



CURSO DE BIOQUÍMICA APLICADA

GENERALIDADES DE MÉTODOS ENZIMÁTICOS

Escuela de Tecnología Médica
Universidad de Chile
Primera Versión
2007

Propiedades de Enzimas en Solución Acuosa

Conocer las características de los enzimas como reactivos analíticos y la cinética de las reacciones enzimáticas.

Tener una visión general de los diferentes métodos enzimáticos de análisis que utilizan enzimas en disolución.

Reconocer los problemas que se pueden resolver mediante métodos enzimáticos e Interpretar los resultados obtenidos en los mismos.

Uso de los ENZIMAS en diagnóstico clínico:

1. Unidades enzimáticas: UI (SI).

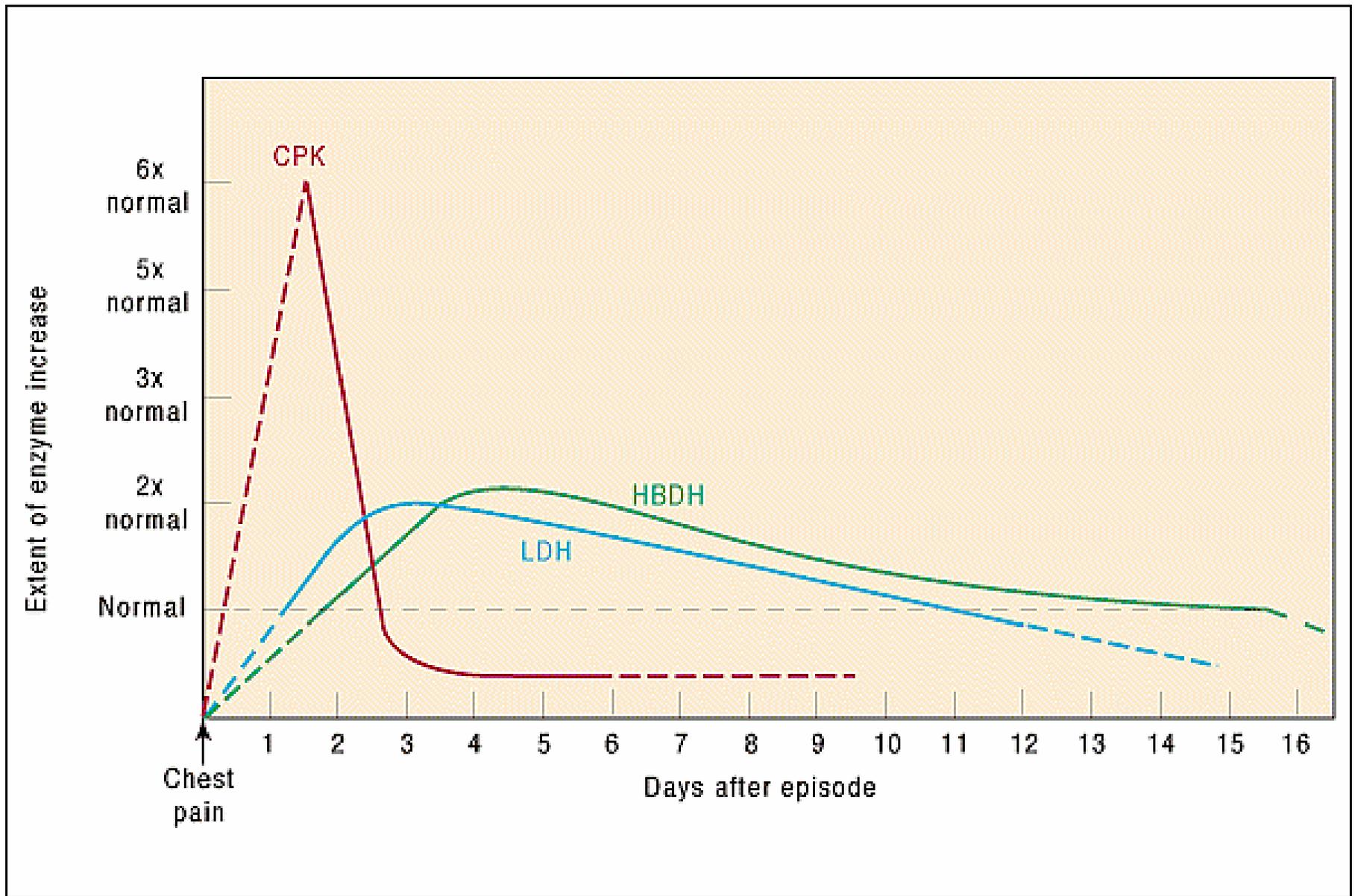
2. Muestras biológicas.

3. Importancia clínica. Alteración de la actividad enzimática asociada a un proceso patológico:

↑ sangre

- Daño tisular: » Necrosis del tejido.
» Incremento de la permeabilidad.
- Inducción enzimática.

↓ sangre: deficiencia del tejido

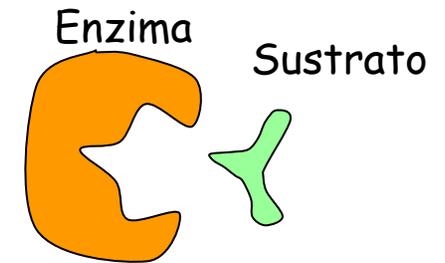


CPK – creatina Quinasa

LDH – Lactato deshidrogenasa

HBDH - α -hidroxi-butírico deshidrogenasa

ENZIMA



Catalizador de origen biológico y naturaleza proteica, de alto peso molecular y conformación tridimensional característica.

Estructura y conformación:

Contiene un centro activo, generalmente situado en un entorno apolar. La actividad catalítica requiere que dicho centro adopte una conformación determinada, mantenida por el resto de la molécula proteica.

Reactividad:

Interacción de complementariedad 'LLAVE- CERRADURA'. La actividad catalítica requiere en general la presencia de cofactores para llevar a cabo la conversión del sustrato.



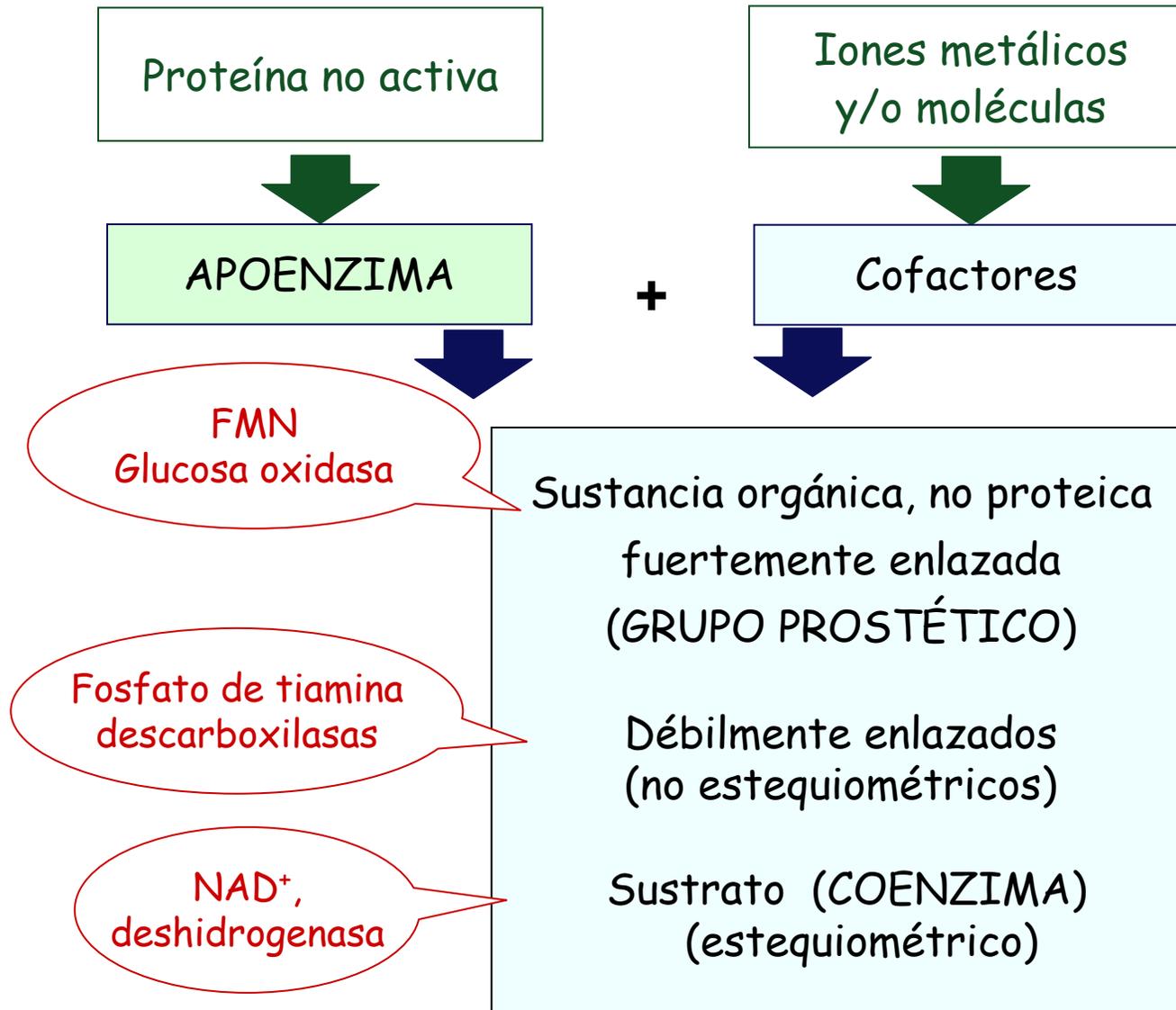


table 8–1

Some Inorganic Elements That Serve as Cofactors for Enzymes

Cu^{2+}	Cytochrome oxidase
Fe^{2+} or Fe^{3+}	Cytochrome oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Pyruvate kinase
Mg^{2+}	Hexokinase, glucose 6-phosphatase, pyruvate kinase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotide reductase
Mo	Dinitrogenase
Ni^{2+}	Urease
Se	Glutathione peroxidase
Zn^{2+}	Carbonic anhydrase, alcohol dehydrogenase, carboxypeptidases A and B

table 8-2

Some Coenzymes That Serve as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups*

Coenzyme	Examples of chemical groups transferred	Dietary precursor in mammals
Biocytin	CO ₂	Biotin
Coenzyme A	Acyl groups	Pantothenic acid and other compounds
5'-Deoxyadenosylcobalamin (coenzyme B ₁₂)	H atoms and alkyl groups	Vitamin B ₁₂
Flavin adenine dinucleotide	Electrons	Riboflavin (vitamin B ₂)
Lipoate	Electrons and acyl groups	Not required in diet
Nicotinamide adenine dinucleotide	Hydride ion (: H ⁻)	Nicotinic acid (niacin)
Pyridoxal phosphate	Amino groups	Pyridoxine (vitamin B ₆)
Tetrahydrofolate	One-carbon groups	Folate
Thiamine pyrophosphate	Aldehydes	Thiamine (vitamin B ₁)

*The structure and mode of action of these coenzymes are described in Part III of this book.

