



PROBLEMES I QÜESTIONS DE BIOQUÍMICA

GRAU EN BIOLOGIA

- 1. Solucions tampó*
- 2. Estructura i funció de proteïnes*
- 3. Enzimologia*
- 4. Estructura i funció d'àcids nucleics*
- 5. Bioenergètica*
- 6. Metabolisme*

Bibliografia

- Balcavage, W. X. i King, M. W.n (1995): *Examination & Board Review. Biochemistry*. Appleton & Lange.
- Cárdenas, J. i altres (1988): *Problemas de bioquímica*. Alhambra.
- De Arriaga, M. D. i altres (1998): *Manual de ejercicios de cinética enzimática*. Universidad de León.
- Gumport, R. I. i altres (1990): *Student's companion to Stryer's Biochemistry*. Freeman.
- Lindquist, R. N. (1991): *Bioquímica. Problemas*. McGraw-Hill Interamericana.
- Lozano, J. A. i altres (1997): *Preguntas y respuestas de bioquímica*. McGraw-Hill Interamericana.
- Macarulla, J. M. i Marino, A. (1988): *Bioquímica cuantitativa. I. Cuestiones sobre Biomoléculas*. Reverté.
- Morán, L. A. i Scrimgeour, K. G. (1994): *Biochemistry. Resouce Book*. Neil Patterson.
- Ruiz, M. (coord.) (1992): *Bioquímica estructural. Conceptos fundamentales y 383 tests con respuesta razonada*. Tebar Flores.
- Van Eireken, P. (1987): *Guía de principios de bioquímica de Lehninger con soluciones de los problemas*. Omega.

1. Solucions tampó

[Atenció: al final del document, en l'annex I, teniu una breu descripció dels fonaments i de les equacions que governen els equilibris àcid-base. També hi trobareu, com a exemples, explicacions de com resoldre alguns problemes. Aquest material pot ajudar-vos a la resolució dels problemes sobre solucions tampó.]

1.1.- Calculeu les concentracions de les espècies del tampó àcid acètic/acetat sòdic 0,1 M, pH 5,0.

Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [$CH_3COOH = 0,0365$ M i $CH_3COO^- = 0,0635$ M]

1.2.- Disposeu d'una solució tampó àcid acètic/acetat sòdic en què les concentracions de les dues espècies són: 0,065 M d'àcid acètic i 0,035 M d'acetat. Calculeu:

(a) El pH de la solució.

(b) La concentració de la substància tampó.

Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [(a) pH 4,49 i (b) 0,1 M]

1.3.- S'ha preparat una solució tampó mesclant 0,013 mol d'àcid acètic, 0,007 mol d'acetat sòdic i aigua fins a 200 mL.

(a) Quin és el pH d'aquesta solució?

(b) I la seua concentració?

(c) Es veurien afectats la concentració i/o el pH del tampó si el volum final fóra 1 L en comptes de 200 mL?

Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [(a) pH 4,49; (b) 0,1 M; (c) la concentració canvia: 0,020 M; però no el pH]

1.4.- Com preparariéu 1 L de solució tampó àcid acètic/acetat sòdic 0,1 M, pH 5,0, a partir d'àcid acètic glacial (17,5 M) i acetat sòdic sòlid (Mr 82,03)?

Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [àcid acètic 2,06 mL, acetat sòdic 5,25 g i aigua fins 1 L]

1.5.- Quin és el pH d'una solució preparada mesclant 0,74 mL d'àcid acètic glacial (17,5 M), 0,58 g d'acetat sòdic sòlid (Mr 82,03) i aigua fins a 200 mL?

Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [pH 4,49]

1.6.- Quin és el pH d'una solució preparada mesclant 1,15 mL d'àcid acètic glacial (17,5 M), 0,28 g de NaOH sòlid (Mr 40) i aigua fins a 200 mL? Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [pH 4,49]

1.7.- L'àcid acètic té un pK_a al voltant de 4,7. Les següents solucions tampó d'acetat de pH 4,7: (A) 1 mM, (B) 10 mM i (C) 100 mM:

(a) Ordeneu-les de major a menor capacitat per amortir els canvis de pH resultants de l'addició de H^+ .

- (b) Quina quantitat de H^+ serien capaces d'amortir 100 mL de cadascuna de les tres solucions?
- (c) Si aquestes solucions foren més àcides que pH 4,7, tindrien més o menys capacitat amortidora de H^+ ? I si el pH fóra més alt que 4,7?
- (d) Discussiu les qüestions anteriors en el cas de l'addició de OH^- .

[(a) $C > B > A$; (b) A: 0,05 mmol; B: 0,5 i C: 5]

1.8.- El pH intern d'una cèl·lula hepàtica és 6,65. Calculeu les concentracions de les espècies components del tampó fosfat si la concentració total de fosfat en el fetge és de 30 mM. Pot, en aquestes condicions, el tampó fosfat actuar com a tampó? Per què? En cas afirmatiu, a quin pH presentaria la màxima capacitat tampó? Dades: àcid fosfòric pK_{a1} 2,12; pK_{a2} 6,90 i pK_{a3} 12,67. [fosfat monoprotic 10,78 mM; fosfat biprotic 19,22 mM; si $pH = pK_a \pm 1$; $pH = pK_{a2} = 6,90$]

1.9.- El Tris cristal·lí es pot comprar en la forma que té el grup amino lliure $[(HOCH_2)_3CNH_2]$; Mr 121] o com a clorhidrat $[(HOCH_2)_3CNH_3^+Cl^-]$; Mr 157,5].

