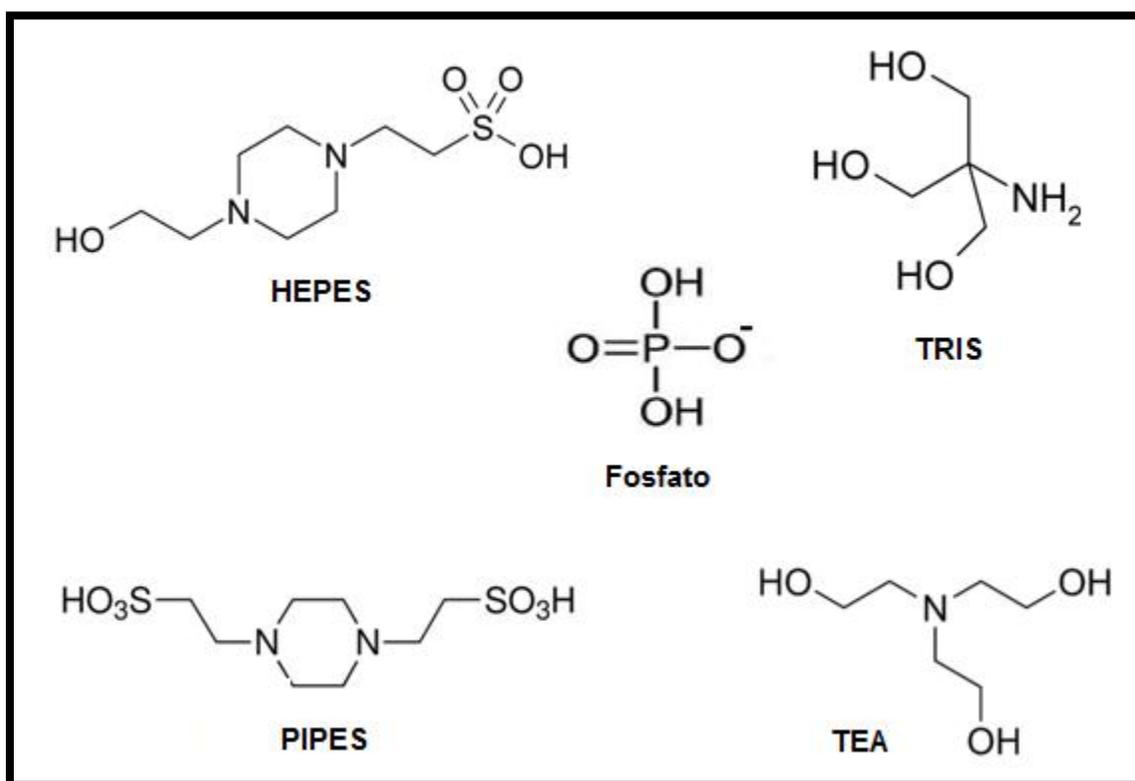
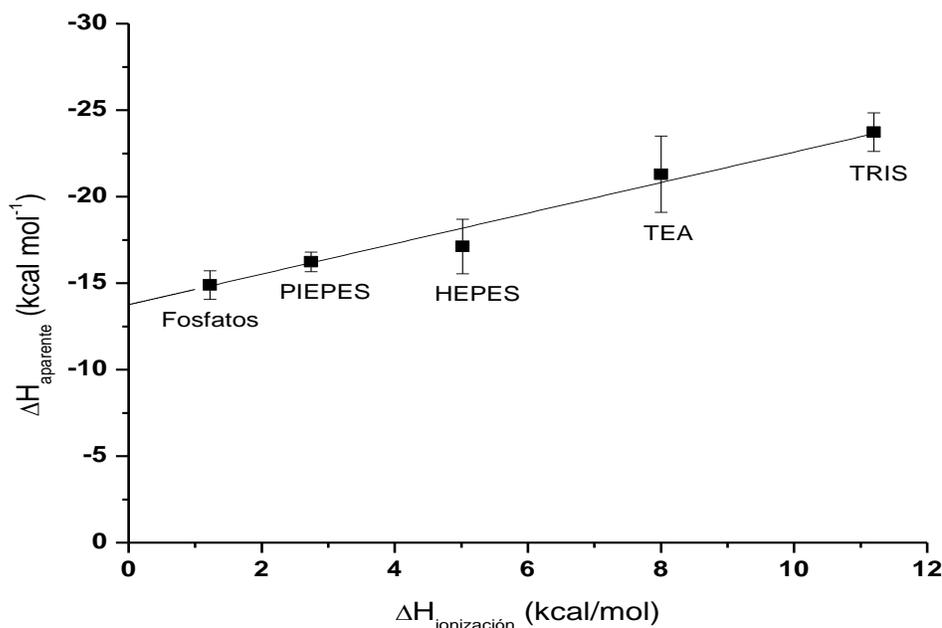


Figura 6.33. Estructuras químicas de los cinco buffers empleados.