Características de las enzimas

- ✓ Elevada especificidad
 - ✓ Respecto del sustrato convertido
 - ✓ Respecto de la reacción catalizada
- ✓ Elevada eficacia catalítica
- ✓ Actividad a bajas concentraciones de enzima y de sustrato
- ✓ Actividad "in vitro"

Reactivos Analíticos



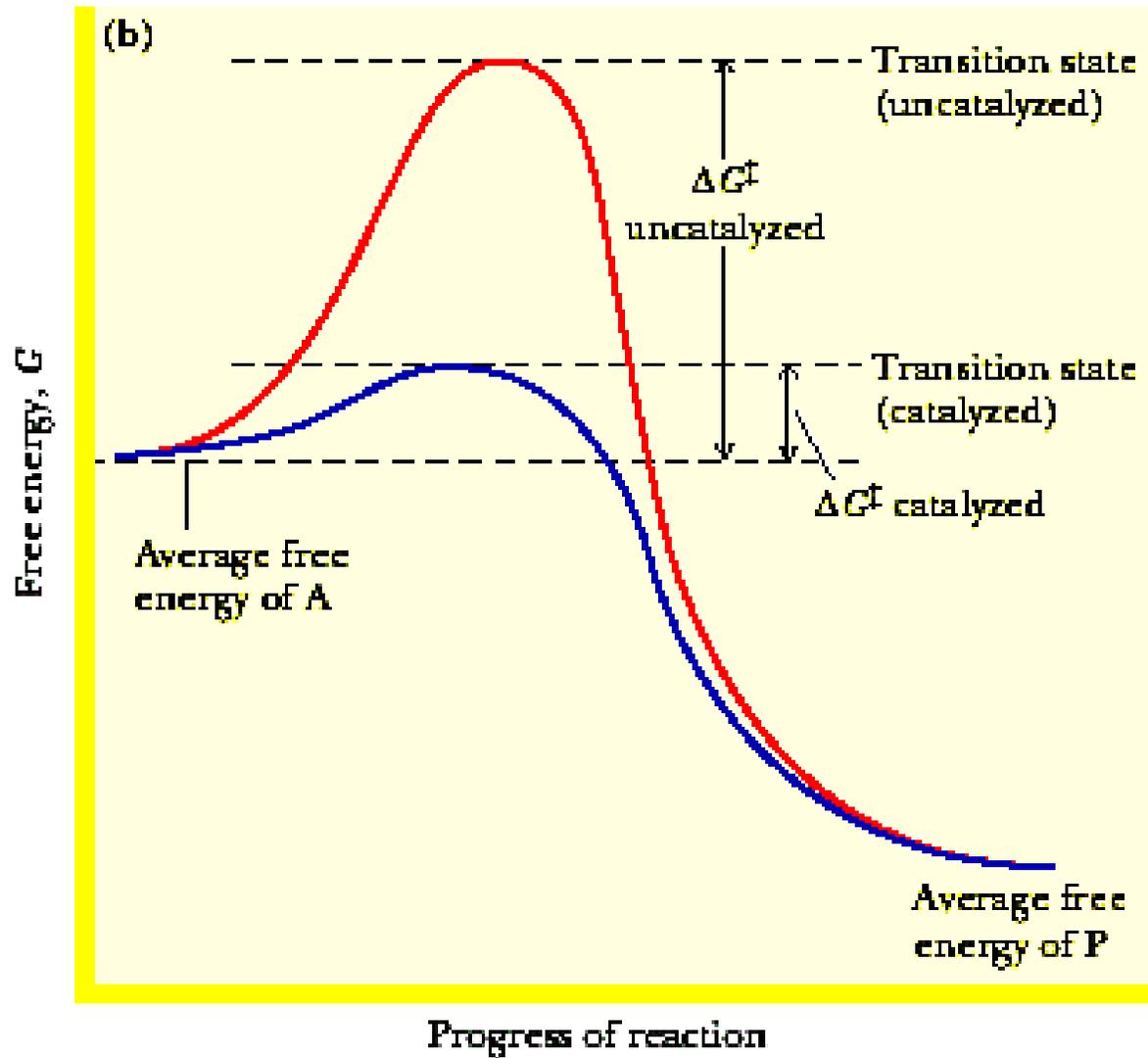
Anhidrasa Carbónica

$$k_{\text{non}} = 0.14 \text{ s}^{-1}$$
$$t_{1/2} = 5 \text{ segundos}$$

$$k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$$
$$t_{1/2} = 700 \text{ nanosegundos}$$

$$k_{\text{cat}}/k_{\text{non}} = 7.1 \times 10^6$$

Reacción	Catalizador	Temperatura (°C)	Activación (Kcal/mol)
Descomposición de H ₂ O ₂	Ninguno	20	18
	Fe ²⁺	22	10
	Catalasa	22	1,7



Clasificación de las Enzimas

www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/enzymes (E.C. w.x.y.z)

E.C.1.-.-.- Óxido-reductasas

Reacciones redox

E.C.2.-.-.- Transferasas

Transferencia de grupos
funcionales

E.C.3.-.-.- Hidrolasas

Reacciones de hidrólisis

E.C.4.-.-.- Liasas

Adiciones a dobles
enlaces

4.1. >C=C<

4.2. >C=O

4.3. >C=N-

E.C.5.-.-.- Isomerasas

Isomerizaciones

5.1. Racemasas

5.2. Cis-trans isomerasas

E.C.6.-.-.- Ligasas

Formación de enlaces
con ruptura de un
Pirofosfato en el ATP

6.1. C-O

6.2. C-S

6.3. C-N

6.4. C-C

Unidades de Concentración de Enzima: Actividad Enzimática

Unidad internacional (I.U.):

Cantidad de enzima que cataliza la formación de un μmol de producto por minuto en las condiciones (pH, T...) especificadas.

Katal (Kat):

Cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mol de sustrato por segundo en unas condiciones definidas.

$$1 \text{ I.U.} = 16,67 \text{ nkat}; 1 \mu\text{kat} = 60 \text{ I.U.}$$

Actividad específica de un preparado: Unidades/mg proteína
Concentración de enzima en disolución: mU o μU por L o mL

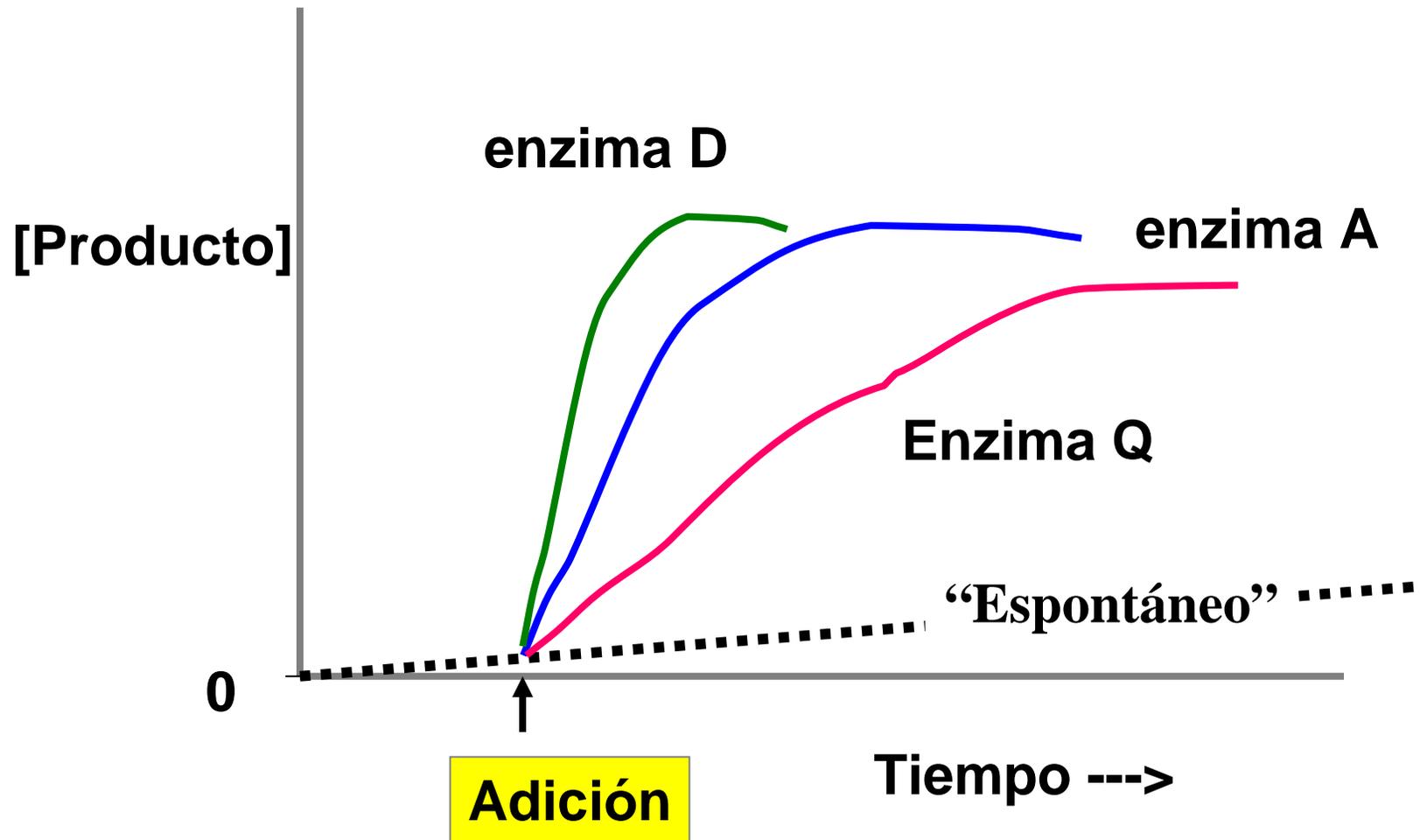
Actividad Molecular= Número de cambio (turnover) $k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$
Número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de centro activo bajo condiciones óptimas

Es una medida basada en datos experimentales
Todas las condiciones que pueden afectar la actividad
Enzimática deben ser estipuladas

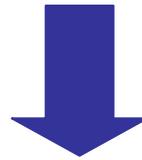
1.0 IU = La cantidad de enzima capaz de convertir
1.0 μ mol de sustrato en producto en 1 minuto
dado que la [sustrato] inicial \gg [enzima]
bajo condiciones de ensayo definidas

