1 Título práctica de laboratorio:

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA CATALASA

2 OBJETIVOS

Generales:

- Determinar la actividad de la enzima catalasa extraída de sangre humana.

Específicos:

- Determinar el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.
- Realizar las gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.
- Comprender y determinar los valores de $V_{máx}$ y K_M de la enzima catalasa humana.
- Integrar los conceptos de cinética enzimática con el metabolismo.

3 REFERENTES CONCEPTUALES

Como referentes conceptuales los estudiantes deberán consultar los siguientes tópicos:

- ¿Qué es la velocidad de una reacción enzimática y como se afecta con la concentración del sustrato? Describa las tres posibles reacciones de un complejo ES.
- ¿Cómo se define la constante de Michaelis (K_M) de una reacción enzimática?
- ¿Cómo se define la velocidad máxima ($V_{máx}$) y la K_{cat} de una reacción enzimática?
- ¿Por qué a menudo se usa una gráfica de Lineweaver-Burk en vez de una de velocidad contra concentración de sustrato para determinar K_M y $V_{máx}$?
- ¿Que son los inhibidores enzimáticos y cómo funcionan?
- ¿Para qué le sirve a un médico la determinación de la actividad de algunas enzimas?

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos		Reactivos
1. Pipeta automática de 1000 µL.	1. Beaker de 50 mL.	Buffer fosfato 0,02 M pH 6,8.
1. Pipeta de 5 mL.	1. Beaker de 100 mL.	Solución de H_2O_2 en Buffer fosfato 0,02 M pH 6,8: 0,5; % 1%; 2%; 4%; 6%.
1. Pipeta de 10 mL.	1. Beaker de 500 mL.	Agua destilada desionizada.
2. Tubo de ensayo pequeño con tapón.	3. Erlenmeyers de 100 mL.	Solución de H_2SO_4 6 N.
7. Tubo de ensayo grande (16x160).	1. Soporte universal.	Solución de $KMnO_4$ 0,1 M.
1. Gradilla (para tubos grandes).	1. Baño maría.	Hielo.
1. Tubo con muestra de sangre con anticoagulante.	1. Pipeteador.	
	1. Bureta de 25mL.	
	1. Pinza para bureta.	

Materiales que debe traer el estudiante

- 1 Marcador indeleble
- Toallas absorbentes
- 1. Cronómetro

5 PROCEDIMIENTO

La actividad de la catalasa se medirá mediante titulación con permanganato de potasio del peróxido de hidrógeno no digerido por la enzima, para la realización de los cálculos se deberá tener la siguiente reacción:

$$2KMnO_4 + 5H_2O_2 + 3H_2SO_4 \longrightarrow 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 5O_2 + 8H_2O \quad \text{(Ec. 1)}$$

$$2MnSO_4 + 5H_2O_2 + 6H^+ \longrightarrow 5O_2 + Mn^{2+} + 8H_2O \quad \text{(Ec. 2)}$$

1. Preparación de la enzima

- En tubos de ensayo pequeño dispensar 3 mL de agua destilada pre-enfriada en hielo.
- Agregar 300 µL de sangre venosa fresca con anticoagulante, taponar los tubos y homogenizar las soluciones mezclando rápidamente por inversión.
- Adicionar 4 mL del buffer fosfato pH 6,8 a uno de los tubos y mezclar nuevamente el contenido de los dos tubos.
- Mantener los tubos en un beaker con hielo hasta que haya marcado y preparado los tubos donde se llevarán a cabo las reacciones.

2. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa

- Para determinar las constantes de actividad enzimática de la catalasa, prepare los tubos de reacción como se indica en la tabla 1.
- Calentar en el baño maría a 37 ˚C los tubos por 5 min. Cada medición debe ser independiente por lo tanto debe cronometrar por separado el tiempo de reacción (5 min) para cada tubo.

Tabla 1: Reacción enzimática de la catalasa con diferentes concentraciones de sustrato (H_2O_2)

Tubo No.	Enzima µL	3 mL de H_2O_2
1	250	0,5 %
2	250	1 %
3	250	2 %
4	250	4 %
5	250	5 %
6	250	6 %

- Pasado el tiempo de reacción, se agregan 1 mL el H_2SO_4 6 N en los tubos para detener la reacción. Mezclar suavemente por inversión.
- Tomar por separado 1 mL de cada reacción enzimática y colocarla en un erlenmeyer de 100 mL para titular el H_2O_2 remanente con el permanganato de potasio ($KMnO_4$) 0,1 M. Titular las seis reacciones enzimáticas anotando los mililitros de $KMnO_4$ gastados en cada una de ellas. La solución en medio ácido es estable por 30 minutos, por lo tanto las titulaciones deben realizarse dentro de ese lapso de tiempo. **El punto final es la aparición de color rosado con la primera gota de permanganato en exceso.**
  Nota: El color rosa se mantiene por más de un minuto después del punto final.

Realizar los cálculos correspondientes y completar la tabla 2 con los datos obtenidos. Realizar las gráficas de Michaelis-Menten y la gráfica de Lineweaver-Burk calcule las constantes enzimáticas $V_{máx}$ y K_M.

Tabla 2: Recopilación de datos experimentales.

	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
mL $KMnO_4$ gastados						
µmoles H_2O_2 inicial						
µmoles H_2O_2 residuales						
µmoles H_2O_2 descompuestas						
$[H_2O_2]$ inicial (µM)						
V_0 (µM/min)						
$1/[H_2O_2]$						
1/V						

6 PREGUNTAS DE PROFUNDIZACIÓN

1. ¿En qué procesos celulares se produce H_2O_2 y con qué mecanismos cuenta el organismo para controlar la formación de H_2O_2 y otros radicales libres?
2. ¿Qué son isoenzimas y que importancia presentan en clínica? Cite dos ejemplos.
3. Beber metanol puede producir ceguera al ser humano, así como acidosis grave potencialmente mortal. El metanol es tóxico debido a que en el hígado se convierte en formaldehído y ácido fórmico por las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa. El envenenamiento con metanol se trata con diálisis e infusiones de bicarbonato y etanol. Explique por qué se utiliza cada tratamiento. ¿Qué tipo de inhibición se presenta cuando se realiza el tratamiento con etanol?
4. Explicar el mecanismo de acción de la penicilina en la inhibición irreversible de la síntesis de la pared bacteriana.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Baynes J. Bioquímica Médica. 3a Ed. Editorial Elsevier. España; 2011.
2. Koolman J, Klaus-Heinrich Röhm K-H. Bioquímica Humana. 4 Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 2012.
3. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 6a Ed. Editorial Manual Moderno. México; 2007.
4. Pratt Ch. Bioquímica. 2 Ed. Editorial. Manual Moderno. México: 2008.