

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD Y LA ENERGIA DE
ACTIVACION DE LAS REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS MEMBRANALES

J. Antonio Pliego,
Depto. de Bioquímica,
Facultad de Medicina,
U. N. A. M.

Descripción matemática del efecto de la temperatura sobre las reacciones.

Hace largo tiempo que la predicción de la velocidad absoluta de las reacciones y del efecto de la temperatura sobre las mismas, ha sido un reto para los químicos teóricos, por ejemplo, el calcular el número de moléculas que reaccionan por segundo, conociendo sus propiedades físicas y las leyes que gobiernan su comportamiento. Para hacer lo anterior es necesario conocer, tanto los eventos que se llevan a cabo en la reacción misma, como los que la desencadenan y las fuerzas responsables de la estabilidad de los reactantes y los productos.

Para describir el cambio existente entre el estado inicial y el estado final de un equilibrio termodinámico, no es necesario tener un conocimiento tan detallado.

Las leyes fundamentales de la termodinámica se desarrollaron exitosamente sin un conocimiento detallado de la estructura atómica. Sin embargo, es imposible para dichas leyes de la termodinámica, el proveer una clave acerca del comportamiento temporal del proceso de equilibrio, bajo condiciones establecidas, esto es, describen la relación cuantitativa que existe entre la velocidad de la reacción en un sentido con respecto al otro en el momento en que el cociente de estas velocidades de reacción se hace constante (equilibrio). Dichas leyes, tam

bién describen la relación que existe entre la constante de equilibrio y la concentración relativa de reactivos y productos, la temperatura y la presión. Por lo tanto se ha tratado de desarrollar en los últimos años una teoría que describa la velocidad absoluta de las reacciones en función de la temperatura.

En el caso de las reacciones catalizadas por enzimas, el efecto de la temperatura sobre la velocidad se puede deber a diversos factores:

1. Inactivación térmica de la enzima (desnaturalización).
2. Alteración de la afinidad de la enzima por sustratos, inhibidores, activadores, cofactores, etc.
3. Alteración en la función de pH de los componentes de la reacción.

Si los cambios observados, no son debidos a ninguno de los factores anteriores, entonces, la velocidad de la reacción aumenta al incrementarse la temperatura.

Arrhenius en 1889 fué de los primeros teóricos que trataron de predecir la velocidad absoluta de las reacciones en función de la temperatura, desarrollando una ecuación empírica que relaciona la temperatura y la velocidad.

$$\ln k = \frac{E^\ddagger}{RT} + \ln A$$

donde k es la constante de velocidad de la reacción, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. La forma integrada de la ecuación 1, nos da que

$$\ln \frac{k_{T_1}}{k_{T_2}} = \frac{E^\ddagger}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad 2$$

donde se puede observar que el valor de la energía de activación (E^\ddagger), puede ser obtenido de la pendiente de la recta que resulta al graficar el \ln de la constante de velocidad contra el inverso de la temperatura absoluta.

$$\ln k_1 = \frac{E^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \ln k_2 \quad 3$$

El coeficiente de temperatura Q_{10} con el que frecuentemente se describe el efecto de la temperatura sobre las reacciones enzimáticas y que es el factor por el cual la velocidad de la reacción se incrementa al elevar la temperatura 10°C , se relaciona con la E^\ddagger de la siguiente manera:

$$Q_{10} = e^{\frac{10 E^\ddagger}{RT^2}} \quad 4$$

El valor del coeficiente de temperatura Q_{10} , para reacciones enzimáticas por lo general fluctúa entre 1 y 2.

La forma de la ecuación de Arrhenius que describe la velocidad de la reacción a cualquier temperatura.

$$V = A e^{-\frac{E^\ddagger}{RT}} \quad 5$$

donde v representa la velocidad observada, $R=1.98646 \text{ cal, } ^\circ\text{K}^{-1}$, mol^{-1} y T la temperatura absoluta en que se observó v , contiene dos constantes: E^\ddagger , que obviamente está relacionada con la energía de acti

vación de las moléculas en el sistema y A, cuyo significado es poco preciso.