- (a) Si en el laboratori només tenim la sal i solucions de HCl 1 M i de NaOH 1 M, de quina manera preparariem 250 mL d'una solució tampó Tris 0,1 M pH 8,5? (pK_a Tris 8,1).
- (b) Si tinguérem la forma de Tris que té el grup amino lliure, el tampó l'hauríem preparat de la mateixa manera o no? Per què?
- (c) La capacitat tampó de la solució Tris 0,1 M pH 8,5 és la mateixa si es prepara el tampó de qualsevol de les dues maneres o no?

[(a) 3,94 g $Tris^+Cl^-$, 17,5 mL NaOH 1 M i aigua q. s. per a 250 mL, (b) no, hauria utilitzat HCl, perquè: $Tris^0 + H^+ \rightarrow Tris^+$; (c) sí]

1.10.- Descriviu la preparació d'1 L de tampó fosfat potàssic 0,045 M pH 7,5 partint de:

- (a) fosfat monopotàssic (136 Da) i fosfat bipotàssic (174 Da);
- (b) solucions 0,045 M dels dos fosfats anteriors;
- (c) àcid fosfòric 15 M i KOH 1,5 M;
- (d) fosfat monopotàssic i KOH sòlid (56 Da);
- (e) fosfat bipotàssic i HCl 2 M;
- (f) fosfat tripotàssic (212 Da) i HCl 2 M.

Dades: els pK_a de l'àcid fosfòric són: 2,1; 6,9 i 12,3.

[Completant amb aigua fins a 1 L, el tampó contindrà: (a) 6,264 g bipotàssic i 1,224 g monopotàssic; (b) 0,8 L bipotàssic i 0,2 L monopotàssic; (c) 3 mL fosfòric i 54 mL KOH; (d) 6,12 g monopotàssic i 2,02 g KOH sòlid; (e) 7,83 g bipotàssic i 4,5 mL HCl 2 M; (f) 9,54 g tripotàssic i 27 mL HCl 2 M]

1.11.- Ismael i David són dos estudiants de segon curs que estan realitzant les pràctiques. En una de les sessions prepararen una solució tampó acetat sòdic prenent 9,5 mL d'àcid acètic, 3,8 g de NaOH i aigua fins a 1 litre.

(a) Quina és la concentració del tampó que prepararen? I el pH?

Durant la preparació de la solució tampó, un d'ells, per error, afegí 20 mL d'àcid clorhídric 1 M. Ismael suggerí que no importava molt i va dir: “bah, al cap i a la fi, com que es tracta d'una solució amortidora, el pH no variarà”. En canvi, l'opinió de David era ben diferent: “com que el HCl és un àcid fort, segur que el pH de la solució tampó disminueix”.

(b) Quin dels dos estudiants té raó? Per què? Calculeu el canvi de pH, si penseu que se n'ha produït una variació.

Dades: àcid acètic (Mr 60,05; densitat 1,05 g/mL, 17,5 M; pK_a 4,75); hidròxid sòdic Mr 40. [(a) 0,166 M, pH 4,88; (b) pH 4,66]

1.12.- Hom pretén estudiar *in vitro* la reacció enzimàtica catalitzada per l'enzim glucoquinasa de fetge de rata:



Per tal de mantenir el pH al voltant de 7,6, que és l'òptim de l'enzim, disposem de dos tampons diferents: fosfat 0,2 M pH 7,6 i Tris 0,2 M pH 7,6. Durant la reacció es produeixen 0,04 equivalents de H⁺/L. Quin és el tampó més adient per mantenir les condicions de la reacció més properes a les òptimes? Per què? Calculeu el pH de cadascun dels tampons al final de la reacció.

Dades: pK_{a2} de l'àcid fosfòric = 6,9; pK_a del Tris = 8,1. [Fosfat pH 7,14; Tris pH 6,72]

1.13.- S'ha preparat una solució tampó HEPES (pK_a= 7,5) dissolent en aigua 0,012 mol de la substància zwitteriònica HEPES i 0,038 mol de la substància aniònica HEPES, en un volum final d'1 L. Calculeu el pH i la concentració d'aquest tampó. Es veurien afectades la concentració i el pH del tampó si el volum final fóra de 2 L en lloc d'1 L? [pH 8,0]

1.14.- Una de les pràctiques de l'assignatura de Bioquímica consisteix en l'extracció de la caseïna de la llet per precipitació isoelèctrica. La llet es tampona a un valor de pH prop del pI de la proteïna. Açò es fa afegint 5 mL d'acetat sòdic 0,5 M i 5 mL d'àcid acètic 0,6 M a 60 mL de llet.

(a) Quines substàncies actuen com a tampó?

(b) Quines són les concentracions de les formes protonada i desprotonada de l'àcid acètic presents en el tampó?

(c) Quin és el valor de pH al qual s'aconsegueix tamponar la solució?

Dada: pK_a àcid acètic 4,76. [(b) acetat 36 mM, acètic 43 mM; (c) pH 4,68]

1.15.- De quina manera preparariéu 100 mL d'una solució Tris 0,1 M, pH 7,9 ($pK_a = 8,1$) a partir dels dos productes sòlids (Tris^0 , Mr 121 i Tris^+Cl^- , Mr 157,5)? Feu els càlculs adients.

- Quines són les concentracions de les dues formes del Tris presents en aquest tampó?
- Quin valor de pH tindrà el tampó després d'haver-se usat per dur a terme una reacció en la qual es produeixen 0,01 equivalents de H^+ per litre de solució?