1.0 katal = La cantidad de enzima capaz de convertir
S.I 1.0 mol de sustrato en producto en 1 segundo
dado que la [sustrato] inicial \gg [enzima]
bajo condiciones de ensayo definidas

Cada una de estas enzimas incrementa la velocidad de reacción pero con diferente actividad



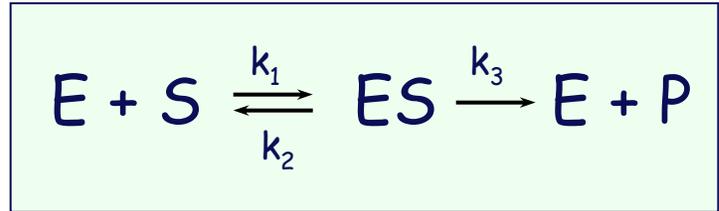
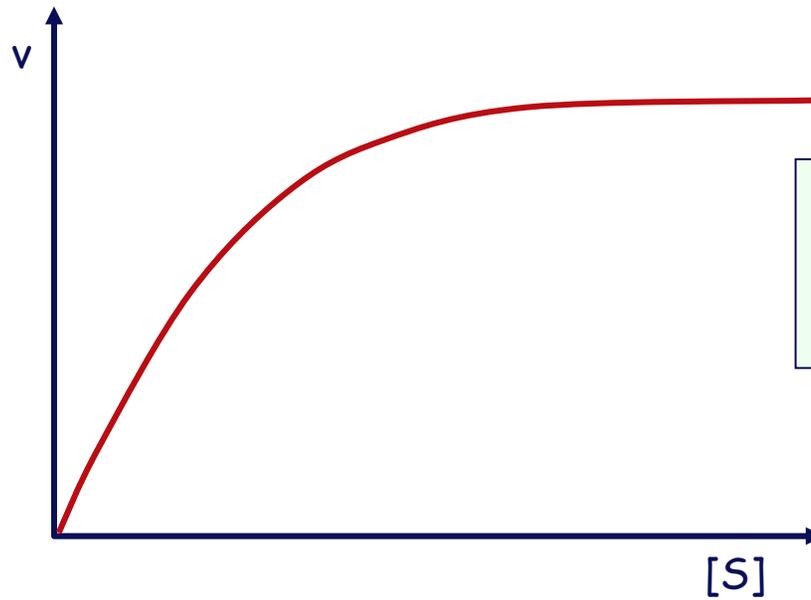
¿Qué características de las enzimas debo conocer antes de poner a punto un Método enzimático de análisis?

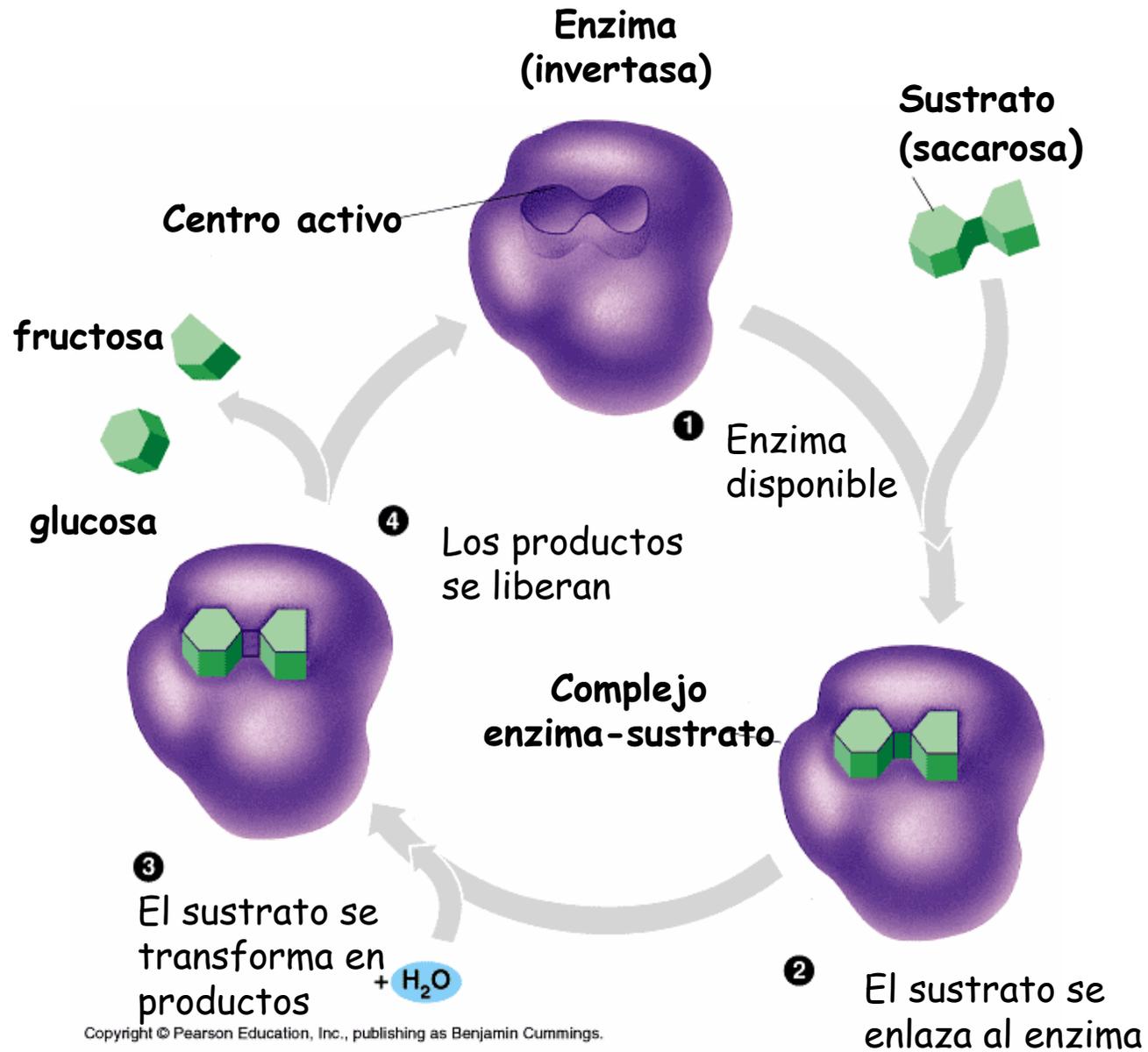


- Características cinéticas de las reacciones enzimáticas. K_m y v_{max} , su significado.
- Factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas y por tanto a la actividad enzimática.

Características Cinéticas de las Reacciones Enzimáticas.

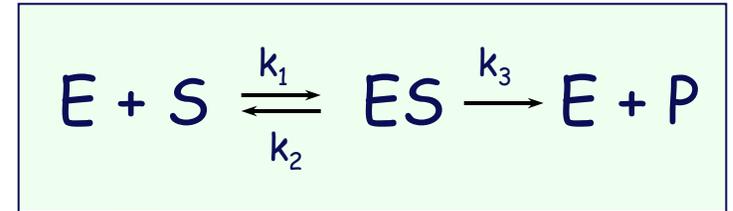
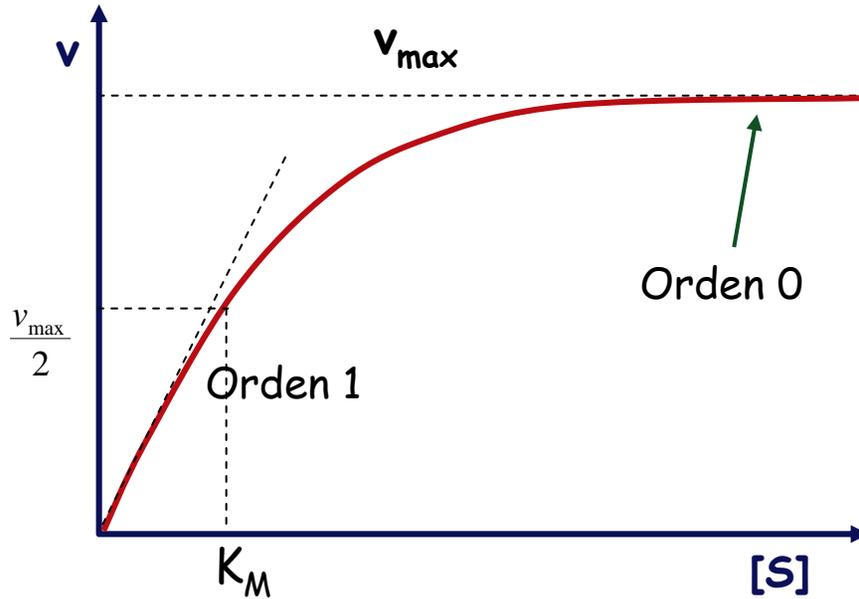
Reacciones Monosustrato





Características Cinéticas de las Reacciones Enzimáticas.