La ecuación de Arrhenius ha demostrado con la mayoría de las reacciones químicas que es suficiente para describir las velocidades relativas a diferentes temperaturas y frecuentemente con gran exactitud. Sin embargo existen algunas excepciones, sobre todo si el rango de temperatura es lo suficientemente grande, en que se pierde la linealidad esperada para valores constantes de A y E^\ddagger . Por lo tanto el desarrollo posterior de la teoría cinética de las reacciones, tuvo como objetivo principal la elucidación del significado de A y E^\ddagger .

La teoría de Colisiones, aunque incompleta, representó un avance notable en el enfoque estadístico del problema. Su origen al igual que muchas otras teorías magníficas, no se puede adjudicar a un trabajo en particular; fueron gentes como Hinshelwood 1933-1940, Fowler y Guggenheim, 1939; Moelwyn-Hughes, 1932, 1933, 1947; Glasstone, Laidler, Eyring, 1941 y Laidler, 1950; los que contribuyeron al desarrollo de esta teoría. La suposición básica de esta teoría, es que la velocidad de las reacciones, depende de la frecuencia con la cual chocan las moléculas con una energía igual o superior a la energía de activación. En base a la teoría cinética de los gases, el número de colisiones Z que suceden entre dos especies, A y B de moléculas gaseosas está dado por,

$$Z = n_A n_B (r_A + r_B)^2 \left\{ 8\pi kT \left(\frac{1}{m_A} + \frac{1}{m_B} \right) \right\}^{\frac{1}{2}} \quad 6$$

en donde n representa la concentración, r el radio principal de colisión y m la masa; k es la constante de Boltzman.

Si sustituimos el valor de A por Z en la ecuación 5, tenemos que:

$$v = Z e^{\frac{-E^\ddagger}{RT}} \quad 7$$

El número de colisiones de dos moléculas A y B a una temperatura dada puede ser fácilmente calculado en base a la concentración de las mismas y de sus masas y radios de colisión.

Sin embargo la ecuación 7 no puede predecir con exactitud la velocidad a diferentes temperaturas, esto es, las velocidades calculadas difieren varios órdenes de magnitud de las velocidades observadas, por lo tanto está incompleta por lo menos en dos cosas: 1) El factor de colisión Z lleva a resultados aproximadamente buenos solo en un número restringido de reacciones y 2) la energía de activación E^\ddagger no tiene un significado teórico preciso. Dejando por un momento el significado preciso de E^\ddagger , es claro que se puede hacer coincidir la ecuación 7 con los datos observados, simplemente multiplicando Z por un factor P.

Es razonable suponer que entre reacciones que suceden a velocidades mucho más lentas que las calculadas con la ecuación 7, debería existir un cierto impedimento para que el número de colisiones exitosas no sea el esperado. Por lo tanto, si consideramos a P como el factor de "probabilidad" o estérico tendremos,

$$v = P Z e^{\frac{-E^\ddagger}{RT}} \quad 8$$

Para reacciones "lentas" el valor de P varía de 10^{-1} a 10^{-8} , mientras que en algunas otras circunstancias el valor de P es mucho mayor que la unidad. Lo que es más, si P de la ecuación 8 se considera una constante, las variaciones observadas en E^\ddagger quedan sin una explicación.

