

TAREAS

1.- En la reacción de primer orden  $A \rightarrow B$  la concentración de A en el tiempo cero es de 0.5 mM. Al cabo de 2 s es de 0.25 mM. Cuál será al cabo de 5 s?

2.- A) Cuál será la constante de velocidad  $k$  de una reacción de primer orden cuyo tiempo mitad es de 0.3 s? B) Qué intervalo de tiempo deberá transcurrir para que desaparezca el 95% del reactivo? C) Con estos datos podría calcular la constante de velocidad si la reacción fuese de segundo orden?

3.- La enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de hoja de maíz cataliza la carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato a expensas de bicarbonato, produciendo oxaloacetato y Pi. Esta enzima se inactiva cuando se incubaba a temperatura ambiente en presencia de un reactivo específico para histidinas, el dietilpírocarbonato (DEPC). En un experimento de inactivación en el que se usó una concentración de enzima de 0.5  $\mu\text{M}$  y de DEPC de 100  $\mu\text{M}$ , en ausencia y presencia de una concentración fija saturante del sustrato MgPEP, se obtuvieron los siguientes valores de velocidad inicial cuando alícuotas del medio de incubación se ensayaron a concentraciones saturantes de los sustratos.

| Tiempo (s) | Actividad (U/mg proteína) |        |
|------------|---------------------------|--------|
|            | -MgPEP                    | +MgPEP |
| 0          | 25.2                      | 25.3   |
| 30         | 20.1                      | 25.2   |
| 60         | 15.0                      | 25.15  |
| 90         | 12.0                      | 25.10  |
| 180        | 6.5                       | 24.9   |
| 240        | 3.7                       | 24.75  |
| 360        | 1.3                       | 24.6   |

Conociendo que la enzima es estable en ausencia de DEPC, conteste: A) De qué orden es la reacción de inactivación por DEPC? B) Determinar las constantes de velocidad para ambas condiciones. C) Qué conclusiones puede sacar de los resultados?

4. - Una enzima dimérica purificada a homogeneidad es inestable a 42  $^{\circ}\text{C}$ . A esa temperatura tiene una vida media de 6.9 min, independientemente de la concentración de enzima incubada. A) Determinar el orden y la constante de velocidad de la inactivación. Esta enzima también se inactiva a 0  $^{\circ}\text{C}$ , siendo su vida media igualmente independiente de la concentración de enzima. Sin embargo, recupera su actividad cuando la temperatura del medio de incubación se regresa a 20  $^{\circ}\text{C}$ . El tiempo medio del proceso de reactivación resultó ser inversamente proporcional a la concentración de enzima incubada. B) Cuál es el orden de la reacción de reactivación? C) Cómo calcularía la constante de velocidad de este proceso? D) Qué nos dicen estos datos acerca del mecanismo de inactivación y reactivación de la enzima?

5.- La hidrólisis de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa presenta el siguiente curso temporal:

| Tiempo (min) | [Sacarosa] (M) |
|--------------|----------------|
| 0            | 0.5011         |
| 30           | 0.4511         |
| 60           | 0.4038         |
| 90           | 0.3626         |
| 130          | 0.3148         |
| 180          | 0.2674         |

a) Determinar la constante de primer orden y el tiempo medio de la reacción. b) ¿Por qué esta reacción bimolecular sigue una cinética de primer orden? c) ¿Cuánto tiempo llevará el hidrolizar el 99% de la sacarosa presente al inicio? d) ¿Cuánto tiempo llevaría si la cantidad de sacarosa al inicio fuese el doble de la dada en la tabla?

6.- En la reacción  $A \leftrightarrow B$ ,  $k_1=10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-1}= 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ ,  $[A]_0= 10^{-4} \text{ M}$  y  $[B]_0 = 0$ , siendo  $[A]_0$  y  $[B]_0$  las concentraciones iniciales de A y B, respectivamente. (a) Calcular el valor de la  $K_{eq}$  para la reacción anterior. (b) Suponga que se agrega una enzima que aumenta el valor de  $k_1$  por un factor de  $10^9$ , ¿cuál será el valor de  $K_{eq}$ ? ¿cuál será el valor de  $k_{-1}$ ?