En la Figura 6.34 se presenta la gráfica de  $\Delta H_{\text{aparente}}$  vs  $\Delta H_{\text{ionización}}$ , al realizar una regresión lineal a los puntos experimentales se obtiene que la ordenada al origen corresponde a la entalpía intrínseca de la hidrólisis del SDS, siendo en este caso de  $-13.52 \text{ kcal/mol}$  ( $-56.56 \text{ kJ/mol}$ ). El valor de la pendiente indica el número de protones involucrados en la reacción (tomados durante el proceso). En este caso la pendiente es de  $0.91 \approx 1$ , lo cual confirma lo descrito en la reacción<sup>20</sup> (Figura 6.9).



**Figura 6.34.** Gráfica de  $\Delta H_{\text{app}}$  vs  $\Delta H_{\text{ion}}$ ,  $\Delta H_{\text{aparente}} = -13.519 \text{ kcal/mol}$  y  $0.91$  protones.  
 $\Delta H_{\text{ionización}}$  : HEPES  $5.02 \text{ kcal/mol}$ , fosfatos  $1.22 \text{ kcal/mol}$ , PIPES  $2.74 \text{ kcal/mol}$ , TEA  $8.0 \text{ kcal/mol}$  y TRIS  $11.2 \text{ kcal/mol}$ <sup>20</sup>.

Además de poder conocer la entalpía intrínseca de la reacción, estos experimentos también nos permitieron analizar el efecto del buffer sobre la reacción. En la Figura 6.35 se muestran los datos experimentales (P vs t) de las reacciones en los cinco buffers en una sola gráfica con el fin de poder compararlos. Así se puede observar que en los buffers TRIS y TEA las señales registradas por el calorímetro son mayores además de que las reacciones concluyen en un menor tiempo en comparación con el resto de los buffers.

En la Figura 6.36 se presentan los gráficos de rapidez inicial vs concentración de SDS, de la reacción en los cinco buffers y en la Tabla 6.7 se encuentran todos los valores de los parámetros termodinámicos y cinéticos de las reacciones.

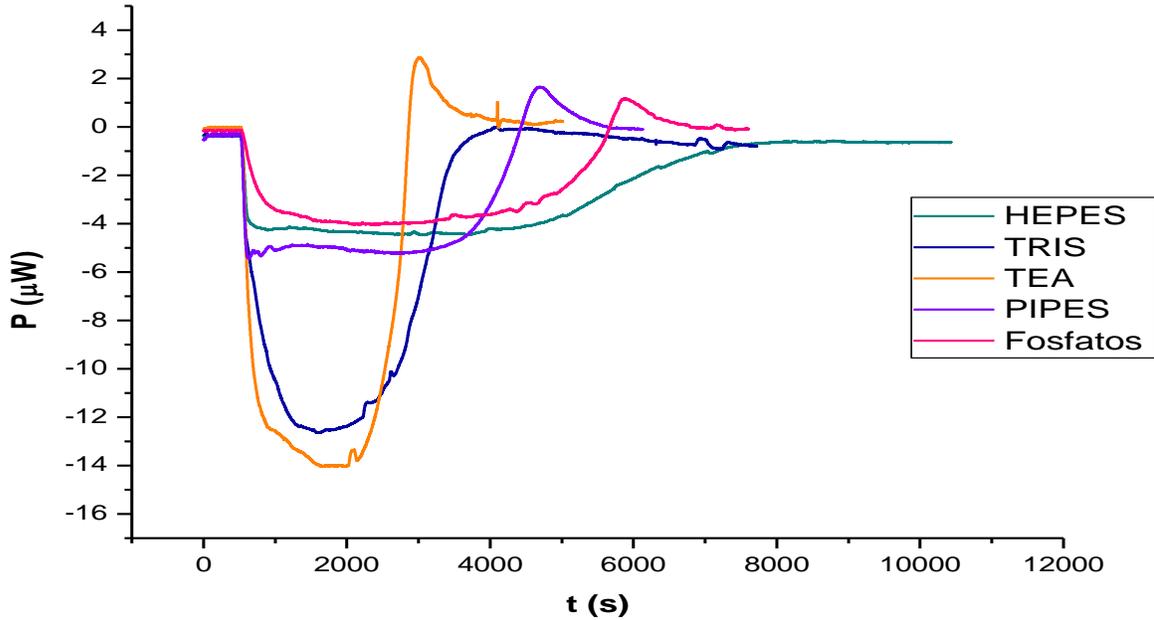


Figura 6.35. Potenciogramas de la reacción en diferentes buffers; [buffer] 20mM, [enzima] 20nM, [SDS] 100μM a pH 7.5.