Reacciones Monosustrato



Ecuación de Michaelis-Menten

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad v_{\max} = k_3[E]_t$$

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

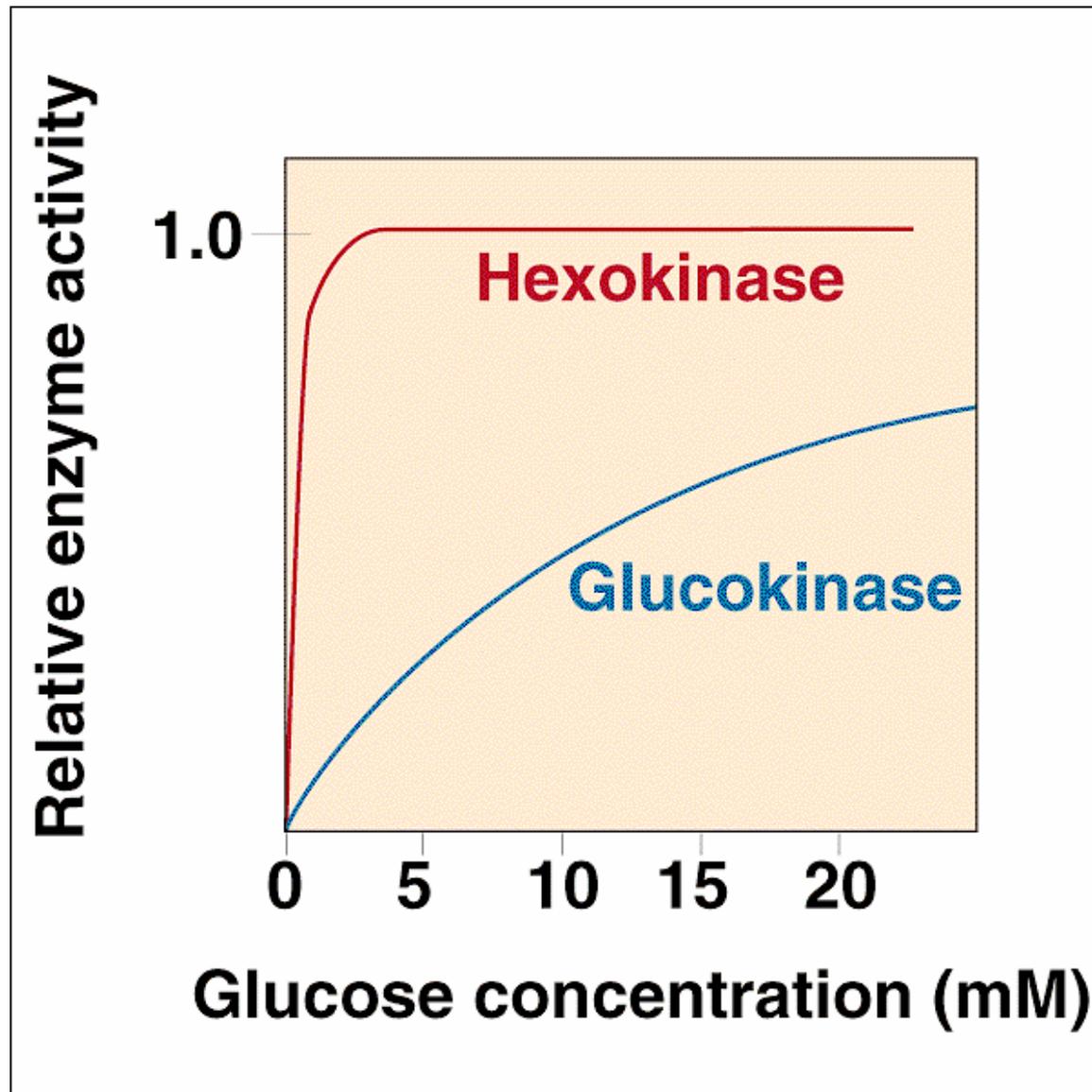
Orden 1
 $[S] \ll K_M$

$$v = \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot [S]$$

Orden 0
 $[S] \gg K_M$

$$v = v_{\max}$$

Cinética Enzimática



Entonces.....

↓ Km



Pequeña [sustrato] se necesita para conseguir la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$



↑ Afinidad de la enzima por el sustrato

↑ Km



Gran [sustrato] se necesita para alcanzar la mitad de la $V_{m\acute{a}x}$



↓ Afinidad de la enzima por el sustrato

Cinética Enzimática

Importancia de conocer las K_m 's

- Hexoquinasa

Presente en todas las células

$K_m = 30 \mu\text{M} (> 0,1 \text{mM})$

- Glucoquinasa

Presente sólo en hígado

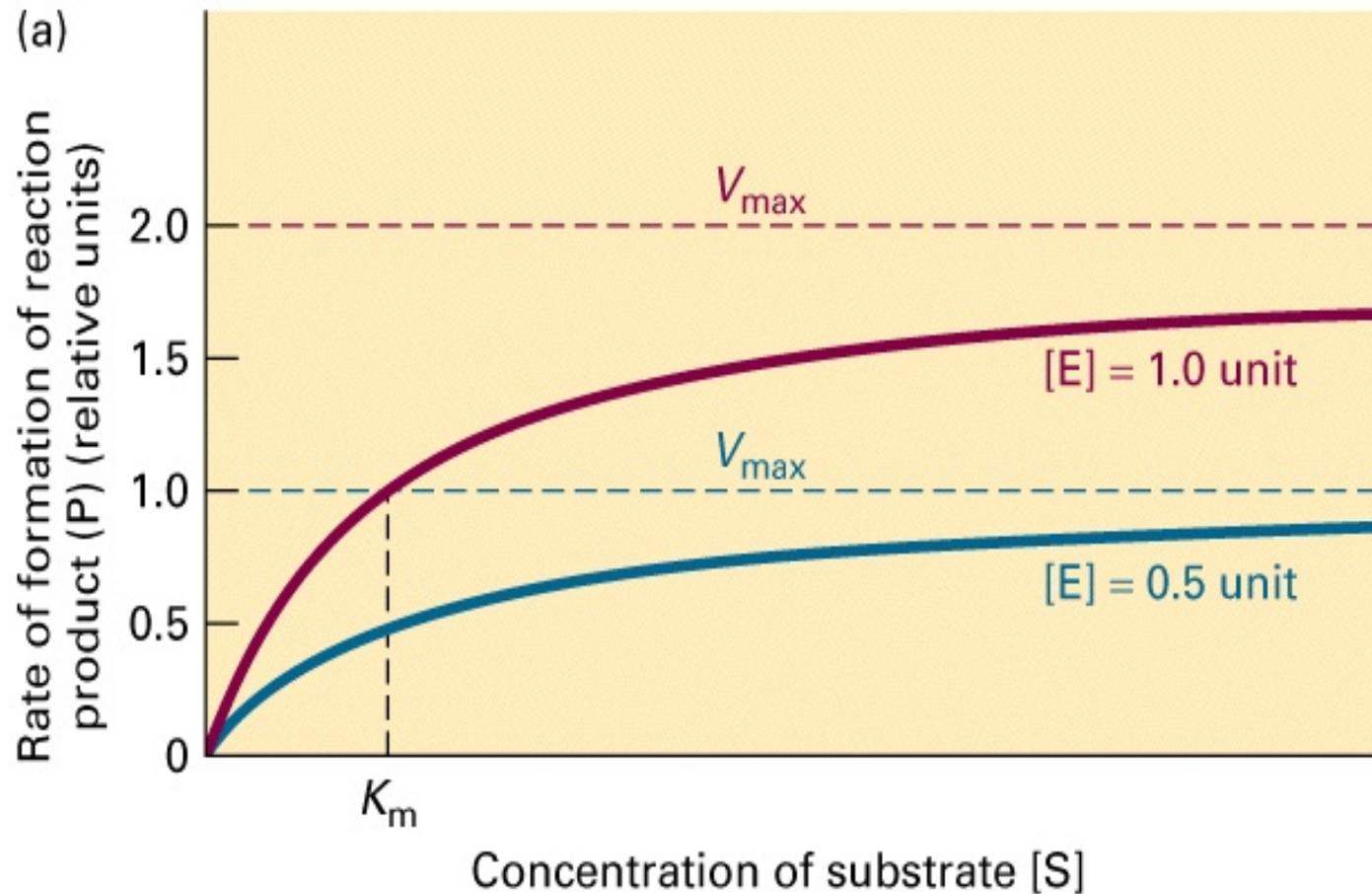
$K_m = 10 \text{mM}$

Saturada

Capaz de metabolizar glucosa prandial

[glucosa] en vena portahepática del orden de mM

$V_{\text{máx}}$ y K_m

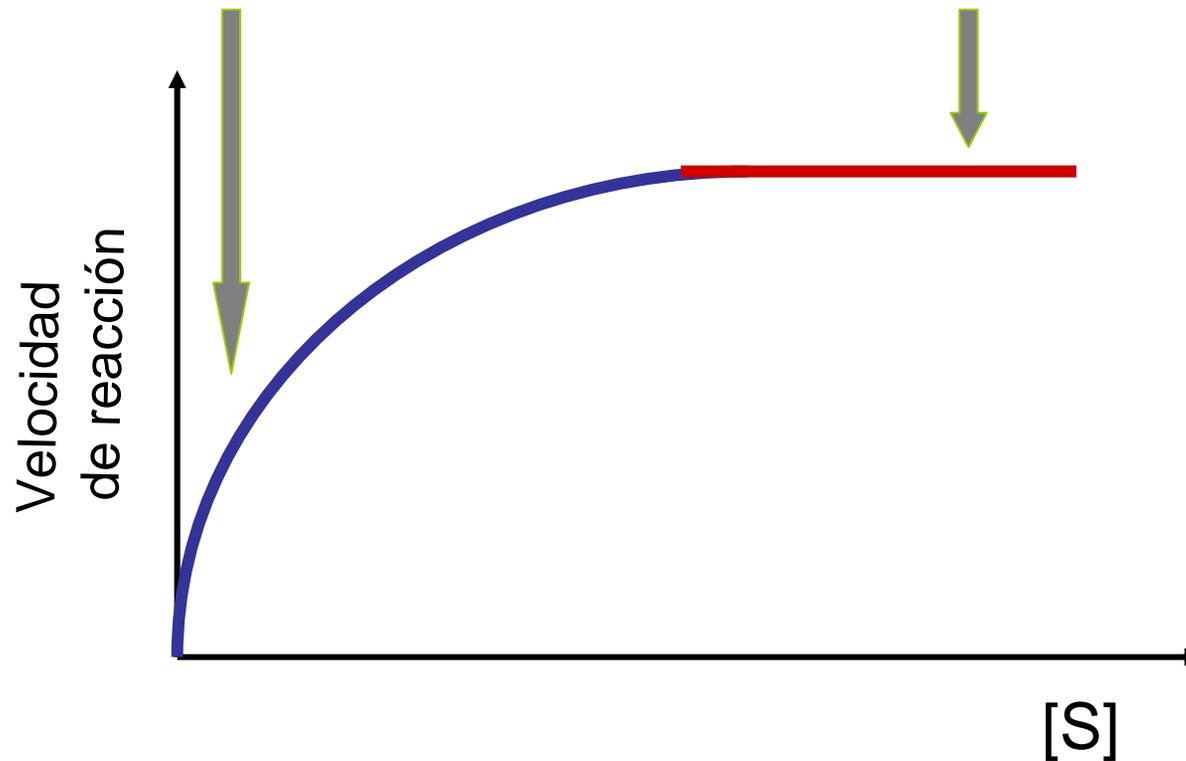


V_{max} depende de la cantidad de enzima.

Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática

primer orden – Proporcional a la concentración de sustrato

orden cero – Independiente de la concentración de sustrato



$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

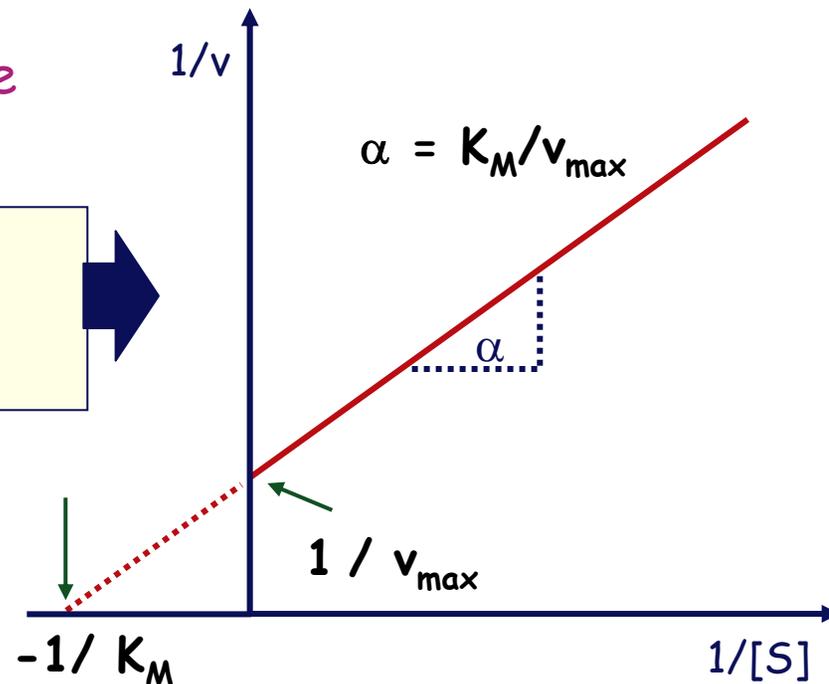
Características Cinéticas de las Reacciones Enzimáticas

Determinación Experimental de los Parámetros de Michaelis-Menten

Para desarrollar un nuevo ensayo enzimático o adaptar uno ya descrito es importante conocer los valores de K_m y v_{max} de la enzima utilizada.

Representación de
Lineweaver-Burk

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

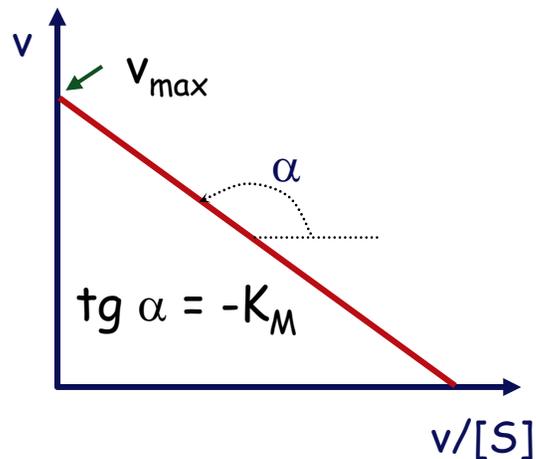
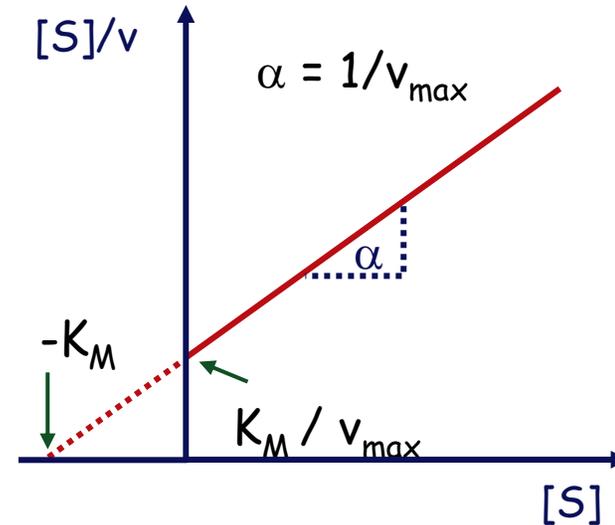


Características Cinéticas de las Reacciones Enzimáticas.

Determinación Experimental de los Parámetros de Michaelis-Menten

Representación de Hanes

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{\max}} [S] + \frac{K_M}{v_{\max}}$$



Representación de Eadie-Hofstee

$$v = -K_M \left(\frac{v}{[S]} \right) + v_{\max}$$

Factores que afectan a la velocidad de las reacciones enzimáticas

Además para desarrollar un ensayo enzimático deben controlarse Todas aquellas variables experimentales que puedan afectar a la velocidad de la reacción enzimática.

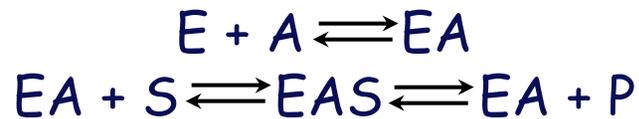
- ✧ Concentraciones de:
 - ✓ Sustrato
 - ✓ Enzima (Actividad enzimática)
 - ✓ Activadores
 - ✓ Inhibidores
- ✧ Temperatura
- ✧ pH
- ✧ Fuerza iónica, naturaleza de los iones presentes en el medio, etc.

Factores que afectan a la actividad enzimática

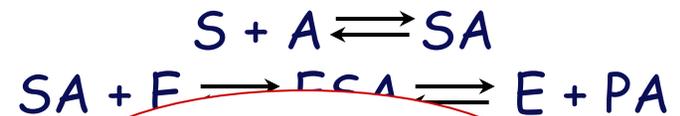
Presencia de Activadores (A)

Sustancias que producen un aumento de la velocidad de la reacción enzimática sin resultar alterados en ella.

1. Interacción con la enzima



2. Interacción con el sustrato



Verdadero sustrato de la enzima

Mg²⁺ para las (fosfato) kinasas

- ✓ Cationes metálicos, principalmente de elementos de número atómico comprendido entre 19 y 30
- ✓ Aniones inorgánicos, de efecto inespecífico
- ✓ Compuestos orgánicos (cisteína, β-mercaptoetanol)

Cl⁻

Factores que afectan a la actividad enzimática

Presencia de Inhibidores

Sustancias que producen una disminución de la velocidad de la reacción enzimática.

Inhibidores irreversibles

- ✧ La inhibición aumenta con la $[I]$ y puede llegar a ser total
- ✧ Unión enzima-inhibidor covalente
- ✧ La inhibición no revierte al retirar el inhibidor de la mezcla de reacción
- ✧ La velocidad de reacción disminuye linealmente con $[I]$ a bajas $[I]$

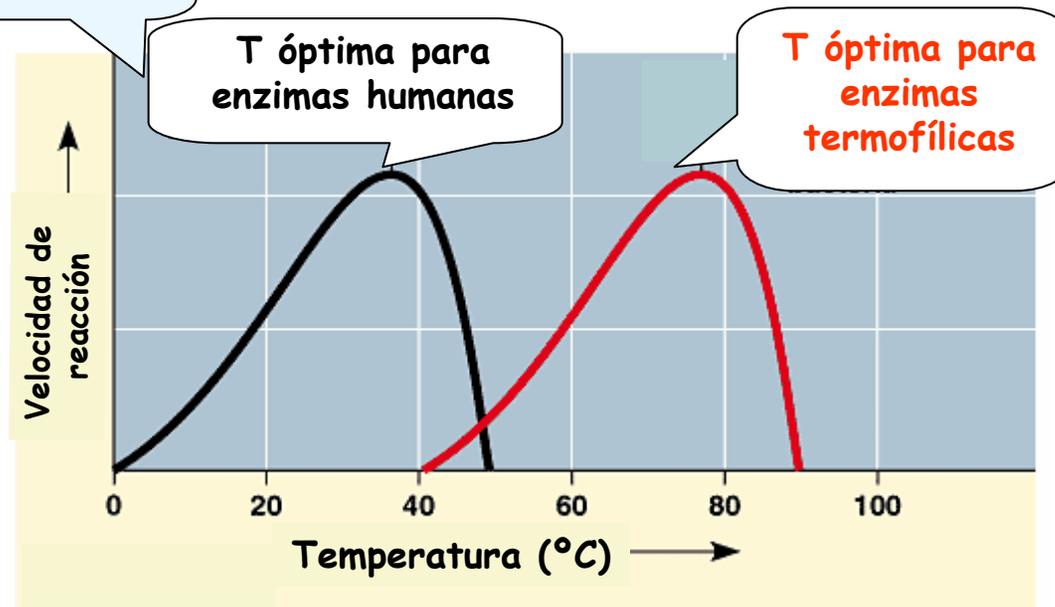
Inhibidores reversibles

- ✧ La enzima recobra su actividad cuando se elimina al inhibidor del medio
- ✧ Unión enzima-inhibidor y/o complejo ES-inhibidor no covalente
- ✧ La inhibición puede ser revertida por diálisis o simple dilución
- ✧ La inhibición es altamente específica

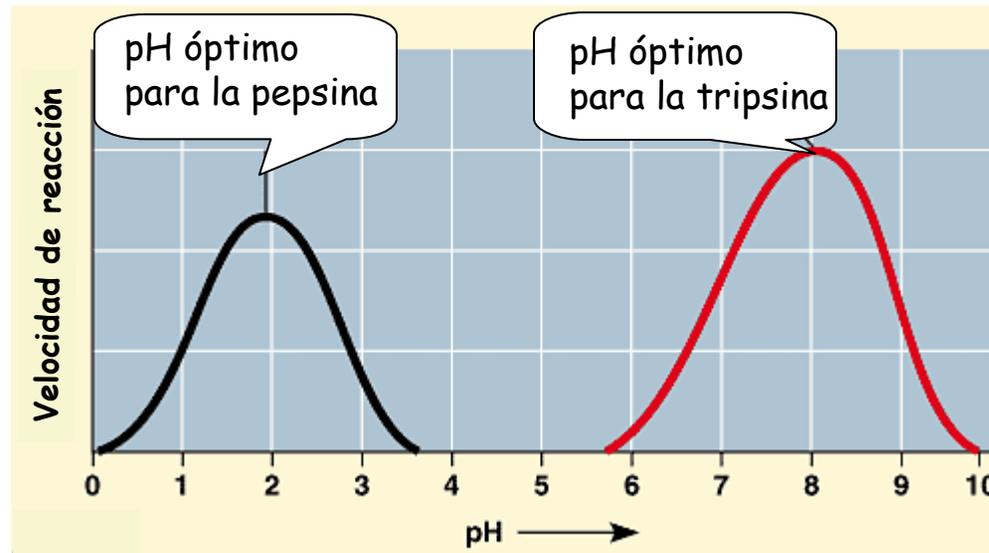
Factores que afectan a la actividad enzimática: Temperatura