7.- Para una enzima que sigue la cinética de Michaelis Menten calcular: a) La concentración de sustrato, expresada como  $[S]/K_m$ , a la que la velocidad inicial es el 10% de la  $V_{max}$ ; b) aquella a la que es el 90% y c) la razón  $[S]_{90}/[S]_{10}$ .

8.- En una reacción enzimática monosustrato se determinaron las siguientes constantes de velocidad:  $k_1=5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{-1}= 2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$  y  $k_2 (k_{cat}) = 4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ . (A) Calcular  $K_s$  y  $K_m$  para esta reacción. (B) La unión del sustrato, ¿alcanza el equilibrio o el estado estacionario? (C) Puede  $k_1$  ser mucho más grande que  $k_{cat}$ ? Razónelo.

9.- Cuando se diseña un ensayo de actividad para una enzima es deseable que la velocidad inicial sea insensible a pequeños errores en la concentración de sustrato. Qué valor debe tener la razón  $[S]/K_m$  en una enzima que sigue cinética michaeliana para que un error del 10% en  $[S]$  se transmita a  $v$  como un error de menos del 1%?

10.- Una enzima central de una ruta metabólica se ha encontrado mutada en un paciente de manera que la  $K_m$  para su único sustrato es el doble de lo normal. Si no hay ningún otro cambio, ¿cuánto debe la concentración de sustrato cambiar para que se mantenga la velocidad del flujo a través de esta ruta metabólica?: a) exactamente la mitad; b) exactamente el doble; c) más del doble; d) menos de la mitad; e) entre la mitad y el doble.

11.- La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando  $\text{NAD}^+$  como coenzima. Se estudió la cinética de la reacción catalizada por la enzima pura en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de  $\text{NAD}^+$  era variable y la de betaína aldehído constante. La masa molecular de esta enzima es de 125 kDa. Los datos de velocidad inicial obtenidos son los siguientes:

| $[\text{NAD}^+]$ ( $\mu\text{M}$ ) | $v$ (U/mg prot) |
|------------------------------------|-----------------|
| 50                                 | 20.1            |
| 100                                | 36.2            |
| 125                                | 42.6            |
| 250                                | 70.0            |
| 500                                | 100.5           |
| 1000                               | 132.4           |
| 2000                               | 151.4           |
| 4000                               | 166.5           |
| 10000                              | 176.2           |

Hacer un análisis gráfico de los datos experimentales usando las transformaciones lineales a la ecuación de Michaelis-Menten: dobles recíprocos, Hanes y Eadie-Hofstee. B) Determinar las constantes cinéticas  $k_{\text{cat}}$  y  $k_{\text{cat}}/K_m$ .

12.- En ensayos de actividad realizados con 0.1 ml de una preparación enzimática en un volumen final de 3 ml de medio de reacción se obtuvieron las siguientes velocidades iniciales a las concentraciones de sustrato indicadas:

| $[\text{S}]$ (M)     | $v_0$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) |
|----------------------|--------------------------------------|
| $5.0 \times 10^{-2}$ | 0.250                                |
| $5.0 \times 10^{-3}$ | 0.250                                |
| $5.0 \times 10^{-4}$ | 0.250                                |
| $1.0 \times 10^{-4}$ | 0.225                                |
| $5.0 \times 10^{-5}$ | 0.200                                |
| $1.0 \times 10^{-5}$ | 0.115                                |
| $5.0 \times 10^{-6}$ | 0.071                                |
| $5.0 \times 10^{-7}$ | 0.0096                               |