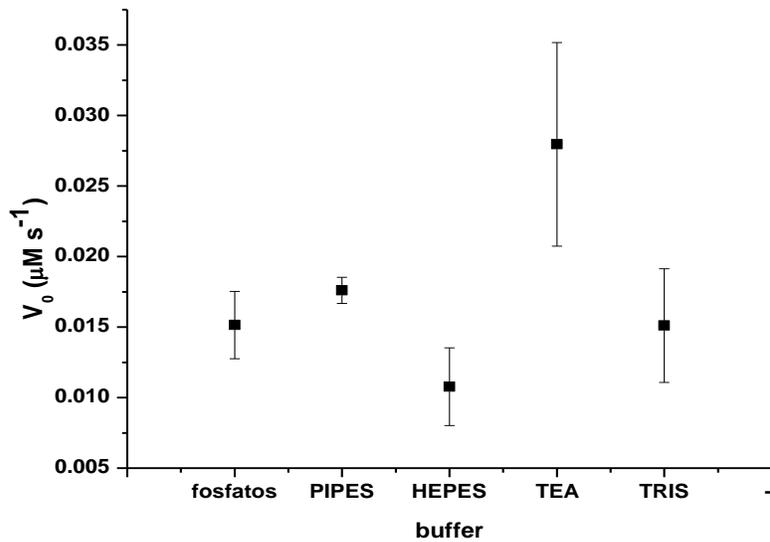
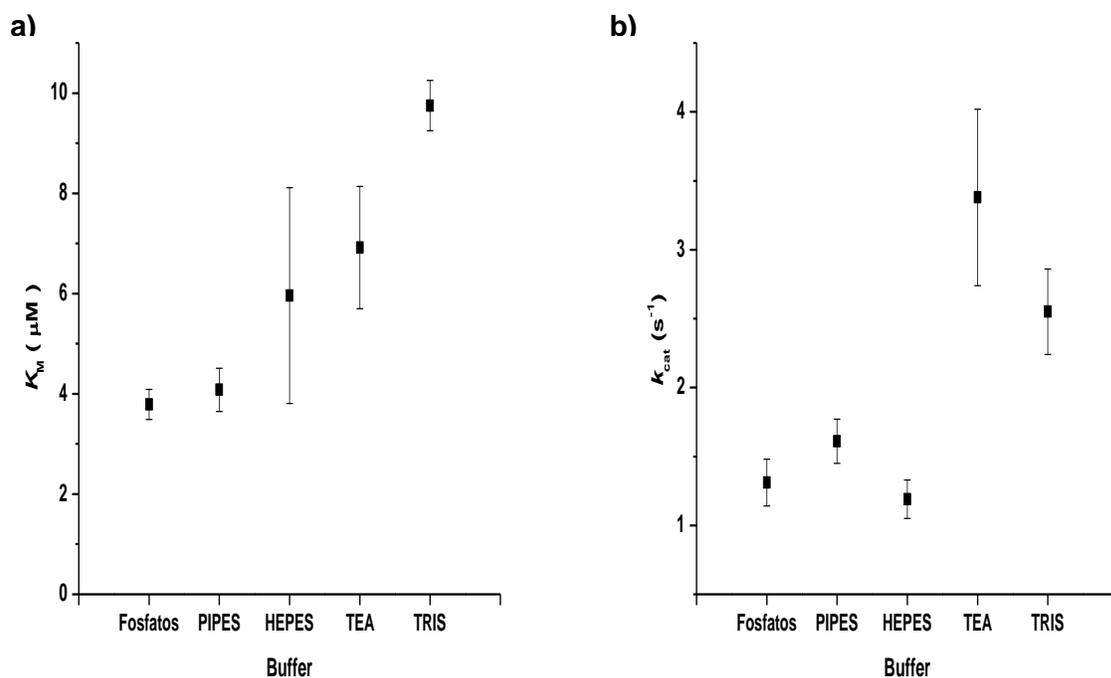