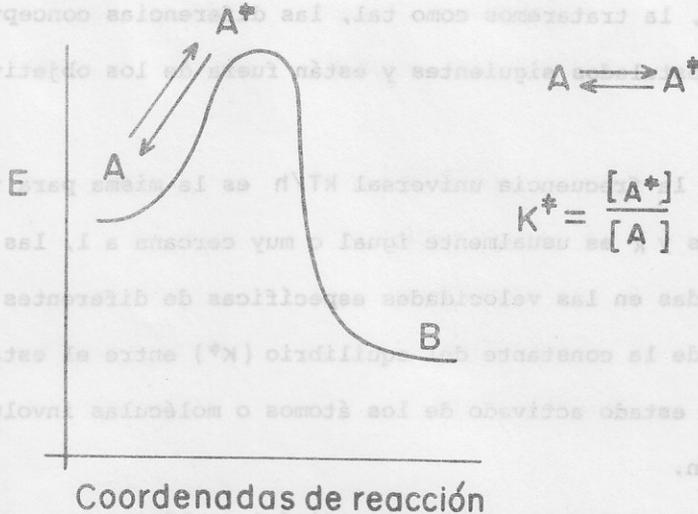
El valor de Z cambia con la temperatura, ya que la ecuación 6 que describe a Z contiene el término $T^{\frac{1}{2}}$, sin embargo dicho término tiene poca influencia, contribuyendo cuando mucho con 300 cal. en el valor numérico de E^* .

En sus comienzos la teoría de colisiones evolucionó con una falta de conocimiento sobre las energías potenciales de las moléculas, ya que los átomos fueron tratados como esferas duras o puntos con masa y en gran parte las moléculas fueron tratadas de la misma manera, por lo tanto la aplicación de la teoría de colisiones, solo fué exitosa en aquellos casos en que en efecto las moléculas se comportan como esferas duras. Las discrepancias entre la velocidad observada y la predicha, se atribufan a la falta de certeza en la medición de los radios moleculares. Con el avance del conocimiento de la estructura atómica y de las fuerzas que mantienen unidas a las moléculas o que las inducen a reaccionar, en general todo el panorama se volvió mucho más claro y la imagen detallada de la energía potencial de los átomos y moléculas, se volvió una consideración fundamental en el estudio de la cinética de las reacciones.

La teoría moderna de las velocidades absolutas de reacción, tomó un significado más preciso en 1935 cuando hallazgos de muchos investigadores que contribuyeron enormemente con sus estudios en los campos de la mecánica clásica, cuántica y estadística, así como en la química y la física, fueron integrados en la teoría general del Complejo Activado por H. Eyring (1).

En esencia esta teoría sostiene que cualquier proceso cinético elemental de velocidad, cualquiera que sea su naturaleza, difusión, solubilidad, oxidación, hidrólisis, muchos tipos de excitación molecular,

lubricación, etc. se puede tratar como una situación de equilibrio inestable entre los reactantes en su estado basal o normal y el "Complejo Activado" (reactantes en el estado activado).



El complejo activado es una molécula intermediaria con una vida media de alrededor de 10^{-13} seg. Una vez formado se descompone con una frecuencia universal kT/h que es constante para todas las reacciones, y donde k es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y h la constante de Planck. La probabilidad de que el complejo activado se descomponga en productos, se designa con el coeficiente de transmisión k que frecuentemente es igual a 1. Por lo tanto en cualquier reacción, la constante de velocidad específica k se calcula en base a la consideración de un cuasi equilibrio existente entre el estado normal y el activado de los reactantes (designado por la constante K^\ddagger) y la frecuencia de descomposición del complejo activado multiplicado por la probabilidad de que éste se descomponga hacia productos:

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) K^\ddagger \quad 9$$

Como para fines prácticos K^\ddagger se comporta como una constante de equilibrio, la trataremos como tal, las diferencias conceptuales no alteran los postulados siguientes y están fuera de los objetivos de este trabajo.

Dado que la frecuencia universal $k_B T/h$ es la misma para todas las reacciones y k es usualmente igual o muy cercana a 1, las diferencias encontradas en las velocidades específicas de diferentes reacciones dependen de la constante del equilibrio (K^\ddagger) entre el estado basal o normal y el estado activado de los átomos o moléculas involucrados en la reacción.