A) Demuestre si esta reacción sigue o no la cinética de Michaelis-Menten por análisis gráfico y, si procede, determine  $K_m$  para el sustrato y  $V_{\text{max}}$  y  $V_{\text{max}}/K_m$  para esta concentración de enzima. B) ¿Cuáles son las velocidades iniciales a  $[\text{S}] = 1.0 \times 10^{-6}$  M y a  $[\text{S}] = 1.0 \times 10^{-3}$  M? C) Calcule la cantidad total de producto formado durante los primeros 5 min a  $[\text{S}] = 2.0 \times 10^{-3}$  M y a  $[\text{S}] = 2.0 \times 10^{-6}$  M. D) Suponga que la concentración de enzima en cada mezcla de reacción se aumenta por un factor de 4; ¿cuál sería el valor de  $K_m$  y de  $V_{\text{max}}$ ? ¿cual sería, bajo estas nuevas condiciones, el valor inicial de  $v$  a  $[\text{S}] = 5.0 \times 10^{-6}$  M? E) Graficar los datos experimentales como  $v_0$  frente a  $[\text{S}]$  haciendo que el eje de abscisas tenga la escala en forma logarítmica en base 10. ¿Qué tipo de curva se obtiene?

13.- Quimotripsina puede hidrolizar además de enlaces peptídicos, enlaces amidos y ésteres. Las constantes cinéticas de la reacción catalizada por quimotripsina con diferentes ésteres derivados de aminoácidos en los que el grupo  $\alpha$ -amino se ha acilado se incluyen en la siguiente tabla:

| Sustrato                          | $K_m$ (M)            | $k_{cat}$ ( $s^{-1}$ ) |
|-----------------------------------|----------------------|------------------------|
| Ester etílico de N-acetil glicina | $4.4 \times 10^{-1}$ | $5.1 \times 10^{-2}$   |
| Ester etílico de N-acetil valina  | $8.8 \times 10^{-2}$ | $1.7 \times 10^{-1}$   |
| Ester etílico de Nacetil tirosina | $6.6 \times 10^{-3}$ | $1.9 \times 10^2$      |

A) Determinar cuál es el orden de preferencia con el que quimotripsina catalizará la hidrólisis de estos sustratos si los tres se encuentran presentes a la misma concentración. B) ¿Cuál será la razón entre las velocidades de producción de N-acetilvalina y N-acetiltirosina si en el medio de reacción se encuentran presentes estos dos sustratos a la misma concentración? C) ¿Qué conclusión puede obtener acerca del sitio activo de esta enzima a partir del análisis de estos datos?

14.- La enzima acetilcolinesterasa tiene una  $K_m$  para acetilcolina de  $9.5 \times 10^{-5}$  M y una  $k_{cat}$  de  $1.4 \times 10^4 s^{-1}$ , mientras que la enzima catalasa tiene una  $K_m$  para el  $H_2O_2$  de  $2.5 \times 10^{-2}$  M y una  $k_{cat}$  de  $1.0 \times 10^7 s^{-1}$ . ¿Cuál de las dos enzimas está más próxima a la perfección catalítica?

15.- Para el mecanismo más simple de reacción catalizada por una enzima que sigue la cinética de Michaelis-Menten,  $E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$ , (a) ¿cuál es el valor máximo que puede alcanzar  $k_{cat}/K_m$  expresado en términos de constantes de velocidad? (b) ¿Bajo qué condiciones se alcanzará este valor máximo? (c) Razone si este valor puede sobrepasar al valor máximo que podría alcanzar la constante de velocidad de una reacción de segundo orden no catalizada. (d) ¿Cuál es el valor mínimo, igualmente expresado en términos de constantes de velocidad, y bajo que condiciones se alcanzará? (e) Para un valor de  $k_1$  igual en los dos casos, ¿qué condición, equilibrio rápido o estado estacionario, permitirá una mayor eficiencia catalítica? (f) Si la reacción fuese reversible y tuviera una constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) de 0.1 ¿podría la enzima que cataliza esta reacción alcanzar la perfección catalítica en el sentido de formación de P?

