

Química Analítica Instrumental I

**Métodos cinéticos enzimáticos por espectrofotometría.**

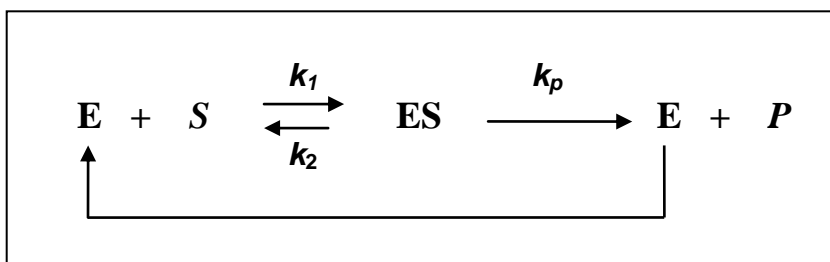
Documento de apoyo.

Dr. Alejandro Baeza. Semestre 2007-I

**1.0 Cinética enzimática en estado estacionario.**

La determinación de analitos producto de una reacción biocatalizada se determina comúnmente por métodos espectrofotométricos. La relación entre el  $pT=A$  y la evolución de la concentración parte de los modelos de cinética enzimática entre los cuales el más común es el modelo del *estado estacionario de Briggs y Haldane*.

En este modelo la enzima, **E**, forma un complejo enzima-sustrato, **ES**, el cual se transforma en producto y regenera al biocatalizador:



La velocidad de cada proceso viene dada por las siguientes ecuaciones:

velocidad de formación del complejo ES:  $v_f = k_1[E][S]$

velocidad de descomposición de ES:  $v_b = k_2[ES] + k_p[ES] = (k_2 + k_p)[ES]$

El modelo propone que la velocidad de formación y de descomposición de ES son iguales de tal manera que, dentro de un intervalo de tiempo dado, la concentración de las especies químicas es aproximadamente constante (estado estacionario de *pseudo-equilibrio*):

$$\begin{aligned}
 v_f &= v_b \\
 k_1[E][S] &= (k_2 + k_p)[ES] \\
 \frac{k_2 + k_p}{k_1} &= \frac{[E][S]}{[ES]} \\
 K_m &= \frac{[E][S]}{[ES]}
 \end{aligned}$$

EL valor de  $K_m$  es equivalente a la  $K_{eq}$  y se conoce como constante de *Michaelis –Menten* y caracteriza a un sistema enzimático dado.

Se relaciona la concentración analítica de la enzima y de la expresión de  $K_m$ :

$$C_E = [E]_T = [E] + [ES]$$

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]}$$

$$C_E = [E]_T = \frac{K_m[ES]}{[S]} + [ES]$$

$$C_E = [E]_T = [ES] \left[ 1 + \frac{K_m}{[S]} \right]$$

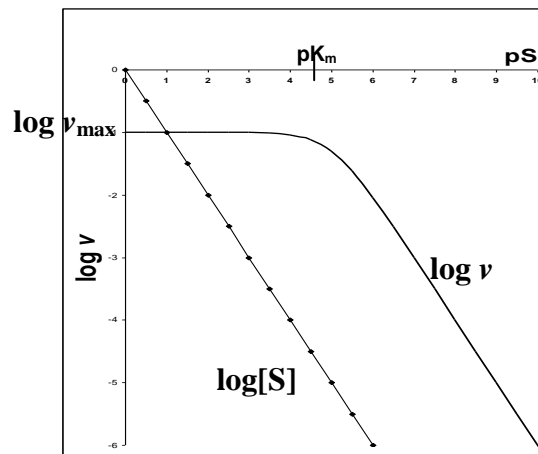
para relacionar con la velocidad de transformación enzimática:

$$v = k_p[ES] = \frac{k_p C_E}{\left[ 1 + \frac{K_m}{[S]} \right]}$$

$$v = \frac{v_{\max}}{\left[ 1 + \frac{K_m}{[S]} \right]} = \frac{v_{\max}}{\alpha_{ES(S)}}$$

$$\log v = \log v_{\max} - \log \alpha_{ES(S)}$$

El comportamiento de la relación anterior se muestra en la siguiente figura:



Si se opera en condiciones tales que  $pS \ll pK_m$  la velocidad enzimática alcanza su máximo valor.