Figura 6.36. Gráfica de rapidez inicial vs buffer

Tabla 6.7. Parámetros fisicoquímicos y cinéticos en distintos buffers a pH 7.5

Buffer	$\Delta H_{app}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{app}$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Fosfatos	-14.89 ± 0.83	-62.30 ± 3.46	3.79 ± 0.30	1.31 ± 0.17	(3.50 ± 0.74) × 10 <sup>5</sup>
PIPES	-16.23 ± 0.57	-67.90 ± 2.37	4.08 ± 0.43	1.61 ± 0.16	(3.96 ± 0.52) × 10 <sup>5</sup>
HEPES	-17.12 ± 1.58	-71.64 ± 6.60	5.96 ± 2.15	1.19 ± 0.14	(2.18 ± 0.70) × 10 <sup>5</sup>
TEA	-21.29 ± 2.20	-89.09 ± 9.21	6.92 ± 1.22	3.38 ± 0.64	(4.98 ± 1.05) × 10 <sup>5</sup>
TRIS	-23.72 ± 1.11	-99.25 ± 4.66	9.75 ± 0.50	2.55 ± 0.31	(2.37 ± 0.75) × 10 <sup>5</sup>

$\Delta H_{app}$  (entalpía aparente). En la tabla se muestran los valores promedio obtenidos de hacer cuatro veces la reacción y los errores son la desviación estándar.



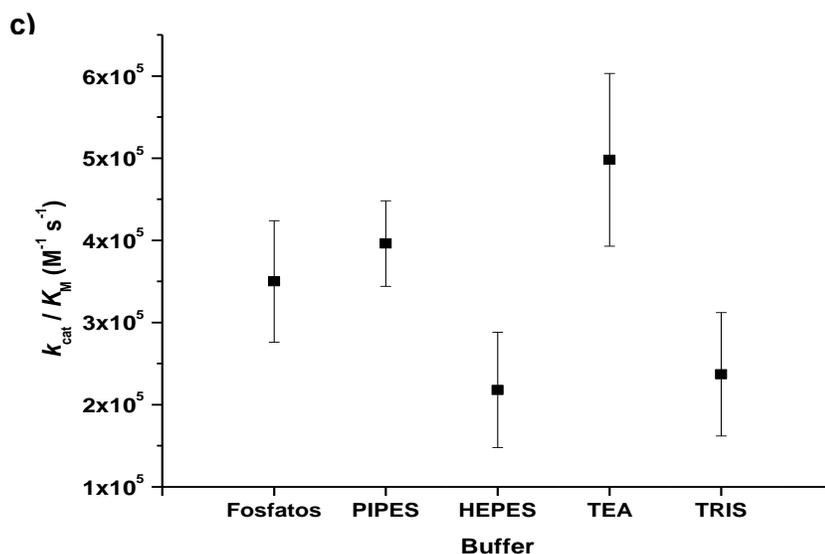


Figura 6.37. a) Gráfica de  $K_M$  vs buffer de reacción. b) Gráfica de  $k_{\text{cat}}$  vs buffer de reacción. c) Gráfica de  $k_{\text{cat}}/K_M$  vs buffer.

Con los resultados presentados en la Tabla 6.7, se observa que los valores de  $|\Delta H_{\text{app}}|$  aumentan de la siguiente forma: fosfatos < PIPES < HEPES < TEA < TRIS, esto es lógico porque de la misma forma aumentan sus valores de  $\Delta H_{\text{ionización}}$  y al ser la  $\Delta H_{\text{app}}$  la suma de la  $\Delta H_{\text{intrínseca}}$  y la  $\Delta H_{\text{ionización}}$ ; los valores deben de ir aumentando.

En cuanto a al  $K_M$ , se observa que los valores van aumentando conforme va aumentando el valor de entalpía de ionización de los buffers, resultando que en TRIS se tiene un valor de  $K_M$  mayor. Además, al observar los valores de  $k_{\text{cat}}$  encontramos que en TRIS es uno de los dos buffers en los que la reacción es más rápida.

La constante catalítica va aumentando de la siguiente forma: HEPES < fosfatos < PIPES < TRIS < TEA. En los buffers de trietanolamina (TEA) y en el de TRIS, se favorece considerablemente la reacción haciendo que esta concluya más rápido. Una hipótesis podría ser que en TRIS y TEA exista una transferencia del sulfato del SDS a los grupos OH de los buffers<sup>33</sup>. Ambos buffers están constituidos por moléculas pequeñas y podrían entrar en el sitio activo, a diferencia de los buffers HEPES Y PIPES cuyas moléculas son más voluminosas.