- 16.- En un experimento de saturación de una enzima por su sustrato se obtuvieron los siguientes resultados de velocidad inicial:

| [S]<br>(mM) | $v_o$<br>(U/mg prot) |
|-------------|----------------------|
| 0.010       | 10.2                 |
| 0.025       | 21.5                 |
| 0.050       | 31.8                 |
| 0.075       | 37.8                 |
| 0.100       | 42.3                 |
| 0.150       | 46.6                 |
| 0.250       | 50.7                 |
| 0.500       | 51.8                 |
| 1.0         | 48.1                 |
| 1.5         | 43.6                 |
| 3.0         | 33.9                 |
| 5.0         | 25.8                 |

- (A) Determinar por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima. B) Qué particularidad muestra el mecanismo cinético de esta enzima?

- 17.- La caracterización cinética de una actividad enzimática en una preparación parcialmente pura proporcionó los siguientes datos de velocidad inicial:

| [S]<br>(mM) | $v_o$<br>(U/mg prot) |
|-------------|----------------------|
| 0.2         | 1.4                  |
| 0.4         | 2.06                 |
| 1.2         | 3.02                 |
| 2.0         | 3.4                  |
| 2.5         | 3.6                  |
| 3.0         | 3.8                  |
| 4.0         | 4.15                 |
| 5.0         | 4.4                  |
| 7.5         | 4.9                  |
| 10.0        | 5.3                  |
| 15          | 5.8                  |
| 20          | 6.2                  |

- A) Determine por regresión no lineal las constantes cinéticas de la enzima. B) ¿Podría calcular estas constantes por regresión lineal? C) ¿Qué conclusiones preliminares podría derivar del análisis de los resultados?

- 18.- La  $K_{eq}$  para la reacción  $S \leftrightarrow P$  es 5. Suponga que tenemos una mezcla de  $[S] = 2 \times 10^{-4} M$  y  $[P] = 3 \times 10^{-4} M$ . A) ¿En qué dirección procederá la reacción si se le agrega a esta mezcla una enzima capaz de catalizar esta reacción? B) Si las constantes cinéticas de esta enzima son:  $K_s = 3 \times 10^{-5} M$ ,  $V_{max\ ida} = 2 U/mg\ proteína$  y  $V_{max\ regreso} = 4 U/mg\ proteína$ , ¿a qué velocidad inicial comenzará la reacción hacia el equilibrio?

19.- La reacción  $A \leftrightarrow P$  posee una constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) de 0.1. Para la reacción catalizada por una enzima se han determinado las siguientes constantes cinéticas:  $K_{cat\ ida} = 3 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{cat\ regreso} = 4.6 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{mA} = 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ ,  $K_{mP} = 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ . (A) ¿Son compatibles estos parámetros cinéticos con la termodinámica de la reacción? (B) ¿En cuál de las dos direcciones pueden alcanzarse velocidades iniciales de reacción más altas? (C) ¿Cuál será la velocidad neta de la reacción cuando  $[S] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $[P] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ? (D) ¿Cuál es la razón  $v_{ida}/v_{regreso}$  si  $[S] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$  y  $[P] = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ? (E) ¿Cuál será la velocidad neta de la reacción a estas concentraciones de sustrato y producto, si la concentración de enzima es  $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ ? F) Si usted pudiese cambiar los parámetros cinéticos de la enzima de manera que maximizara la velocidad neta en el sentido de producción de P manteniendo las mismas concentraciones de A y de P que en el inciso D, ¿qué cambios haría? Discuta sus respuestas.