[(a) 0,061 M del protonat i 0,039 M del neutre; (b) pH 7,71]

1.16.- Una solució tampó es preparà de la manera següent: 4,035 g de la forma protonada d'un parell àcid-base es dissolgueren en aigua, s'hi afegiren 25 mL de NaOH 1 M i aigua fins que es completà un volum final de 250 mL.

- Quina és la concentració de la substància tampó?
- Quines són les concentracions de les formes protonada i desprotonada presents en el tampó?
- Quin és el valor de pH del tampó preparat?
- Les solucions tampó són capaces d'amortir els canvis de pH ocasionats per qualsevol quantitat d'àcid? Per què?

Dades: Mr de la substància protonada = 134,5; $pK_a = 6,0$. [(a) 0,15 M; (b) 0,020 M de la protonada i 0,100 M de la desprotonada; (c) pH 6,7]

1.17.- Heu de preparar una solució tampó fosfat 0,1 M de pH 7,5. Al laboratori teniu: H_3PO_4 0,1 M, NaH_2PO_4 0,1 M, Na_2HPO_4 0,1 M i Na_3PO_4 0,1 M.

- De quines solucions us serviríeu per fer-ne el tampó? Justifiqueu la resposta.
- Les distintes espècies iòniques majoritàries de fosfat estaran presents en el tampó en quantitats equivalents? En cas contrari, quina predominarà? Justifiqueu la resposta.
- Calculeu les concentracions d'aquestes espècies iòniques.
- Quins volums de les solucions 0,1 M agafariéu per obtenir 1 L del tampó 0,1 M pH 7,5?

Dades: els pK_a de l'àcid fosfòric són: 2,1; 6,9 i 12,3. [(c) 0,08 M del fosfat disòdic i 0,02 M del fosfat monosòdic; (d) 0,8 L de fosfat disòdic i 0,2 L del monosòdic]

1.18. Disposeu de les solucions d'àcid acètic 0,20 M i d'acetat sòdic 0,15 M.

- Com preparariéu 200 mL de solució tampó 0,1 M pH 4,9?
- Suposant que durant la preparació de la solució amortidora les etiquetes que identificaven les solucions s'intercanviaren, quin valor de pH tindria

la solució? Quines serien les concentracions de les espècies iòniques del tampó?

- (c) La solució final, és tan bon tampó com la que s'hauria obtingut en el cas que no es canviaren les etiquetes? Justifiquen la resposta.

Dades: pK_a de l'àcid acètic 4,76. [(a) 77 mL d'acetat, 42 mL d'acètic i aigua fins 200 mL; (b) 4,37; (c) No.]

1.19. Per tal d'estudiar la cinètica d'una reacció enzimàtica en la qual es produeixen OH^- es necessita preparar un tampó fosfat 0,1 M pH 7,1.

- (a) Descriviu la preparació de 100 mL d'aquesta solució tampó a partir de fosfat monopotàssic (Mr 136) i de fosfat bipotàssic (Mr 174). Preneu 6,9 com a valor de pK_{a2} de l'àcid fosfòric.
- (b) Calculeu el valor de pH del medi al final de la reacció considerant que es produeixen 0,01 equivalents de OH^- per litre.
- (c) Resulta adequat aquest tampó per a les condicions de reacció indicades anteriorment?

[1,06 g de fosfat bipotàssic i 0,53 g de fosfat monopotàssic; pH 7,28; ΔpH 0,18, sí que és adequat]

1.20. Es necessiten 250 mL d'una solució tampó fosfat 0,15 M pH 7,0. Al laboratori tenim fosfat monopotàssic (Mr 136) i solucions 1 M de HCl i de NaOH.

- (a) Descriviu la preparació d'aquest tampó.
- (b) Si, per error, les solucions d'àcid i de base forta foren 1,5 M en lloc d'1,0 M, la concentració total de la substància tampó seria la mateixa? I el pH? Calculeu-ho.

Dades: àcid fosfòric, pK_{a1} 2,12; pK_{a2} 6,90 i pK_{a3} 12,67. [(a) 5,1 g de fosfat monopotàssic; 21 mL NaOH 1M i aigua fins a 250 mL; (b) mateixa concentració, pH 7,62]

1.21.- Les molècules hidrofòbiques són capaces de travessar les membranes cel·lulars, a l'estómac i l'intestí, i passar al torrent circulatori. Per contra, en general, les molècules amb càrrega o hidrofíliques no són absorbides amb tanta rapidesa a través de les membranes. Es pot predir si un fàrmac pres per via oral s'absorbirà ràpidament a l'estómac (pH 1,0-2,0) o bé passarà a l'intestí (pH major) abans que pugui ser absorbit. Per exemple, l'ambucetamida usada com a droga antiespasmòdica presenta un pK_a de 8,4 per a la ionització del grup amino que posseeix.

- (a) On s'absorbirà millor l'ambucetamida: en l'estómac, en la porció inicial de l'intestí (pH 5,0) o en la final (pH 8,0) de l'intestí?
- (b) I l'aspirina, la qual és un àcid carboxílic feble amb un pK_a de 3,5?

2. Estructura i funció de proteïnes

2.1.- El aminoàcid contenen grups dissociables i poden ser utilitzats com a substàncies amortidores de pH. Descriviu la preparació de 500 mL de solució tampó glicina de concentració 0,1 M i pH 3,0 a partir de:

(a) La sal sòlida de clorhidrat de glicina ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH}\cdot\text{Cl}^-$; Mr 110,45) i NaOH sòlid (Mr 40).