Aunque también se podría pensar que como en las moléculas de HEPES y PIPES hay grupos sulfonatos, estos grupos pudieran competir débilmente por el sitio activo con el sustrato, pero el hecho de que no haya un cambio en la  $K_M$  desfavorece esta hipótesis. Lo mismo podría pensarse para el buffer de fosfatos, ya que al ser de tamaño muy similar al del sulfato, pero el hecho de que no cambie la  $K_M$  hace pensar que no compite por el sitio activo.

## CAPÍTULO 7

## CONCLUSIONES

- La técnica de microcalorimetría isotérmica (ITC), permite estudiar de manera directa la cinética de reacciones en las cuales hay ausencia de cambios en absorbancia y/o fluorescencia.
- El microcalorímetro TAM, permite realizar mediciones de cinética confiables. Las diferencias entre los valores experimentales y los reportados son muy similares en las diferentes reacciones medidas (difieren en < 10%), lo que sugiere una diferencia sistemática entre nuestro calorímetro y el empleado en otras publicaciones.
- La hidrólisis del dodecil sulfato de sodio catalizada por la enzima SdsA1 de *P. aeruginosa* presenta inhibición por sustrato, y se puede medir su efecto sobre la reacción a concentraciones mayores a 100  $\mu\text{M}$ .
- Concentraciones menores de 100 $\mu\text{M}$  de SDS, permiten estudiar bien la reacción y calcular las constantes cinéticas y termodinámicas a 25°C.
- A temperatura de 25°C, [enzima] = 20 nM, en buffer HEPES a pH 7.5, los valores de las constantes son:  $K_M = 4.71 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}} = 2.52 \text{ s}^{-1}$  y  $k_{\text{cat}}/K_M = 5.34 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $\Delta H_{\text{app}} = -71.64 \pm 6.6 \text{ kJ/mol} = -17.12 \pm 1.58 \text{ kcal/mol}$ .
- En el rango de temperaturas de 15-35°C no se observa desnaturalización de la enzima y se obtiene una  $E_a = + 57.41 \text{ kJ/mol} = + 13.73 \text{ kcal/mol}$ .

- El pH óptimo a la que se puede realizar la reacción es  $\approx 6.5$ . En el rango de pH de 5.5 a 8.5 se puede observar y medir la reacción pues la enzima aún sigue activa.
- La entalpía intrínseca de la reacción es de - 13.52 kcal/mol ó - 56.56 kJ/mol.

**BIBLIOGRAFÍA.**

1. Engel, T., y Reid, P., Química Física, PEARSON ADDISON WESLEY, España 2006, pp. 887- 912.
2. Castellan, G. W., Fisicoquímica, 2ª edición, PEARSON ADDISON WESLEY, México, 2006, pp. 841-852, 882-883.
3. Núñez, I., Enzimología, EDICIONES PIRÁMIDE, España, 2001, pp. 49-51, 101-123.
4. Harris, T.K. and Keshwani, M.M., Measurement of enzyme activity, Methods in Enzymology, 463, (2009), 57-71.
5. Mathews, C.K., Bioquímica, 2ª edición, McGRAW-HILL, España, 1998, pp. 398-433.
6. Segel, I., Biochemical Calculations, 2nd edition, JOHN WILEY & SONS, USA, 1976, pp. 214-229.
7. Voet, D., Voet, J.D., Bioquímica, OMEGA, Barcelona, 1992, pp. 356-366.
8. Stryer, L., Bioquímica, 6ª edición, REVERTÉ, Barcelona, 2008, pp. 217-222.
9. Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., Principios de bioquímica, 2ª edición, OMEGA, Barcelona, 1993, pp. 202- 222.
10. Fersht, A., Estructura y mecanismo de los enzimas, REVERTÉ, España, 1980, pp. 159-165.
11. Atkins, P., Química Física, 8ª edición, MÉDICA PANAMERICANA, Buenos Aires, Argentina, 2008, pp. 38, 46, 47.
12. Wadsö, I., Bio-calorimetry, Elsevier, (1986), 45-50.
13. Zamora, M., Termo I. Un estudio de los sistemas termodinámicos, Universidad de Sevilla, Sevilla, 1998, pp. 149-157.
14. Manual de uso e instalación del calorímetro Thermal Activity Monitor (TAM de Thermometric, Suecia).
15. Wadsö, I., Isothermal microcalorimetry in applied biology, Thermochim. Acta, 394, (2002), 305-311.
16. Bianconi, L., Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions, Biophys. Chem., 126, (2007), 59-64.
17. Hagelueken G., Adams T.M., Wiehlmann L., Widow U., Kolmar H., Tümmeler B., Heinz D., Schubert W.D., The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from Pseudomonas aeruginosa, defines a third class of sulfatases, PNAS, 103, (2006), 7631-7636.

