

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASAS (CATALASA)

Cedillo Jiménez, C.A.<sup>1</sup>; Hernández López, J.L.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Querétaro.

<sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica.

## RESUMEN

Se determinó la actividad enzimática de la catalasa en una muestra de sangre fresca, variando condiciones de pH (tres niveles: 4.96, 6.94 y 9.04) y de concentración de sustrato (siete niveles: 0.0042, 0.0083, 0.0166, 0.0332, 0.0415, 0.0498 y 0.0664 M), titulando con permanganato de potasio el peróxido de hidrógeno remanente. Se encontró diferencia significativa entre ambas variables (pH y concentración de sustrato). Se encontró que a mayor concentración de sustrato (en el intervalo de concentraciones manejadas), el efecto en la velocidad era positivo; entre pH 6.94 y 9.04 se encontró mayor efecto en la velocidad, el pH 4.96 se mantuvo debajo de ambos niveles. Se trató la enzima como si ésta se ajustara a un perfil de Michaelis-Menten y se estimaron los parámetros cinéticos usando ajustes lineales ponderados por el arreglo de Lineweaver-Burk y Hanes. Se encontró que la catalasa no se ajusta a un perfil Michaelis-Menten, por ello es necesario estimar los parámetros con el patrón adecuado.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas con capacidad de catalizar reacciones biológicas. Igual que los catalizadores inorgánicos, aumentan la velocidad para alcanzar el equilibrio de la reacción. El mecanismo por el cual las enzimas incrementan la velocidad de la reacción es reduciendo la energía libre de activación requerida para la transformar un sustrato al producto correspondiente, sin afectar la constante de equilibrio.

$v_1$	Donde:
$v_2$	A y B = Sustratos
	C y D = Productos
$v_1$	= Velocidad de reacción para formar productos
$v_2$	= Velocidad de reacción para formar reactivos

La actividad de una enzima se evalúa en función de la velocidad de la reacción. La cinética enzimática estudia la velocidad de la reacción, los factores que la modifican y el mecanismo de la misma. Los factores fisicoquímicos que modifican la actividad de la enzima son: concentración del sustrato, concentración de la enzima, pH, temperatura, fuerza iónica, inhibidores.

Leonor Michaelis y Maud Menten en 1913, propusieron un modelo clásico para el estudio de la cinética enzimática. Este modelo consiste en graficar la velocidad de la actividad enzimática y la concentración del sustrato. Esta representación gráfica permite determinar la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) al interpolar la mitad de la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ).

En esta práctica se empleará la enzima catalasa para analizar algunos aspectos de la cinética enzimática. La catalasa utiliza una molécula de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como sustrato donador de electrones y otra molécula de  $H_2O_2$  como oxidante o aceptor de electrones.



La catalasa está contenida en los peroxisomas de eritrocitos, médula ósea, mucosas, riñón e hígado. Su función es la descomposición del  $H_2O_2$  formado por acción de las oxidasas.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar algunos factores que inciden sobre la actividad enzimática de la catalasa.

## PARTE EXPERIMENTAL

Determinación de la actividad enzimática de la catalasa: Se empleó un método indirecto, siguiendo el procedimiento descrito por Garzon (2002). Se realizó el experimento por triplicado, con un sistema aleatorizado para evitar sacar conclusiones erróneas en la pérdida de actividad enzimática por el tiempo entre la preparación de la solución y la prueba enzimática; el orden de las corridas se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Orden de pruebas enzimáticas, según el día de experimentación y el pH de trabajo.

*Nota: Se considera un par de puntos para el orden de corrida debido a que se experimenta con la enzima y con su blanco, el cual debe ser igual en las condiciones del primero a excepción de la adición de catalasa.*

Orden de Corrida	Matraces (Blanco-Enzima)								
	Día 1	Día 2		Día 3		Día 4	Día 5		
	pH 9.04	pH 6.94	pH 4.96	pH 4.96	pH 6.94	pH 9.04	pH 6.94	pH 9.04	pH 4.96
1	7-8	13-14	9-10	9-10	13-14	7-8	13-14	7-8	9-10
2	13-14	7-8	3-4	3-4	7-8	13-14	7-8	13-14	3-4
3	9-10	3-4	7-8	7-8	3-4	9-10	3-4	9-10	7-8
4	1-2	1-2	5-6	5-6	1-2	1-2	1-2	1-2	5-6
5	11-12	5-6	13-14	13-14	5-6	11-12	5-6	11-12	13-14
6	5-6	9-10	1-2	1-2	9-10	5-6	9-10	5-6	1-2
7	3-4	11-12	11-12	11-12	11-12	3-4	11-12	3-4	11-12

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 2 se muestran las velocidades de reacción enzimática correspondientes a cada nivel de pH y concentración de sustrato.