(b) La sal glicinat sòdic ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-\cdot\text{Na}^+$; Mr 98) i HCl 1 M.

(c) Glicina isoelectrica sòlida ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$; Mr 75) i HCl 1 M.

Dades: pK_{a1} 2,34; pK_{a2} 9,60. [(a) 5,52 g de clorhidrat de glicina, 1,169 g de NaOH i aigua fins 500 mL; (b) 4,9 g glicinat sòdic, 59 mL HCl 1 M i aigua fins 500 mL; (c) 3,75 g glicina, 9 mL HCl 1 M i aigua fins 500 mL]

2.2.- El valor de pK_a del grup imidazole de la histidina és 6,0. A pH 7,0, quin percentatge de molècules d'histidina tindran protonat el grup imidazole? Si la concentració de la histidina en la solució de pH 7,0 és 15 mM, quin volum de HCl 1 M hauria d'afegir-se a 1 litre de solució per arribar al 90 % de les molècules amb el grup imidazole amb càrrega? Quin valor de pH tindria la solució després d'afegir HCl? [His⁺⁺- 9,09 %; 12,14 mL; pH 5,05]

2.3.- Es disposa de 500 mL d'una solució de clorhidrat d'histidina 0,1 M, pH 1,8. Determineu el volum de KOH 0,4 M que és necessari afegir a la solució d'histidina per a que el seu pH siga 9,2. La solució final, tindria capacitat tampó? Perquè? Quina seria la concentració en histidina? [0,25 L; si; 0,1 M]

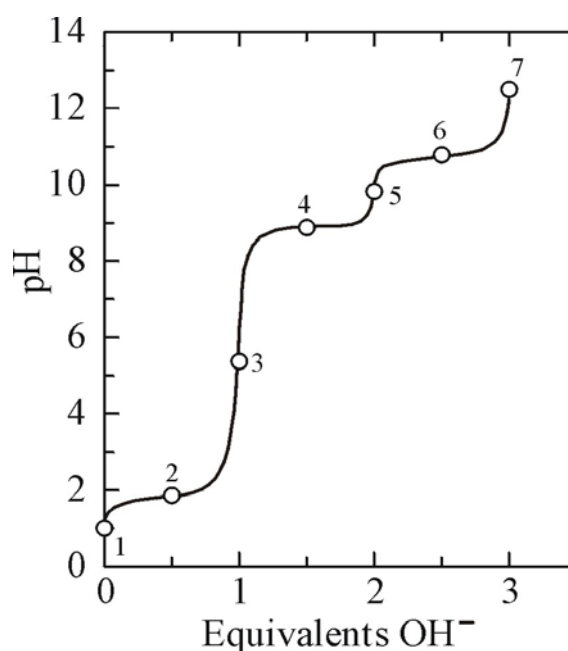
2.4.- La figura mostra la corba de valoració de la cisteïna amb un cert nombre de punts indicats (d'1 a 7). Els valors de pK_a d'aquest aminoàcid són 1,86 (-COOH), 8,88 (-SH) i 10,78 (-NH₃⁺).

(a) Escriviu l'estructura química de la molècula en cadascun dels estats d'ionització (des de la forma més protonada a la totalment desprotonada);

(b) identifiqueu els punts de la corba de valoració que corresponen a cadascuna de les quatre espècies majoritàries;

(c) identifiqueu els punts en què la càrrega neta mitja de la cisteïna és +1, +0,5, 0 i -2;

(d) identifiqueu el punt per al qual el pH és igual al pK_a del grup -SH;



- (e) identifiqueu el punt en què el grup -SH està totalment valorat;
 (f) en quin rang de pH la cisteïna es comporta com un bon tampó?

2.5.- Indiqueu la càrrega neta (+, zero, -) de Gly, Asp, Lys i His a pH: 1; 2,1; 4 i 10. [Els resultats es mostren en la Taula.]

	pH 1	pH 2,1	pH 4	pH 10
Gly	1+	0,6+	0,01+	0,72-
Asp	1+	0,5+	0,6-	1,65-
Lys	2+	1,5+	1,01+	0,23-
His	1,9+	1,3+	0,99+	0,87-

2.6.- El grup γ -COOH del Glu té un pK_a de 4,3.

- (a) Quina fracció d'aquests grups es trobarà sense protonar en una solució diluïda de pH 5,0?
 (b) I de pH 3,8?
 (c) Expliqueu per què aquest pK_a és més alt que el pK_a del α -COOH.

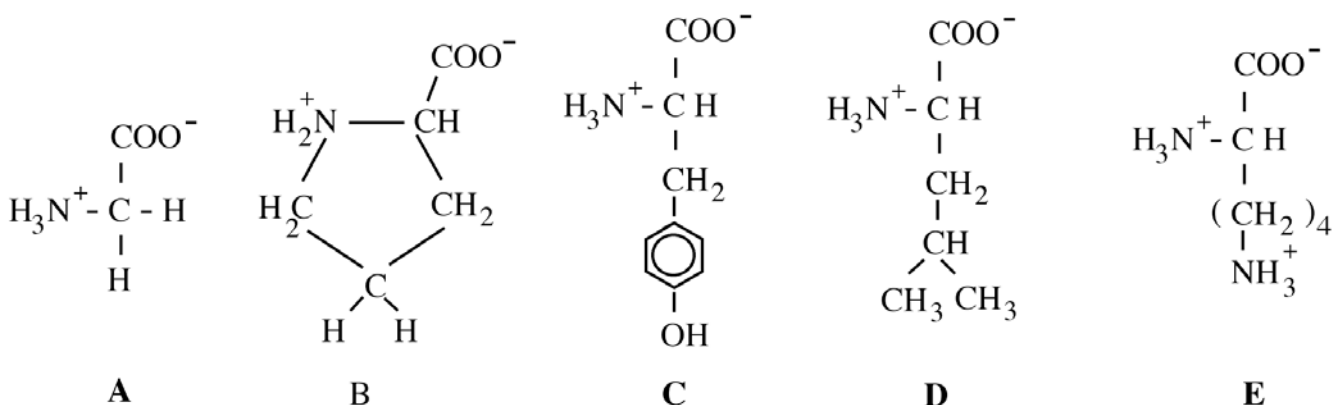
[83 % Glu^- a pH 5,0 i 24 % Glu^- a pH 3,8]