Efecto final → Cada enzima posee una temperatura óptima

Ejemplos

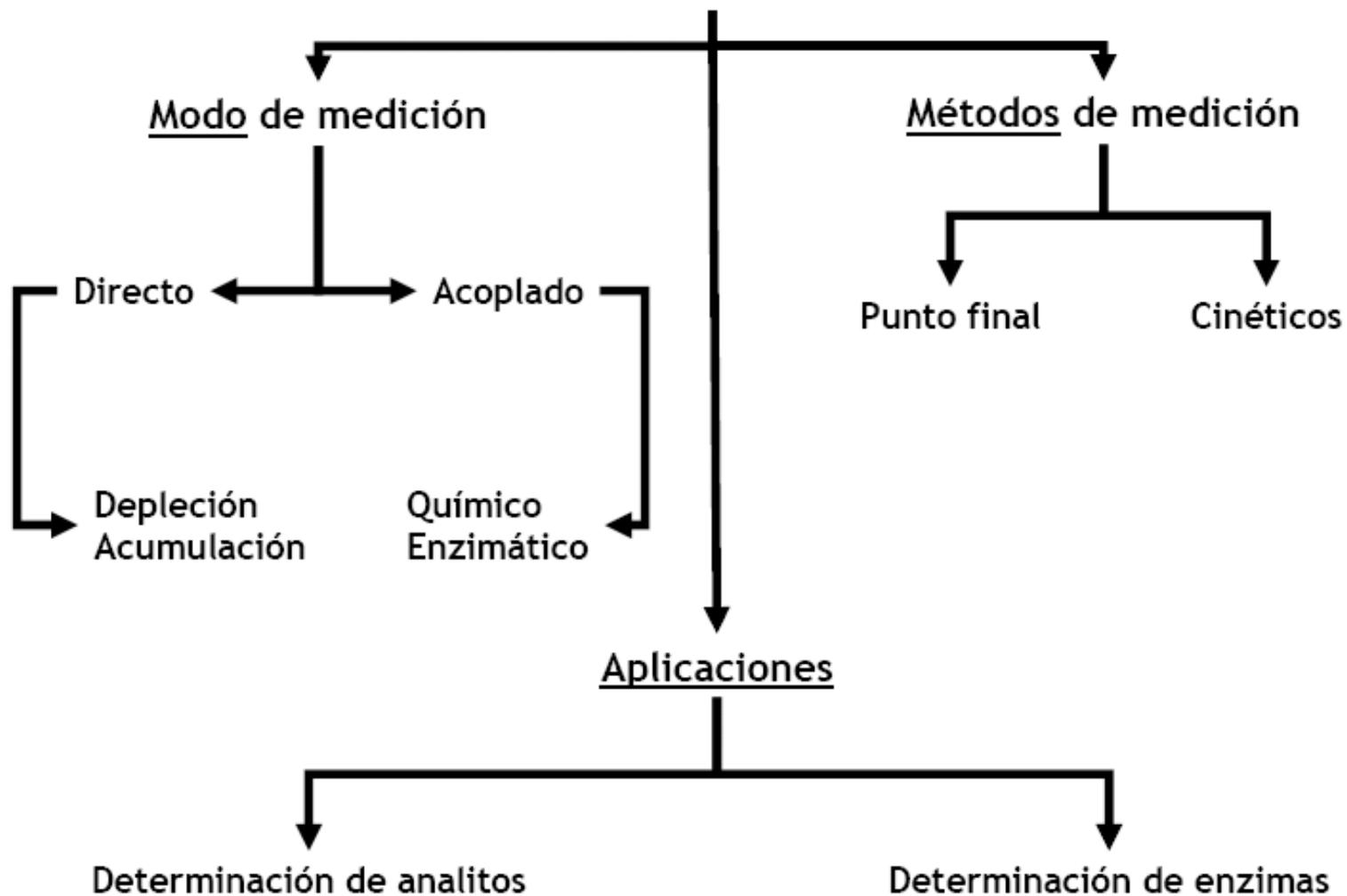


Factores que afectan a la actividad enzimática: pH



- ✓ pH y medio iónico afectan a la conformación tridimensional de la proteína
- ✓ La actividad de la enzima depende de la extensión de la reacción de disociación de ciertos aminoácidos en la estructura proteica.
- ✓ Si el sustrato tiene propiedades ácido-base es probable que la enzima sólo pueda catalizar la transformación de su forma disociada o de su forma no disociada.

Análisis Enzimáticos



Métodos de equilibrio
o de cambio total



sustrato

❖ **Métodos de Punto Final**

✱ **Con equilibrio favorable**

medida de Producto

medida de Su

medida de Co

❖ **Métodos con reacciones acopladas**

✱ **Con reacción irreversible subsiguiente**

Basados en cinética
de orden uno

Basados en cinética
de orden cero

Métodos cinéticos



Se mide la velocidad de la
reacción enzimática



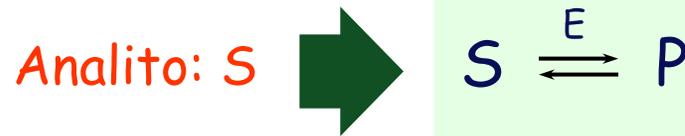
Sustrato

Enzima

Activadores

Inhibidores

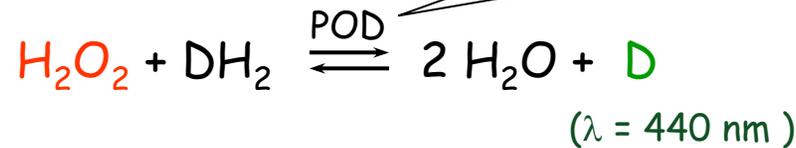
Métodos Enzimáticos de Equilibrio de PUNTO FINAL



A. Con equilibrio favorable 

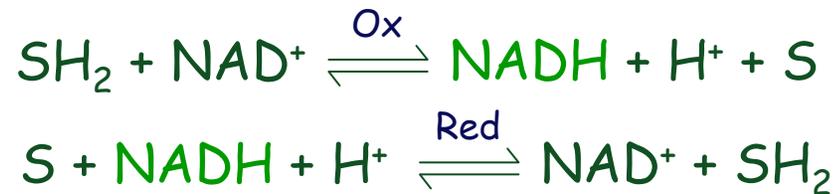
Especie medida
Producto
Cofactor
Sustrato

1. Medida del Producto

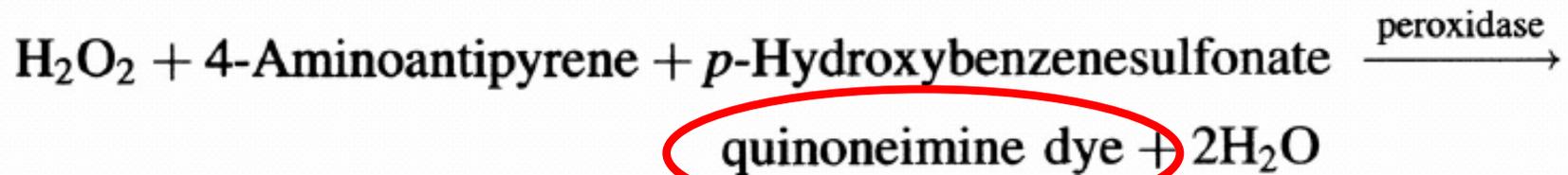
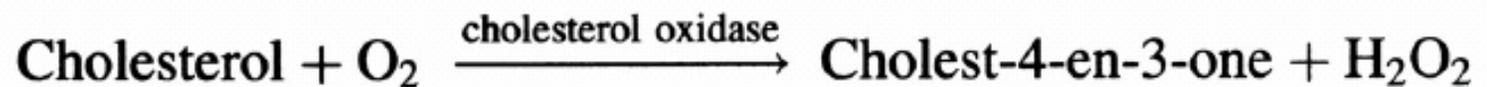
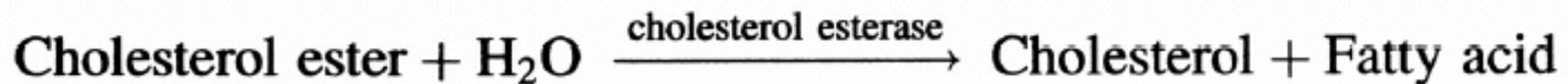


2. Medida del Cofactor  NADH, $\lambda_m = 340 \text{ nm}$

Espectrofotométrica
Fluorimétrica
Amperométrica

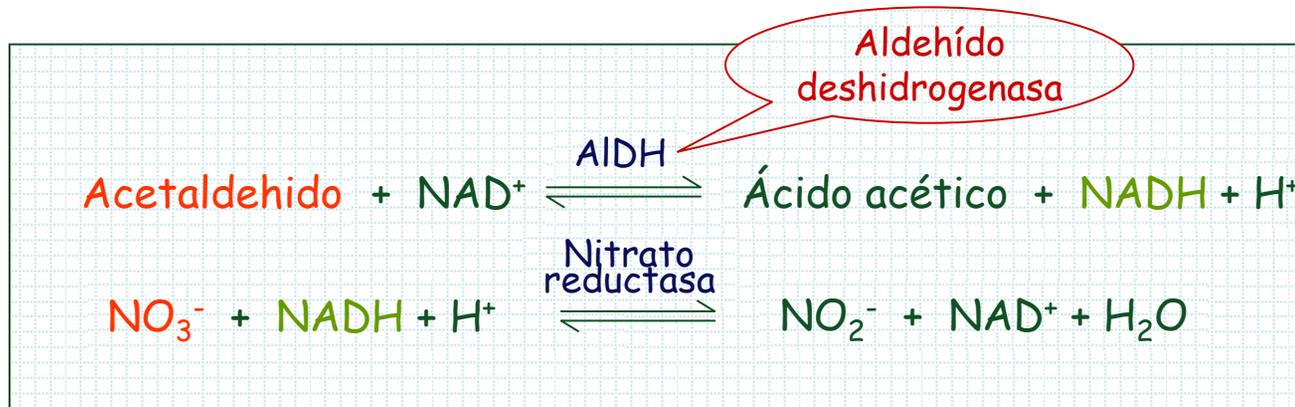
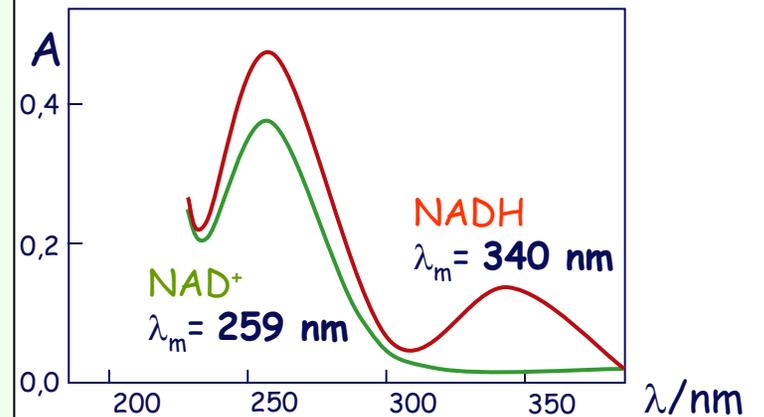
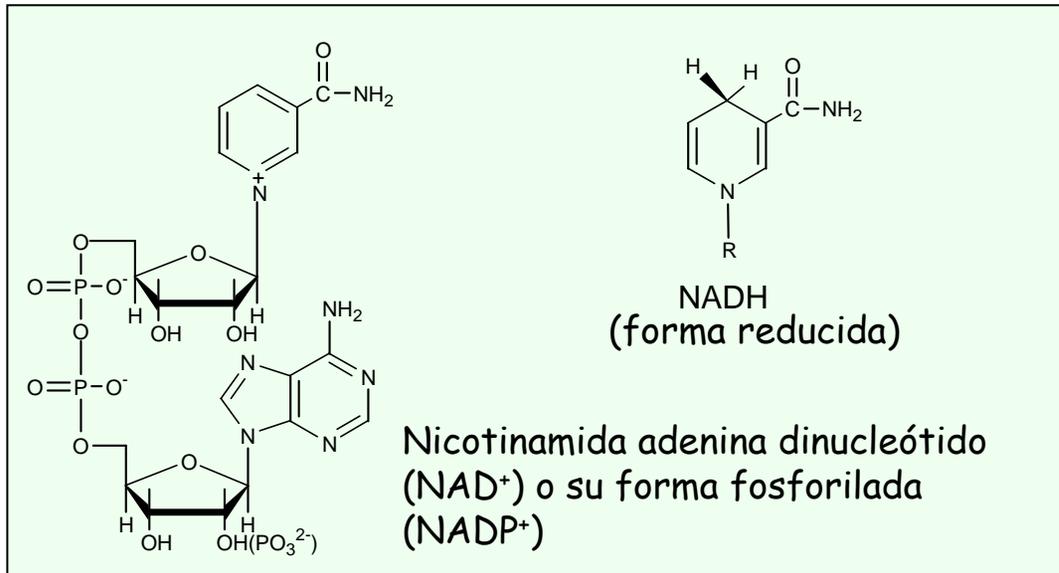