20.- En la siguiente tabla se incluyen las velocidades iniciales de una reacción catalizada por una enzima que sigue cinética de Michaelis Menten, medidas en ausencia (1), y en la presencia de dos diferentes inhibidores totales (1 y 2), ambos a una concentración de 10 mM. Se usó la misma concentración de enzima en todas las determinaciones.

| [S] (mM) | $v_o$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ ) |             |             |
|----------|--------------------------------|-------------|-------------|
|          | Control                        | Inhibidor 1 | Inhibidor 2 |
| 1        | 2.5                            | 1.17        | 0.77        |
| 2        | 4.0                            | 2.10        | 1.25        |
| 5        | 6.3                            | 4.00        | 2.00        |
| 10       | 7.6                            | 5.70        | 2.45        |
| 20       | 8.5                            | 7.20        | 2.68        |

(A) Determinar las constantes cinéticas de la enzima en ausencia y presencia de los inhibidores. (B) Para cada inhibidor determinar el tipo de inhibición y  $K_i$ . (C) ¿Qué información adicional requeriría para calcular el número de recambio de la enzima? (D) Si  $[S]$  es 5 mM, ¿qué fracción de las moléculas de enzima estarán unidas al sustrato en forma productiva en ausencia de inhibidor, o en presencia de 10 mM del inhibidor tipo 1 o tipo 2? E) ¿Y en forma no productiva? F) ¿Podría calcular la concentración relativa de todas las especies de la enzima en ausencia y en presencia de los inhibidores?

**21.-** La enzima betaína aldehído deshidrogenasa cataliza la oxidación de betaína aldehído a glicina betaína usando  $\text{NAD}^+$  como coenzima. Con el fin de conocer el mecanismo cinético que sigue esta enzima se estudió la inhibición de la reacción por el producto NADH, en ensayos de velocidad inicial en los que la concentración de  $\text{NAD}^+$  era variable y la de betaína aldehído constante. Los datos de velocidad inicial obtenidos se incluyen en la siguiente tabla:

| [NAD <sup>+</sup> ]<br>(μM) | $v_0$ (mU/mg prot.) |        |        |        |        |
|-----------------------------|---------------------|--------|--------|--------|--------|
|                             | [NADH] (μM) 0       | 100    | 250    | 350    | 500    |
| 125                         | 50.46               | 42.59  | 36.65  | 30.65  | 28.62  |
| 250                         | 81.44               | 70.03  | 59.71  | 51.62  | 47.82  |
| 500                         | 117.08              | 100.52 | 87.28  | 76.69  | 70.59  |
| 1000                        | 142.3               | 132.39 | 110.45 | 100.26 | 90.45  |
| 2000                        | 166.43              | 151.36 | 131.73 | 120.20 | 107.41 |

A) Determinar por medio de regresión no lineal el tipo de inhibición. B) Mostrar los resultados en forma de gráficas de dobles recíprocos. C) Calcular la(s) constante(s) de inhibición del NADH por medio de regráficos de interceptos y/o pendientes de estos últimos. D) Graficar los datos  $1/v$  versus la concentración de inhibidor (gráficas de Dixon) y calcular por este método gráfico la(s) constante(s) de inhibición. E) Calcular la  $I_{50}$  para NADH a cada una de las concentraciones de  $\text{NAD}^+$ .

**22.-** A) Deducir la ecuación que relaciona el valor de  $I_{50}$  de un inhibidor competitivo con la concentración de sustrato y la  $K_s$  para ese sustrato. B) Para el mismo tipo de inhibidor, deducir la siguiente ecuación:  $v_i = v_0 I_{50} / (I_{50} + [I])$ , en donde  $v_i$  es la velocidad obtenida en presencia del inhibidor,  $v_0$  es la velocidad en ausencia de inhibidor,  $I_{50}$  es la concentración de inhibidor que reduce la velocidad a la mitad de la velocidad no inhibida e  $[I]$  es la concentración de inhibidor.