2.7.- Disposem de 1 mmol del pèptid Gly-Asp-Trp-Lys dissolt a pH 6,0.

- (a) Formuleu l'estructura de la forma iònica predominant.
 (b) Quants mL de NaOH 0,1 M es necessitarien per a passar el pèptid a la forma predominant a pH 12,5?

Dades: $pK_{a\alpha}\text{-NH}_3^+$ 9,6; $pK_{a\beta}\text{-COOH}$ 3,65; $pK_{a\varepsilon}\text{-NH}_3^+$ 10,35; $pK_{a\alpha}\text{-COOH}$ 2,18. [(b) 20 mL]

2.8.- Dels cinc aminoàcids que es representen, indiqueu quins es poden relacionar amb les frases següents:



- (a) Cadena lateral alifàtica.
 (b) Cadena lateral bàsica.
 (c) Tres grups ionitzables.
 (d) Grup amino secundari.
 (e) Càrrega +1 a pH 7,0.
 (f) pK_a aproximadament 10.

- (g) Càrrega -1 a pH 13.
- (h) Ordeneu de major a menor hidrofobicitat.
- (i) Interval de pH on predomina cadascuna de les formes representades.
- (j) pI similar al pH fisiològic (± 1 unitat de pH).
- (k) Tipus d'interaccions que poden establir les cadenes laterals.
- (l) Nom abreujat.
- (m) Nom d'almenys dos aminoàcids que siguen de la mateixa naturalesa que cadascun dels cinc indicats.
- (n) Capacitat per interrompre l'hèlix α .
- (o) Orientació més probable de la cadena lateral cap a l'interior o l'exterior de proteïnes solubles en aigua.
- (p) Formuleu l'estructura d'un dipèptid amb dos dels aminoàcids anteriors. Assenyala l'enllaç peptídic. Quina càrrega tindrà el dipèptid a pH fisiològic?

2.9.- Esperaríeu que una proteïna que conté 100 aminoàcids poguera ser tan bon tampó com els seus aminoàcids constituents lliures, a concentracions molars equivalents? [Hi ha que tenir amb compte els grups dissociables presents en la forma de proteïna i en la forma d'aminoàcids lliures]

2.10.- S'ha aïllat un tetrapèptid a partir d'un hidrolitzat de proteïna, la seqüència del qual és:

Leu-Asp-Phe-Gly

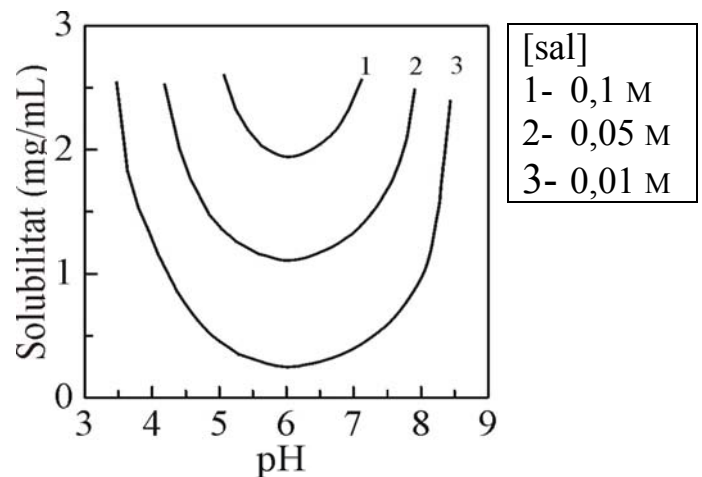
La solució del tetrapèptid s'ha deixat sense voler fora del congelador durant uns quants dies. A més, se sospita que la preparació pot contenir traces d'enzims proteolítics. Expliqueu com podríem determinar, mitjançant una valoració, si la solució conté el tetrapèptid intacte o una mescla equimolecular dels aminoàcids constituents. Comenteu els trets que considereu més remarcables de cadascuna de les corbes de valoració. [Hi ha que tenir amb compte els grups dissociables presents en la forma de tetrapèptid i en la forma d'aminoàcids lliures]

2.11.- (a) Relacioneu els aminoàcids de la columna I amb les característiques de les seues cadenes laterals (II):

<u>Columna I</u>	<u>Columna II</u>
Lys _____	(1) alifàtica apolar
Glu _____	(2) aromàtica apolar
Leu _____	(3) bàsica
Cys _____	(4) àcida
Trp _____	(5) conté sulfhidril
Ser _____	(6) conté hidroxil