Sabemos por las leyes de la termodinámica clásica que una constante de equilibrio se relaciona con la energía libre de la siguiente manera:

$$K^\ddagger = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad 10$$

siendo ΔG^\ddagger la energía libre de activación que a su vez está definida como:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger \quad 11$$

donde ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger son las entalpías y entropías de activación respectivamente. Por lo tanto si combinamos las ecuaciones 9, 10 y 11 tendremos que,

$$k = \left(\frac{k k T}{h} \right) e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad 12$$

Si recordamos las ecuaciones 5 de Arrhenius y 8 de la teoría de colisiones podremos observar la relación que guardan con esta nueva ecuación de la teoría del complejo activado. Si observamos bien nos daremos cuenta que la entalpia de activación ΔH^\ddagger es en cierta forma equivalente a la energía de activación E^\ddagger postulada por las teorías anteriores, sin embargo no es absolutamente igual ya que

$$\Delta H = E^\ddagger - nRT \quad 13$$

donde n es el orden de la reacción, por lo que la constante A de Arrhenius o el producto PZ de la teoría de colisiones serán:

$$A = PZ = \left(\frac{k k T}{h} \right) e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^n \quad 13a$$

Así pues con la teoría de Eyring, el significado físico de las constantes A y E^\ddagger de Arrhenius adquiere una claridad no encontrada en la teoría de colisiones, por lo que la información adquirida a partir de la aplicación de esta teoría a los datos experimentales se rá mucho más indicativa de los mecanismos que son responsables de la cinética química. La manera más práctica y exacta de encontrar

ΔS^\ddagger y ΔH^\ddagger será graficando ΔG^\ddagger contra la temperatura absoluta, ya que ΔG^\ddagger se puede calcular para cada temperatura a partir de la constante de velocidad k de la siguiente manera:

sabemos de la ecuación 9 que,

$$K^\ddagger = \frac{k}{\left(\frac{kT}{h}\right)}$$

y de la ecuación 10 que,

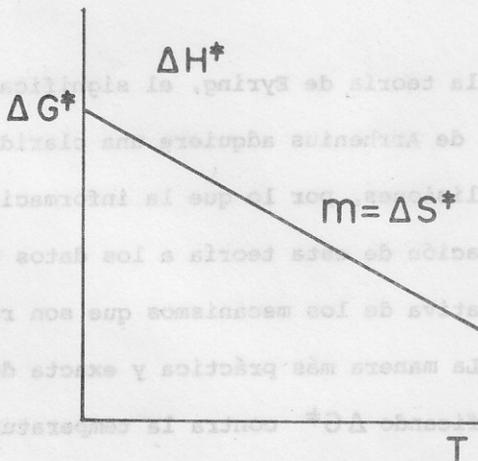
$$K^\ddagger = e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}}$$

por lo que,

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{k}{\frac{kT}{h}} \right) \quad 14$$

Con gráficas de la forma antes mencionada se obtendrá una línea recta

(ec. 11) cuya pendiente será $-\Delta S^\ddagger$ y cuya ordenada al origen será ΔH^\ddagger



Comportamiento de las Enzimas Membranales con la Temperatura.

Aunque la mayoría de las reacciones catalizadas por enzimas muestran tener una energía de activación (E^\ddagger) constante dentro de un intervalo limitado de temperaturas (0-50°C), existen reportes en donde se prueba que un considerable número de reacciones muestran dos pendientes en las gráficas de Arrhenius, esto es, una discontinuidad o cambio en la E^\ddagger a una temperatura definida. El fenómeno anterior se repite principalmente cuando las enzimas involucradas están asociadas fuertemente a membranas; lo cual sugiere claramente que en la mayoría de los casos el cambio en la E^\ddagger debe estar asociado de alguna manera a cambios en las propiedades físicas de las membranas.

Por otro lado, reportes recientes, demuestran que enzimas o sistemas multienzimáticos pueden exhibir una E^\ddagger constante o una que cambia a una temperatura dada, dependiendo de la especie del vegetal o animal del cual provengan. En algunos casos inclusive ha sido posible relacionar directamente el cambio en E^\ddagger con una alteración de las propiedades físicas de los lípidos membranales.