Cuadro 2. Velocidad de reacción enzimática (por triplicado) para siete niveles de concentración de sustrato y tres niveles para valor de pH.

*Medida de velocidad en meq de  $H_2O_2$  /min para la réplica 1 2 y 3 ( $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  respectivamente)*

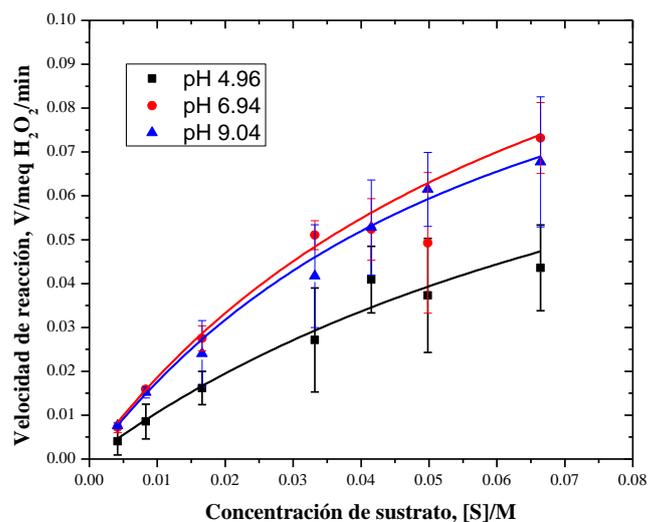
*\*Datos anómalos detectados en los gráficos y respaldados en el análisis de residuales a través de Minitab.*

[ $H_2O_2$ ] (M)	pH	Velocidad de reacción enzimática (meq $H_2O_2$ destruidos/min) $R_1$	Velocidad de reacción enzimática (meq $H_2O_2$ destruidos/min) $R_2$	Velocidad de reacción enzimática (meq $H_2O_2$ destruidos/min) $R_3$
0.0042	4.96	0.0012	0.0036	0.0074
0.0083	4.96	0.0047	0.0083	0.0126
0.0166	4.96	0.0118	0.0178	0.0189
0.0332	4.96	0.0166	0.0249	0.0400
0.0415	4.96	-0.0012*	0.0355	0.0463
0.0498	4.96	0.0260	0.0343	0.0515
0.0664	4.96	0.0332	0.0450	0.0526
0.0042	6.94	0.0083	0.0059	0.0074
0.0083	6.94	0.0154	0.0166	0.0158
0.0166	6.94	0.0272	0.0249	0.0305

0.0332	6.94	0.0521	0.0474	0.0537
0.0415	6.94	0.0462	0.0509	0.0600
0.0498	6.94	0.0367	0.0438	0.0673
0.0664	6.94	0.1077*	0.0675	0.0789
0.0042	9.04	0.0083	0.0071	0.0074
0.0083	9.04	0.0166	0.0142	0.0147
0.0166	9.04	0.0272	0.0154	0.0295
0.0332	9.04	0.0462	0.0284	0.0505
0.0415	9.04	0.0592	0.0403	0.0589
0.0498	9.04	0.0639	0.0521	0.0684
0.0664	9.04	0.0734	0.0509	0.0789

Se encontraron dos datos anómalos, uno para pH 4.96 y otro para 6.94. En el gráfico de Velocidad contra concentración de sustrato, se encontró que estos dos datos se alejaban de la tendencia que presentaban el resto de los datos (gráfico no mostrado); el análisis con Minitab, especificando el orden de corridas, en diseño de experimentos, arroja cuatro observaciones atípicas por largos residuales (datos no mostrados), de los cuales se quitaron solo dos (con los residuales más grandes y con el respaldo de los gráficos ya mencionados). Se repitió el análisis con el mismo procedimiento mediante Minitab y se encontró que tanto la concentración de peróxido de hidrógeno como el pH, tienen un efecto significativo en la velocidad de reacción con un valor  $P=0.000$ ; el efecto de interacción entre ambas variables no resultó significativo ( $P=0.240$ ). Se encontró que a mayor concentración de sustrato (en el intervalo de concentraciones manejadas) existe un mayor efecto en la velocidad de reacción. Para el pH se ilustra que el efecto positivo más grande en la velocidad de reacción se obtiene en pH de 6.94, sin embargo, es solo ligeramente superior a pH de 9.04 y ambos están por encima de pH 4.96.