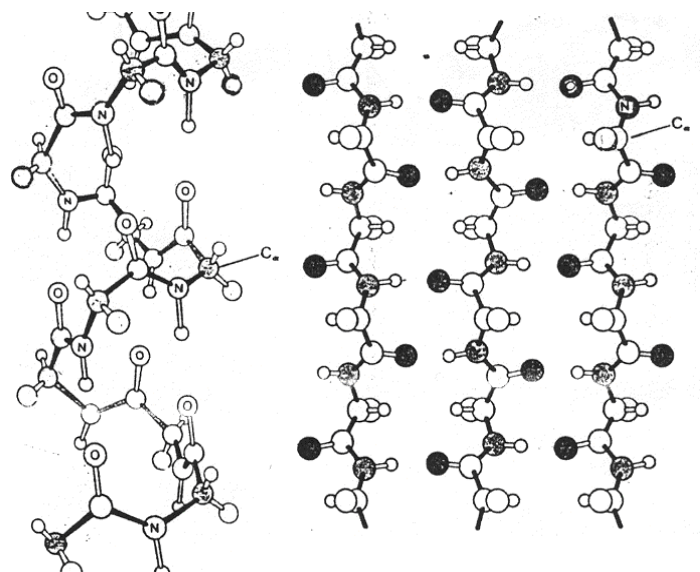
- (b) Formuleu l'estructura d'un dipèptid que continga dos dels aminoàcids de la columna I de l'apartat anterior i assenyaleu l'enllaç peptídic i els grups funcionals de les cadenes laterals. Quina càrrega neta tindrà el dipèptid a pH fisiològic? I a pH molt àcid? I a pH molt bàsic?
- (c) Quines són les propietats de l'enllaç peptídic i la seua relació amb l'estructura tridimensional de les proteïnes?
- (d) Quines interaccions podrien establir les cadenes laterals dels aminoàcids del dipèptid que has formulat si aquest formés part d'una proteïna globular?

2.12.- La figura representa la corba de solubilitat d'una proteïna en funció del pH per a tres quantitats de sal, NaCl. Discutiu els resultats i feu un èmfasi especial en la possible justificació de la variació del mínim de solubilitat (tant pel que fa a l'efecte del pH com al valor de solubilitat corresponent) en canviar la concentració de sal. [Les corbes indiquen, per una banda, el mínim de solubilitat de les proteïnes a pH del seu pI i per altra el fenomen conegut com a "salting in" (solubilització per salat), el que significa un increment de la solubilitat de les proteïnes amb la força iònica (concentració de ions o de sal)]



2.13.- La figura mostra l'esquelet (polipèptid sense les cadenes laterals dels aminoàcids) d'una hèlix α i d'un full β . Dibuixeu els ponts d'hidrogen i la posició aproximada de les cadenes laterals.

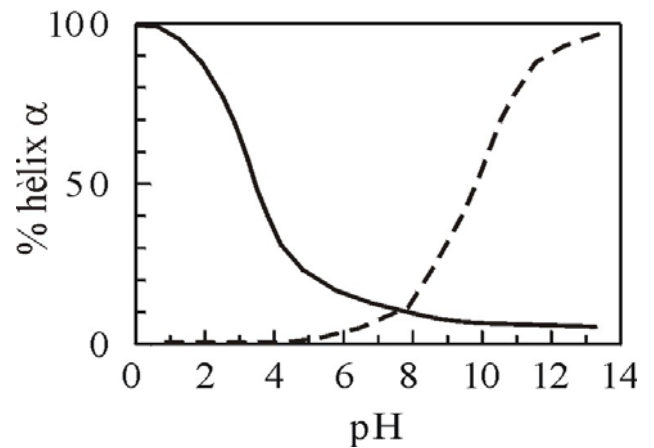
A quin nivell d'estructura tridimensional de les proteïnes pertanyen aquestes conformacions? Per què? Citeu dos aminoàcids que desestabilitzen o siguin incompatibles amb les estructures citades i expliqueu per què.



2.14.- En la gràfica es mostren els percentatges d'hèlix α dels polímers sintètics poli-L-Glu (línea contínua) i poli-L-Lys (línea discontinua) en relació amb el

pH del medi.

- (a) Expliqueu els resultats obtinguts.
- (b) Les proteïnes naturals no presenten un mínim d'hèlix α a pH 7,0. Aquesta dada està en contradicció amb els resultats que es mostren en la figura? Expliqueu-ho.



2.15.- Algunes proteïnes es troben ancorades a les membranes per inserció d'un segment de la regió N-terminal en l'interior hidrofòbic de la membrana.

- (a) Predieu i expliqueu amb detall l'estructura que probablement adoptarà la seqüència:

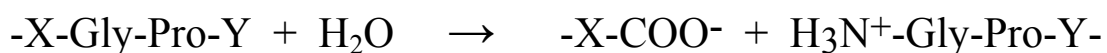
MALFALFALFALMFLMFLMFPNGMLF

- (b) Per què aquesta seqüència es pot inserir a la membrana?
- (c) Suposa que cadascun dels residus de Leu de la seqüència anterior és substituït per un de Asp. Alteraria això necessàriament l'estructura secundària del fragment peptídic? Per què? Expliqueu si en aquest cas penseu que la inserció de la proteïna a la membrana es veuria modificada.

[Donada la naturalesa de les cadenes laterals (R) dels aminoàcids la seqüència pot adoptar una estructura secundària particular, la qual li permet inserir-se a membranes, encara que pot ser que no tot fragment. Quina és aquesta estructura secundària? La substitució de Leu (apolar) per Asp (polar amb càrrega a pH fisiològic), dos aminoàcids amb R completament diferents, impedeix la incorporació a la membrana. És aquest canvi en la naturalesa de la R el que ho impedeix. Hi ha que explicar-ho.]