23.- Se estudió la sensibilidad al inhibidor malato de las formas fosforilada (PEPC-P, forma de luz) y desfosforilada (PEPC-OH, forma de oscuridad) de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) de hoja de maíz a una concentración fija, subsaturante, de sus sustratos. Se obtuvieron los datos de velocidad inicial incluidos en la siguiente tabla:

| [I] (mM) | $v$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot.}$ ) |         |
|----------|--|---------|
|          | PEPC-P   | PEPC-OH |
| 0        | 56.3   | 44.5    |
| 0.2      | 52.0   | 22.7    |
| 0.4      | 50.1   | 14.7    |
| 0.6      | 47.8   | 9.6     |
| 0.8      | 44.7   | 7.7     |
| 1.0      | 42.3   | 6.3     |
| 1.5      | 37.8   | 4.6     |
| 2        | 35.8   | 3.5     |
| 3        | 28.1   | 2.2     |

Usando la ecuación dada en el ejercicio anterior, que relaciona la velocidad de la reacción en presencia del inhibidor con la concentración de inhibidor, calcular los valores de  $I_{50}$  para las dos formas de la enzima y discutir los resultados.

24.- Deducir las ecuaciones de distribución de las especies de la enzima en una reacción monosustrato en equilibrio rápido y en presencia de un inhibidor mixto.

25.- (A) Asumiendo que se sigue el supuesto de equilibrio rápido, deduzca la ecuación de velocidad inicial para una reacción monosustrato en presencia de un activador no esencial que puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato. (B) ¿Cuál sería el análisis gráfico que debería hacerse en este caso para el diagnóstico del mecanismo de activación?

26.- En la oxidación de la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) dependiente de NADP<sup>+</sup> se obtuvieron los siguientes valores de velocidad inicial. Estime por regresión no lineal los parámetros cinéticos de esta enzima y su posible mecanismo cinético

| [NADP <sup>+</sup> ]<br>( $\mu\text{M}$ ) | Actividad específica<br>(U/mg proteína) | [BA]<br>( $\mu\text{M}$ ) |
|---|---|---------------------------|
| 10  | 4,76                                    | 100                       |
| 20  | 12,39                                   | 100                       |
| 30  | 16,61                                   | 100                       |
| 40  | 19,29                                   | 100                       |
| 60  | 23,3                                    | 100                       |



|     |        |      |
|-----|--------|------|
| 80  | 28,34  | 100  |
| 100 | 30,42  | 100  |
| 120 | 30,81  | 100  |
| 150 | 32,62  | 100  |
| 200 | 33,46  | 100  |
| 10  | 10,64  | 200  |
| 20  | 21,40  | 200  |
| 30  | 26,57  | 200  |
| 40  | 34,33  | 200  |
| 60  | 39,03  | 200  |
| 80  | 42,68  | 200  |
| 100 | 49,41  | 200  |
| 120 | 49,83  | 200  |
| 150 | 51,84  | 200  |
| 200 | 55,96  | 200  |
| 10  | 13,56  | 400  |
| 20  | 25,09  | 400  |
| 30  | 40,27  | 400  |
| 40  | 48,28  | 400  |
| 60  | 53,90  | 400  |
| 80  | 66,971 | 400  |
| 100 | 72,73  | 400  |
| 120 | 75,27  | 400  |
| 150 | 81,42  | 400  |
| 200 | 82,85  | 400  |
| 10  | 18,49  | 600  |
| 20  | 41,75  | 600  |
| 30  | 53,83  | 600  |
| 40  | 58,37  | 600  |
| 60  | 73,46  | 600  |
| 80  | 81,86  | 600  |
| 100 | 92,89  | 600  |
| 120 | 96,85  | 600  |
| 150 | 100,33 | 600  |
| 200 | 104,55 | 600  |
| 10  | 35,47  | 1000 |
| 20  | 49,36  | 1000 |
| 30  | 62,08  | 1000 |
| 40  | 65,01  | 1000 |
| 60  | 84,58  | 1000 |
| 80  | 96,59  | 1000 |
| 100 | 104,88 | 1000 |
| 120 | 116,94 | 1000 |
| 150 | 122,65 | 1000 |
| 200 | 125,99 | 1000 |