18. Beezer A.E., Hills A.K., O'Neill M.A.A., Morris A.C., Kierstan K.T.E., Deal R.M., Waters L.J., Hadgraft J., Mitchell J.C., Connor J.A., Orchard J.E., Willson R.J., Hofelich T.C., Beaudin J., Wolf G., Baitalow F., Gaisford S., Lane R.A., Buckton G., Phipps M.A., Winneke R.A., Schmitt E.A., Hansen L.D., O'Sullivan D. and Parmar M.K., The imidazole catalysed hydrolysis of triacetin, *Thermochim. Acta*, 380, (2001), 13-17.
19. O'Neill M.A.A., Beezer A.E., Labetoulle C., Nicolaidis L., Mitchell J.C., Orchard J.A., Connor J.A., Kemp R.B. and Olomolaiye D., The base catalysed hydrolysis of methyl paraben, *Thermochim. Acta*, 399, (2003), 63-71.
20. Tood M.J., and Gomez J., Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity?, *Anal. Biochem. Acta*, 296, (2001), 179-187.
21. Gosh, D., Three-Dimensional Structures of Sulfatases, *Methods in Enzymology*, 400, (2005), 273-291.
22. Hanson, S.R., Best, M.D., and Wong, C-H, Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, Synthetic utility, *Angew. Chem.*, 43, (2004), 5736-5763.
23. Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J., Brock, *Biología de los microorganismos*, 10ª edición, PEARSON EDUCACIÓN, Madrid, 2004, pp. 368-371.
24. Wolfenden, R. and Yuan, Y., Monoalkyl sulfates as alkylating agents in water, alkylsulfatase rate enhancements, and "energy-rich" nature of sulfate half-esters, *PNAS*, 104, (2007), 83-86.
25. Urakami K. and Beezer A.E., A method to reduce the equilibration time prior to data capture in ampoule-based isothermal microcalorimetric study, *Thermochim. Acta*, 410, (2004), 109-117.
26. Gill S.C and von Hippel P.H., Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data, *Anal. Biochem.*, 182, (1989), 319-326.
27. Willson R.J., Beezer A.E., Mitchell J.C. and Loh W., Determination of Thermodynamic and Kinetic Parameters from Isothermal Heat Conduction Microcalorimetry: Applications to Long-Term-Reaction Studies, *J. Phys. Chem.*, 99, (1995), 7108-7113.
28. Beezer A.E., An outline of new calculation methods for the determination of both thermodynamic and kinetic parameters from isothermal heat conduction microcalorimetry, *Thermochim. Acta*, 380, (2001), 205-208.
29. Tjahjono, M., Widjaja, E. and Garland, M., Combined online Spectroscopic, Calorimetric, and Chemometric Analysis: Reaction Enthalpy Determinations in Single and Parallel Reactions, *ChemPhysChem.*, 10, (2009), 1274-1283.

30. Cornish-Bowden, A., Fundamentals of enzyme kinetics, PORTLAND PRESS, London, 1995, pp. 118-122.
31. Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S. and Milo, R., The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters, *Biochemistry*, 50, (2011), 4402- 4410.
32. Snider, M.K, Gaunitz, S., Ridgway, C., Short, S.A., and Wolfenden, R., Temperature Effects on the Catalytic Efficiency, Rate Enhancement, and Transition State Affinity of Cytidine Deaminase, and the Thermodynamic Consequences for Catalysis of Removing a Substrate "Anchor"., *Biochemistry*, 39, (2000), 9746-9753.
33. Recksiek, M., Selmer, T., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K., Sulfatases, Trapping of the Sulfated Enzyme Intermediate by Substituting the Active Site Formylglycine, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, (1998), 6096-6103.
34. Engel, T., Reid, P., Hehre, W., Química Física, PEARSON ADISON WESLEY, Madrid, España 2006, pp. 910-912, 921-925.