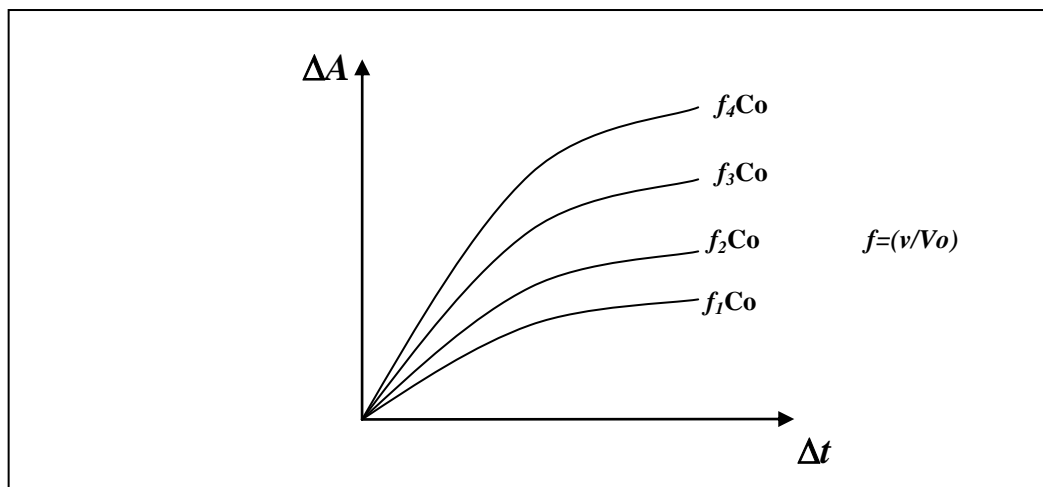
Si el producto de la reacción enzimática absorbe a una longitud de onda dada, la velocidad enzimática esta dada por la variación del  $pT=A$  siguiente:

$$v = \frac{dA}{dt} = \frac{d(\epsilon l C_p)}{dt}$$

La variación de la absorbancia con el tiempo,  $pT=A = f(t)$ , muestra la evolución de las concentraciones desde un tiempo cero hasta un tiempo infinito:

$$dA = \int_{t=0}^{t_\infty} v dt$$

La curva típica del caso anterior para diferentes concentraciones iniciales de sustrato,  $C_S = fC_0$ , se muestra a continuación:



Para determinar  $C_S$  proponen dos métodos de análisis:

**a) método a tiempos cortos,  $t \rightarrow 0$ :**

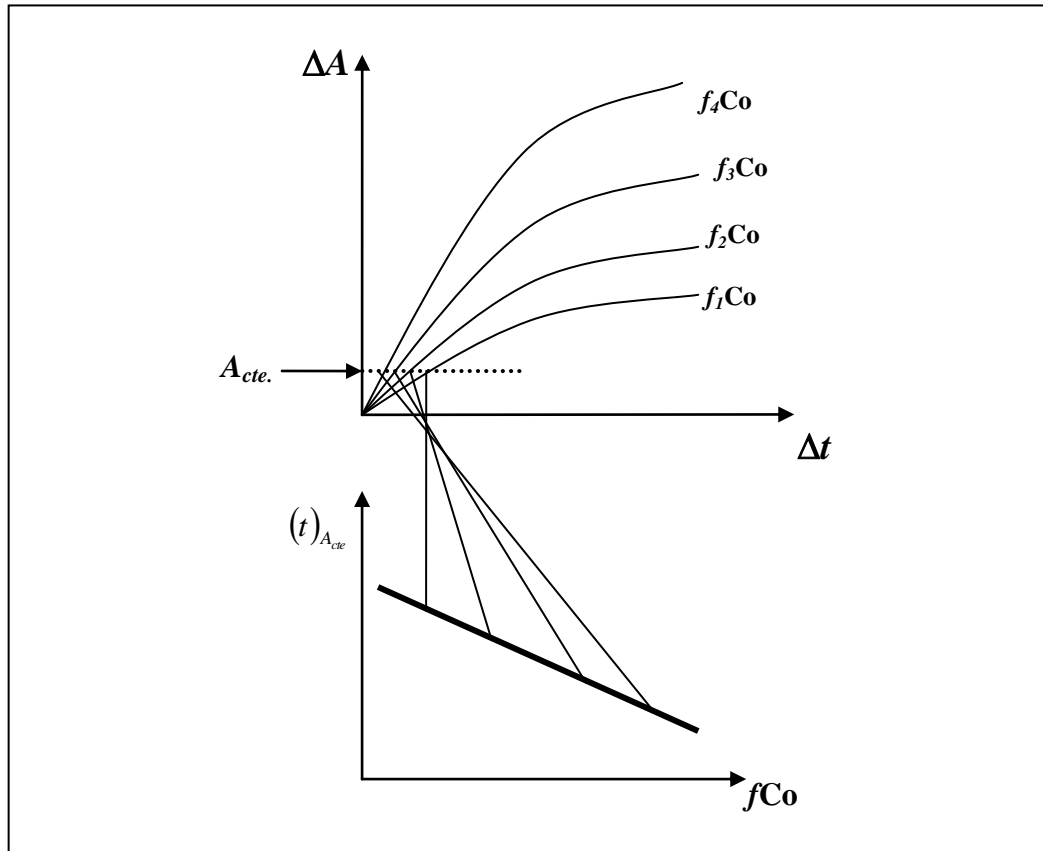
A tiempos muy cortos la variación del  $pT=A = f(t)$  es lineal y puede aprovecharse este comportamiento para determinar la velocidad de transformación de la enzima:

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = m = (\epsilon l) \frac{\Delta C_s}{\Delta t}$$

$$\left( \frac{m}{\epsilon l} \right) = \left( \frac{\Delta C_s}{\Delta t} \right)$$

(mol / L / s)

Por otro lado es posible determinar una curva de calibración si se mide el tiempo en el que se alcanza un valor fijo de  $pT=A_{cte}$ .



**b) método a tiempos largos,  $t \rightarrow \infty$ :**

Si se determina el  $pT=A$  a tiempos muy largos se observa que:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} v = v_{\max}$$

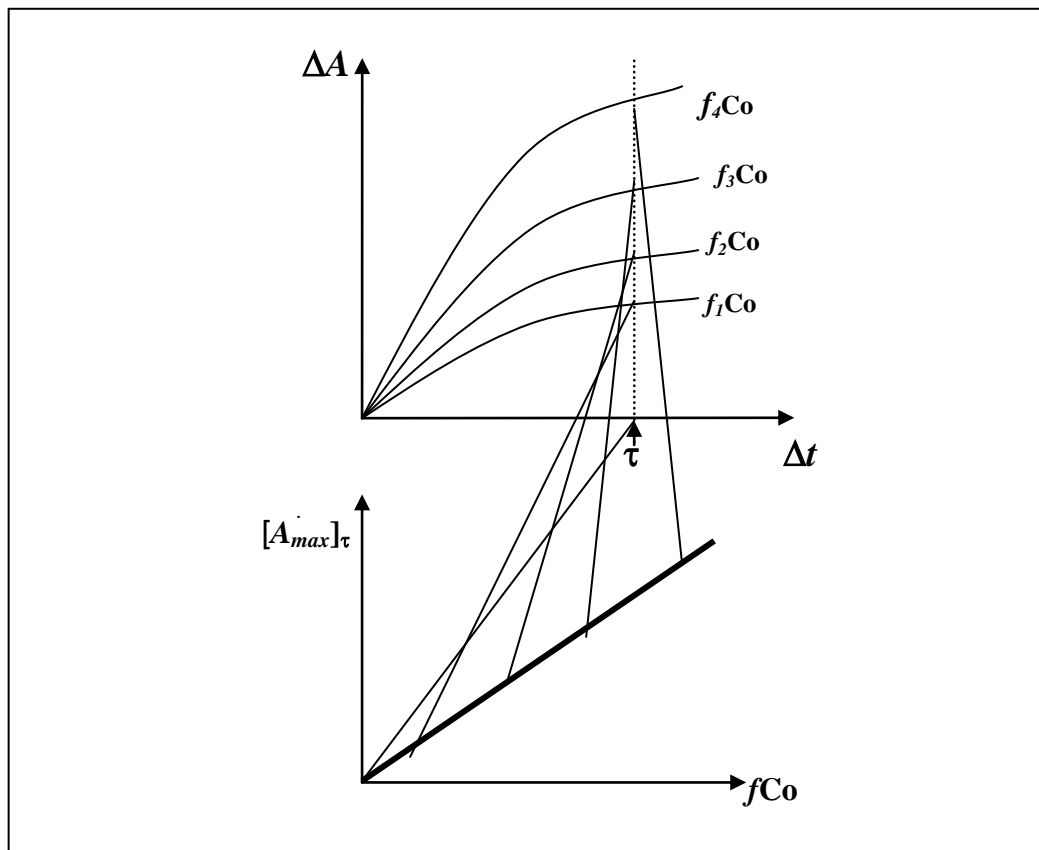
$$t \rightarrow \infty$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} A = A_0$$

$$t \rightarrow \infty$$

$$A_0 = \epsilon l C_p$$

Por lo tanto se mide el valor máximo alcanzado como una función de la concentración de sustrato estándar y en la muestra.



Lecturas recomendadas:

**Jeffrey A. Cohlberg**

“Km as an Apparent Dissociation Constant”

*Journal of Chemical Education* **56**[8](1979)512-517

**M.K. Ciolskz and J. Jordan**

“Comparison of Spectrophotometric and Amperometric Rate Parameters of Enzimaytic Determinations”

*Analytical Chemistry* **65**(1993)164-168

**H.Prado, P. Diaz, J.L. Ortiz and A. Baeza**

“Polarographic Determination of Km’and Vmax of Gluthathione Reductase”

*Current Separations* **20:4**(2004)117-120