Método a punto final

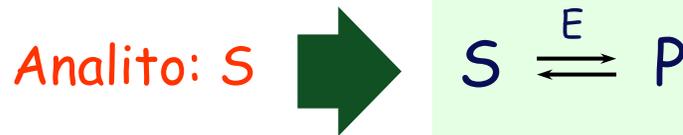


Métodos Enzimáticos de Equilibrio de Punto Final

2. Medida del Cofactor



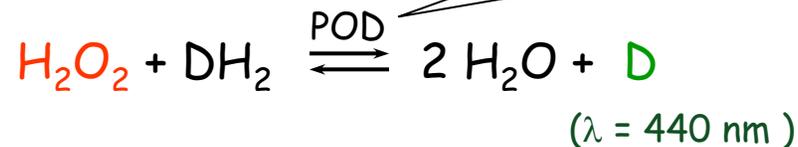
Métodos Enzimáticos de Equilibrio de UN SOLO PASO



A. Con equilibrio favorable 

Especie medida
Producto
Cofactor
Sustrato

1. Medida del Producto



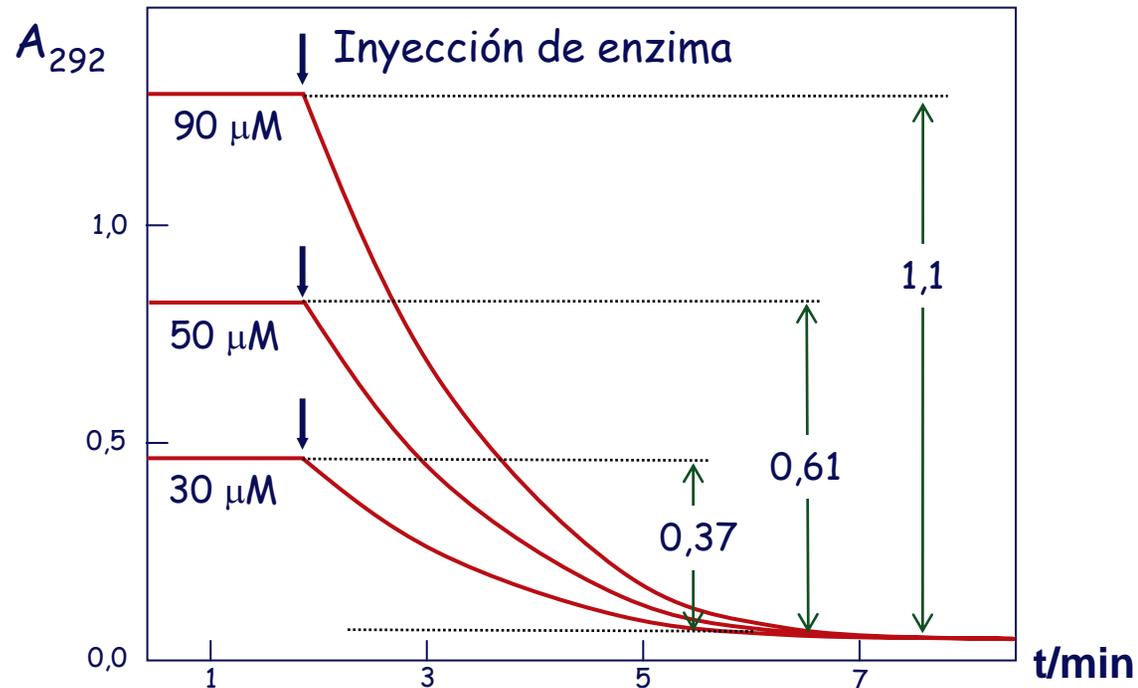
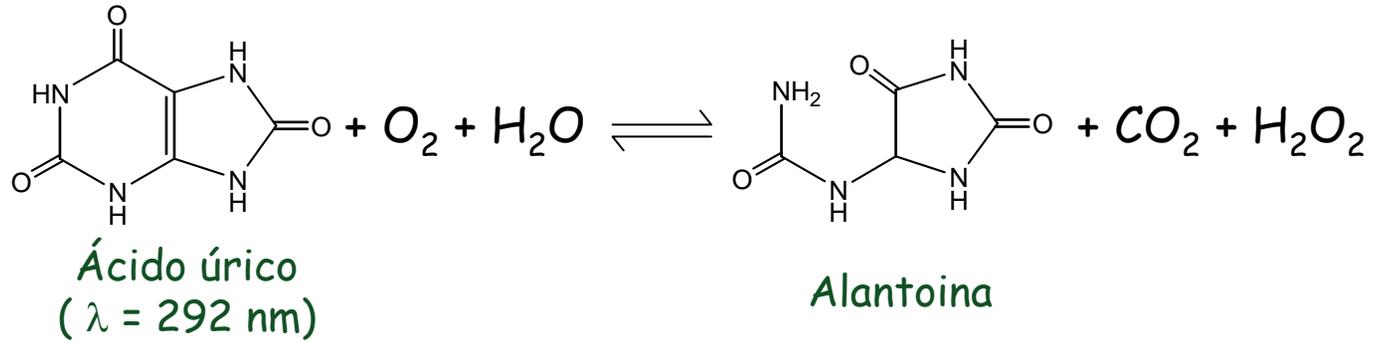
2. Medida del Cofactor  NADH, $\lambda = 340 \text{ nm}$

3. Medida del Sustrato

El método enzimático aporta selectividad a la medida

3. Medida del Sustrato

Ejemplo: Determinación de ácido úrico



Si no se pueden medir fácilmente los sustratos o productos de la reacción enzimática en la que se transforma el analito debe optarse por un esquema de reacciones acopladas

Reacción auxiliar (E_{aux}):

Reacción en la que se transforma la sustancia a determinar

Reacción indicadora (E_{ind}):

Reacción utilizada para realizar la medida

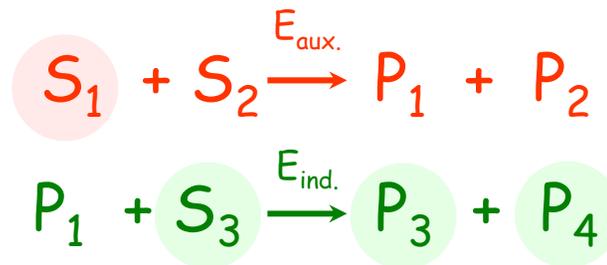


= Analito, compuesto a determinar



= Especies medibles

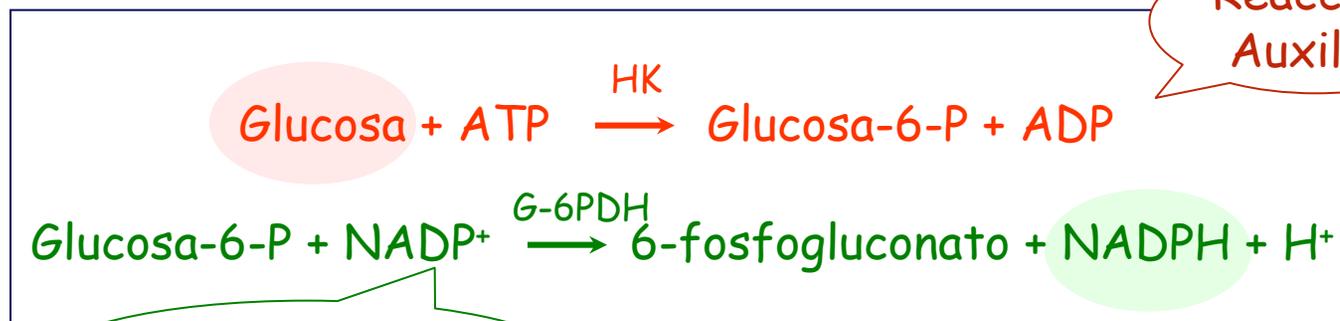
A. Métodos con reacción indicadora subsiguiente



A. Sistema de reacciones acopladas con reacción indicadora subsiguiente

Determinación de glucosa, sistema HK-G6PDH

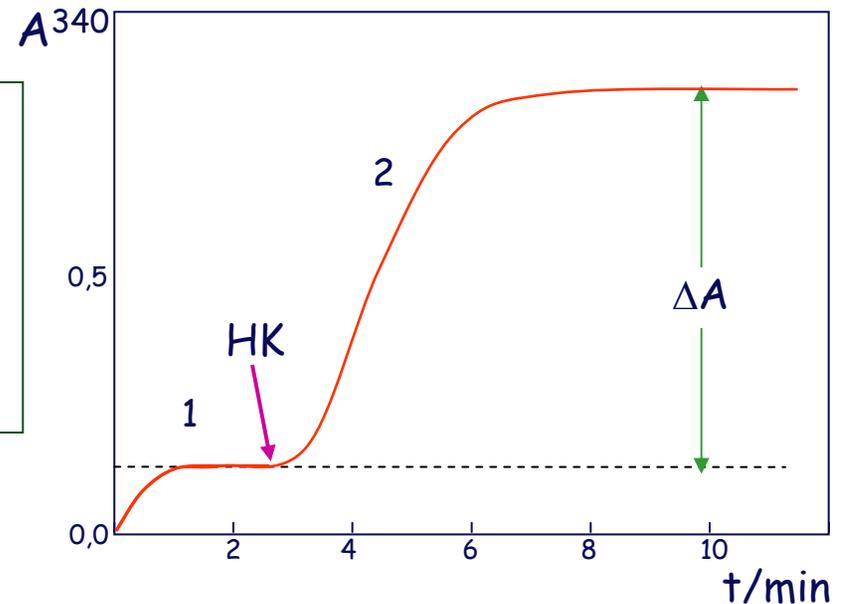
HK (Hexoquinasa); G6PDH (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)