Gráfica 1. Velocidad de reacción,  $V/\text{meq H}_2\text{O}_2/\text{min}$  contra concentración de sustrato  $[\text{S}]/\text{M}$ .



Se hizo el ajuste Michaelis-Menten y se introdujo una línea de tendencia no lineal para una hipérbola, el propósito fue demostrar de forma gráfica que el pH propicia las condiciones para obtener mayor velocidad de reacción.

Se estimaron los parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para los tres valores de pH usando las ecuaciones linealizadas de Lineweaver-Burk y Hanes con factores de peso. Los resultados se muestran en el cuadro 3, donde encontramos que ambos parámetros ( $K_M$  y  $V_{m\acute{a}x}$ ) son mayores para pH 9.04, sin embargo, también aumenta la desviación estándar correspondiente.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos de Michaelis-Menten para la catalasa.

	pH 4.96	pH 6.94	pH 9.04
$K_M$ (mol/L)	0.0546±0.0214	0.0719±0.0140	0.0861±0.0175
$V_{m\acute{a}x}$ (meq $H_2O_2$ destruidos/min)	0.0966±0.0404	0.1558±0.0469	0.1746±0.0600

Los coeficientes obtenidos para  $R^2$  en cada uno de los análisis de regresión no son confiables, ya que en el mejor de los casos se explica solo el 74.4% de los datos. Este comportamiento anormal (según Michaelis-Menten) puede ser debido a un comportamiento No Michaeliano. Hugo Aebi (1947) explica que la cinética de la catalasa no obedece un patrón normal. Además, las transformaciones para linealizar, tienen el efecto de transformar también los errores ( $\epsilon$ ) alterando así la relación entre  $\epsilon$  y  $f$ . Generalmente los supuestos sobre  $\epsilon$  para el modelo original no tienen las mismas propiedades después de la transformación. Los modelos no lineales se originan cuando un investigador obtiene, por desarrollo de una teoría o una situación, una relación en la que los parámetros no son lineales (Rivas y col. 1993).

## CONCLUSIONES

Se encontró que el pH que propicia las condiciones para obtener mayor actividad enzimática es de 6.94 (no le llamamos pH óptimo pues entre cada valor de pH con los que trabajamos, se encuentran dos unidades). Se demostró que a mayor concentración de sustrato (en el intervalo de concentraciones manejadas) hay un efecto positivo en la velocidad de reacción. Se representó gráficamente la actividad enzimática, ajustando al modelo de Michaelis-Menten (gráfica 2); hicimos el ajuste lineal según la representación de Lineweaver-Burk y de Hanes para estimar los parámetros cinéticos usando factores de peso. Estos parámetros no tienen validez alguna, pues fueron determinados bajo el supuesto que la catalasa se comporta de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten. La catalasa no obedece un patrón Michaeliano, pues la concentración del complejo enzima sustrato no permanece constante a través del tiempo debido a los cambios sufridos por la enzima durante la liberación de su producto (complejo enzimático II y III). Por lo tanto Debe hacerse un ajuste según la ecuación de Hill para poder calcular los parámetros cinéticos de la catalasa. Además sería conveniente modificar el intervalo de tiempo, pues la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa se desarrolla inicialmente como una reacción de primer orden, pero después de un minuto el grado de descomposición de  $H_2O_2$  comienza a disminuir (Maehly y Chance, 1956)

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H., "Catalase in vitro", Methods in Enzymology, 105, 121-126, **1984**.
- Garzón de la Mora, P., "Manual de prácticas de bioquímica" Proyecto VI, Condiciones óptimas para medir una actividad enzimática, 111-125, **2002**.
- Maehly, A. C., Chance, B., "The Assay of Catalases and Peroxidases", Methods of Bioquimical Analysis, 1, 357-424, **1956**.
- Rivas, G., López, L. A., Velasco, A., "Regresión no lineal", Revista Colombiana de Estadística, 14, 89-102, **1993**.