2.16.- La melitina i la δ -toxina són pèptids helicoïdals de 26 aminoàcids. Presenten activitat hemolítica a causa de la seua capacitat d'alterar la membrana plasmàtica dels eritròcits. Quina orientació i localització suposeu que tindran les cadenes laterals dels residus d'aminoàcids que les formen? [Resposta molt semblant a la qüestió anterior]

2.17.- El bacteri anaeròbic *Clostridium perfringens*, altament patògen, produeix la gangrena gasosa en què es destrueix l'estructura dels teixits. Aquest bacteri produeix un enzim que catalitza eficientment la hidròlisi de l'enllaç peptídic indicat a continuació, en què X i Y són un aminoàcid qualsevol:



Com contribueix aquest enzim a la invasió dels teixits humans pel bacteri? Per què aquest enzim no afecta el bacteri mateix?

2.18.- Comenteu o expliqueu: “L’addició d’un inhibidor de la prolina-hidroxilasa a la dieta d’una rata provoca fragilitat dels vasos sanguinis, lesions a la pell i genives sagnants. Aquests símptomes són semblants als que presenten els humans que sofreixen deficiència en vitamina C”.

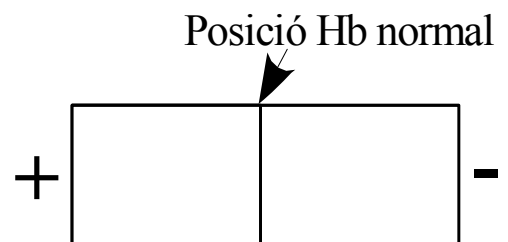
2.19.- Per què la majoria de les proteïnes quan es troben en solució a pH molt àcid o molt bàsic perden l’activitat biològica? Per altra banda, una variació petita de pH pot afectar l’activitat d’un enzim, per què? [Un pH molt àcid o molt bàsic pot modificar l’estat de ionització de molts grups, en canvi una variació petita del pH pot afectar a un o uns pocs grups només]

2.20.- L’hemoglobina és una proteïna tetramèrica composta per dues subunitats α i dues subunitats β . Les estructures d’aquestes subunitats són molt semblants a la cadena polipeptídica de la mioglobina; tanmateix, un cert nombre de residus hidrofílics de la superfície de la mioglobina estan reemplaçats, en llocs equivalents, per residus hidrofòbics en les subunitats de l’hemoglobina.

- (a) Com pot estar d’acord aquesta observació amb la generalització que diu que els residus hidrofòbics es disposen cap a l’interior de les proteïnes?
- (b) En aquest sentit, què es pot dir al voltant de la natura de les interaccions que determinen l’estructura quaternària de l’hemoglobina?

[En l’Hb l’estructura quaternària requereix establir interaccions entre les subunitats, aquestes no existeixen en el monòmer de Mb.]

2.21.- Sovint hom pot distingir les hemoglobines anormals (amb aminoàcids substituïts per mutació) de les normals pel seu diferent comportament electroforètic. Assenyaleu en l’esquema d’una electroforesi a pH 7,0 quina seria la posició relativa a l’hemoglobina normal de les variants Hb S (Glu 6 substituït per Val) i Hb *Siriraj* (Glu 7 canviat per Lys).



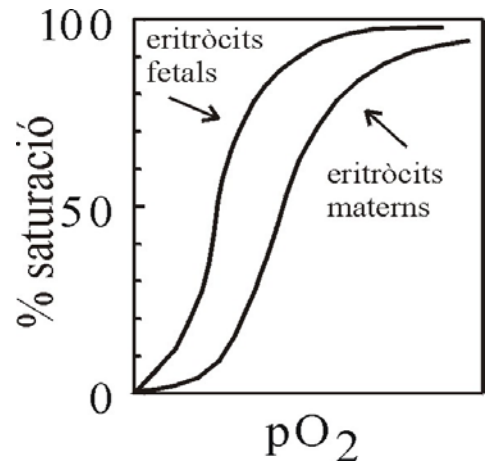
2.22.- Comenteu o expliqueu: “L’hemoglobina mutant *Rahere* té un residu de Thr que substitueix la Lys que ocupa la posició 82 (EF6) de la cadena β normal. Aquest canvi afecta el lloc d’unió del 2,3-BPG, de manera que la P₅₀ no és 25 torr, com en l’hemoglobina normal, sinó 10 torr”.

2.23.- Dibuixeu una gràfica que represente l’efecte de cadascun dels tractaments següents sobre l’afinitat de l’hemoglobina per l’oxigen (una gràfica

per cada tractament) i comenteu-ne breument la resposta:

- (a) dissociació del tetràmer $\alpha_2\beta_2$ en subunitats monomèriques.
- (b) augment de la concentració de 2,3-BPG de 5 mM a 8 mM.