Reacción Auxiliar

Reacción indicadora

1. Incubación de la mezcla de ensayo con G-6PDH en ausencia de HK
2. Adición de HK y reducción de NADP⁺
3. $\Delta A \propto [\text{Glucosa}]$



Reacción auxiliar:

Reacción en la que se transforma la sustancia a determinar

Reacción indicadora:

Reacción utilizada para realizar la medida

Métodos Enzimáticos Cinéticos

A. Basados en reacciones de orden cero

Determinación de enzimas, activadores e inhibidores



Condiciones: Concentraciones saturantes de
de sustrato y coenzimas ($v = v_{\max}$)

$$v = k_3 [E]$$

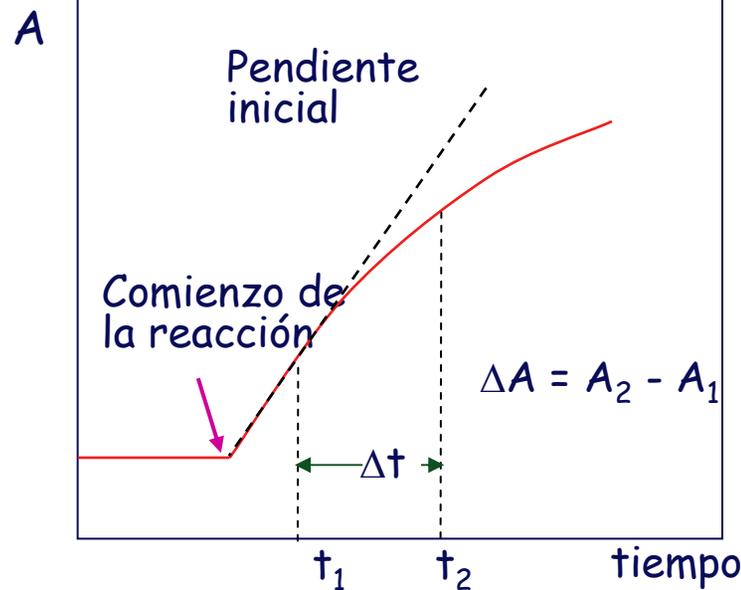
Métodos Enzimáticos Cinéticos

B. Basados en reacciones de orden uno

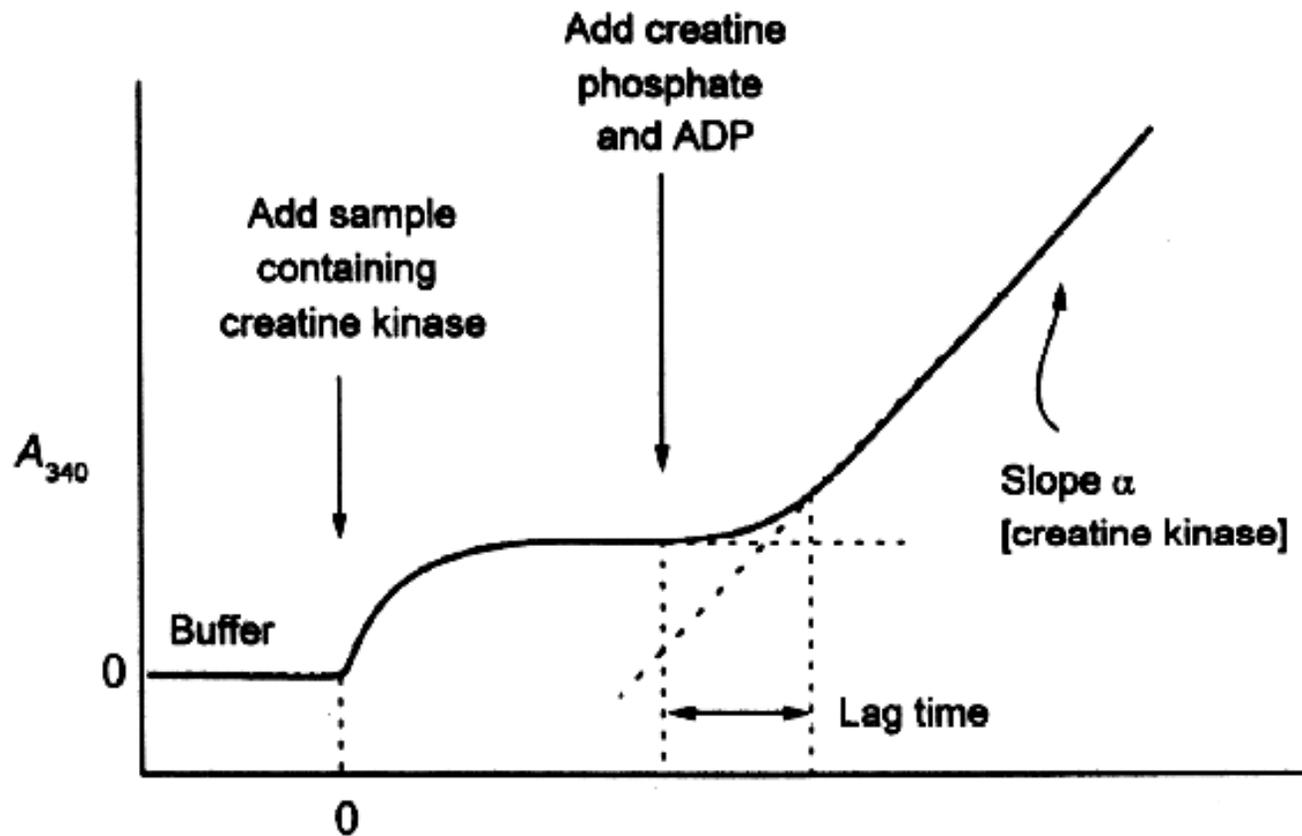
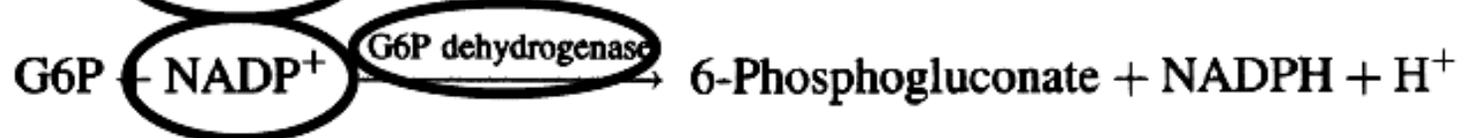
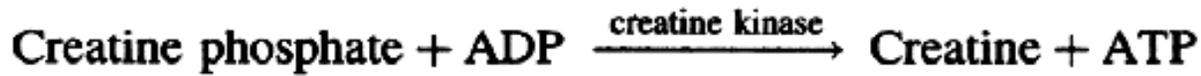
Determinación de sustratos

$$v = \left(\frac{V_{\max}}{K_M} \right) \cdot [S]$$

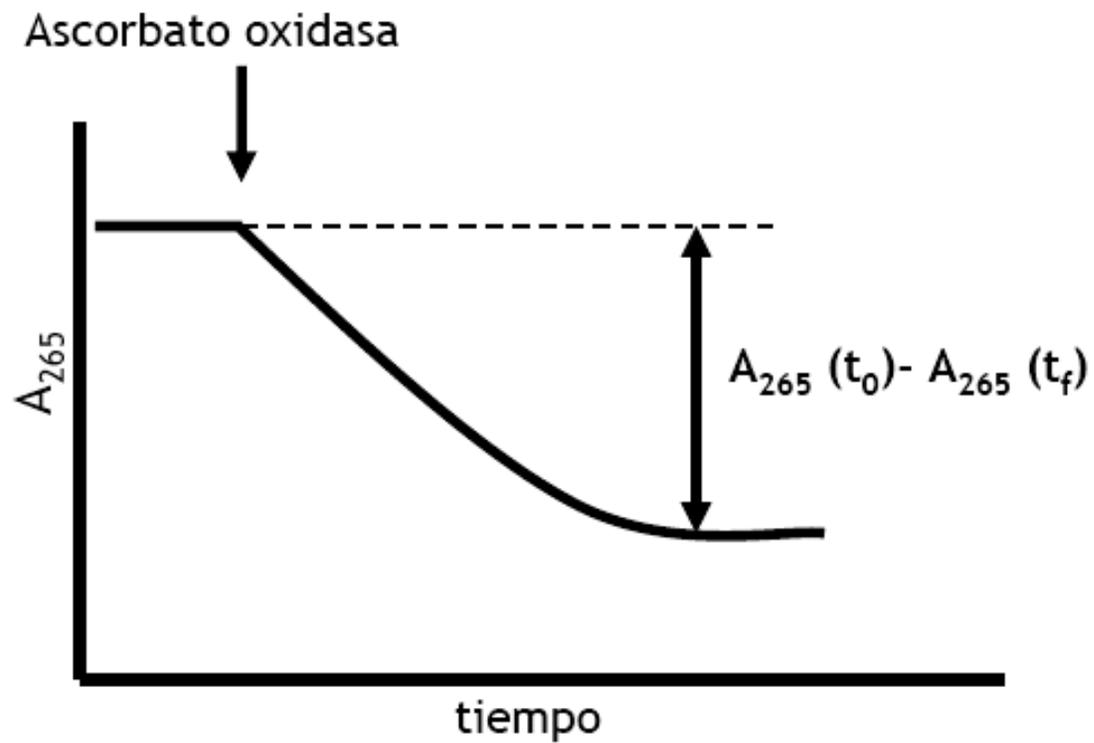
Ley límite de orden 1 de la ecuación de Michaelis-Menten
 $[S] < 0,05 K_M$



Método cinético



L-Ascorbate : Oxygen oxidoreductase (EC 1. 10. 3. 3)



Aplicaciones Analíticas

A. Análisis Clínico

B. Industria Alimentaria

C. Otros campos

- * Control de calidad en la industria farmacéutica y de cosméticos
- * Química Agrícola
- * Botánica
- * Microbiología