Lo anterior tiene serias implicaciones en la fisiología de los vegetales y animales que viven a diferentes temperaturas ambientales.

Raison (2) ha señalado que existe una diferencia fundamental en el comportamiento de fenómenos que están íntimamente ligados a membranas entre el grupo de los animales homeotermos y plantas sensibles al frío y el de los animales poiquilotermos y las plantas resistentes al frío. Dichos fenómenos membranales pueden ser la catálisis de una enzima, el transporte (cualquier tipo) o la biosíntesis de proteínas en polisomas. El primer grupo de organismos, presenta cambios en el esta

do físico de sus membranas a ciertas temperaturas "críticas" dentro de la zona de temperaturas llamada fisiológica (0-50°C), lo cual se refleja en la E^{\ddagger} del fenómeno membranal que se tenga en observación, la E^{\ddagger} es marcadamente diferente antes y después de la temperatura "crítica" del cambio. Por el contrario el segundo grupo de organismos al no presentar cambio físico alguno en sus membranas, conserva la misma E^{\ddagger} a lo largo del mismo intervalo de temperaturas, para el mismo tipo de fenómenos membranales.

Lo anterior señala diferencias sorprendentes en el comportamiento y regulación metabólicos con respecto a las temperaturas en que se desenvuelven dichos organismos; en el primero, un cambio en el Q_{10} de sus enzimas membranales, implica un tremendo desbalance en las concentraciones de metabolitos antes y después del sitio de la vía metabólica en la que se encuentre la enzima membranal. Lo anterior, es importante sobre todo en los vegetales, que al no poder desplazarse, están limitados a ciertos habitats donde la variación de la temperatura no sea extremosa. En los homeotermos, no tiene importancia aparente ya que las temperaturas a las cuales se registran los cambios en E^{\ddagger} por lo general están a temperaturas inferiores a la temperatura corporal.

Lyons et al, (3) encontraron que existe una mayor proporción de ácidos grasos saturados en las plantas sensibles al frío con respecto a las resistentes al frío, mostrando también que un cambio de tan solo el 5% en la cantidad de ácidos grasos insaturados en mezclas artificiales de ácidos grasos con una composición que se aproxima a la de membranas mitocondriales de vegetal, puede cambiar la temperatura de solidificación de las mezclas de lípidos hasta en 15°C. También

se ha reportado que existe una proporción mayor de ácidos grasos insaturados en las mitocondrias de animales poiquiloterms con respecto a los homeoterms (4-5). Existe pues una bien definida correlación entre el estado de fluidez de las "colas" de hidrocarburo de los lípidos membranales con el incremento de insaturación en los mismos y la temperatura ambiente a la cual funcionan las membranas del organismo en particular.

Los estudios que son más representativos de lo antes expuesto, son aquellos llevados a cabo con bacterias en donde es posible manejar in vivo la composición de los ácidos grasos de las membranas y por lo tanto modificar de esta manera las temperaturas a las cuales se observan los cambios en la E^{\ddagger} (6-9).

REFERENCIAS

1. Johnson, F.H., Eyring, H., Polissar, M.J. (1954) " The Kinetic Basis of Molecular Biology," John Wiley and Sons, Inc, New York.
2. Raison, J.K. (1973) Bioenergetics , 4, 285.
3. Lyons, J.M., Wheaton, T.A. and Pratt, H.K. (1964) Plant Physiol, 39, 262.
4. Richardson, T. and Tappel, A.L. (1962) J. Cell. Biol. , 13, 43.
5. Richardson, T., Tappel, A.L. and Grager, E.H. (1961) Arch. - Biochem. Biophys , 94, 1.
6. Overath, P., Schairer, H.U., and Stoffel, W., (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 606.
7. Mavis, R.D. and Vagelos P.R. (1972) J. Biol. Chem., 247,652.
8. Linden, C.D., Wright, K.L. Mc Connell, H.M., and Fox, C.F., (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 70, 2271.
9. Singh, A.P. and Bragg P.D., (1975) J. Bioenergetics, 7, 175.