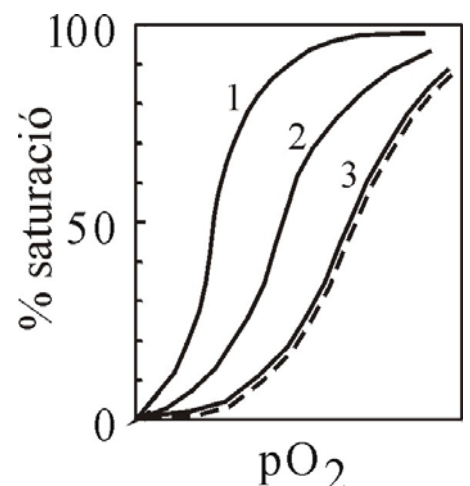
2.24.- El fetus humà té la seua pròpia classe d'hemoglobina, anomenada F ($\alpha_2\gamma_2$) diferent de l'hemoglobina dels adults, anomenada A ($\alpha_2\beta_2$). De les corbes de saturació presentades en la figura, deduiu quina presenta més afinitat per l'oxigen, l'hemoglobina F o la A. Quin pot ésser el significat fisiològic d'aquesta diferència? I la causa molecular? [L'Hb fetal té major afinitat per l'O₂ que l'adult, tal i com mostra la gràfica. Això permet una transferència d'O₂ des de l'Hb de la mare a l'Hb del fetus. Una menor capacitat d'unió d'algun dels efectors al·lostèrics negatius pot explicar la major afinitat per part de l'Hb F]



2.25.- A les dones embarassades se'ls recomana no fumar, entre altres raons, perquè el tabac produeix monòxid de carboni, substància que provoca una disminució de l'oxigenació del fetus (hipòxia). Suggeriu una explicació bioquímica a aquest fet. [El monòxid de carboni s'uneix al mateix lloc que l'O₂ sobre l'Hb]

2.26.- El corredor favorit de la marató que se celebrarà a La Paz (Bolívia) s'ha entrenat durant les diverses setmanes que es necessiten per adaptar-se als 3700 metres d'altitud. Un fabricant de sabatilles esportives especials per a córrer la marató (el qual patrocina un dels rivals del nostre favorit) l'ha convidat a passar uns dies a una fabulosa casa en una platja propera a Lima (Perú) i li ha assegurat que tornarà a La Paz per a córrer la marató almenys amb un dia d'antelació. Creieu que la invitació és una mostra d'amabilitat o, per contra, un intent de perjudicar-lo de cara a la carrera? (Justifiqueu la resposta emprant gràfiques.)

2.27.- S'ha recollit sang d'un pacient i se n'ha aïllat l'hemoglobina. A una tercera part d'aquesta se li va afegir CO₂ i 2,3-BPG (mostra a), a una altra tercera part, CO₂ (mostra b) i la resta es va mantenir sense tractament (mostra c). En la figura es presenten les corbes de saturació per oxigen de les tres mostres d'hemoglobina i d'una mostra de sang (línia discontinua). Quina corba correspon a cadascuna de les mostres?



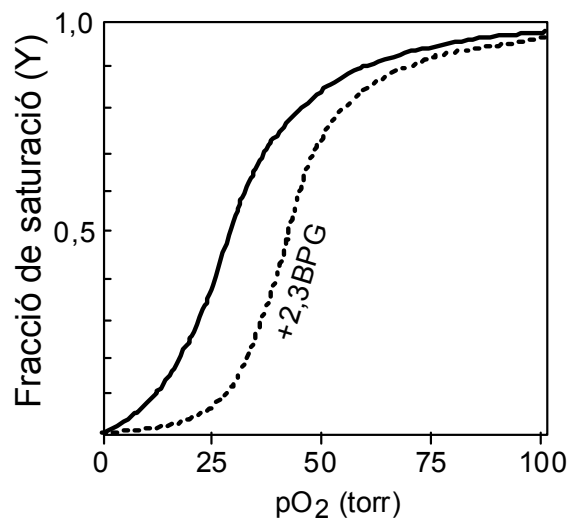
2.28.- Els eritròcits de les aus i les tortugues contenen una molècula reguladora de l'afinitat de l'hemoglobina per l'oxigen diferent del 2,3-bisfosfoglicerat (2,3-BPG). Quina de les substàncies següents es pot pensar que serà més efectiva per exercir aquesta funció reguladora?

- (a) Glicerol.
- (b) Hexafosfat d'inositol.
- (c) Arginina.

Expliqueu en què consisteix aquesta regulació. Justifiqueu les respostes. No oblideu que les hemoglobines dels vertebrats són molt similars.

2.29.- Els pacients que pateixen insuficiència respiratòria presenten una clara disminució de la pressió parcial d'oxigen als pulmons, 50 torr en lloc de 100 torr. En aquests casos, la injecció intravenosa de 2,3-BPG els resulta beneficiosa.

- (a) Expliqueu per què el 2,3-BPG té aquest efecte amb l'ajuda de la gràfica en què es mostra el comportament de l'hemoglobina del pacient abans i després del subministrament de 2,3-BPG.
- (b) Com actua a nivell molecular el 2,3-BPG?



(Advertiment: la pO₂ als teixits del malalt és de 25 torr)

Abreviatura, massa molecular i pK_a dels grups ionitzables dels aminoàcids

Aminoàcid	Abreviatura	pK _a α-COOH	pK _a β-NH ₃ ⁺	pK _a R	Mr
Àcid aspàrtic	Asp D	2,09	9,82	3,86	113
Àcid glutàmic	Glu E	2,19	9,67	4,25	147
Alanina	Ala A	2,34	9,69	-	89
Arginina	Arg R	2,17	9,04	12,48	174
Asparagina	Asn N	2,02	8,80	-	132
Cisteïna	Cys C	1,71	10,78	8,33	121
Fenilalanina	Phe F	1,83	9,13	-	165
Glicina	Gly G	2,34	9,60	-	75
Glutamina	Gln Q	2,17	9,13	-	146
Histidina	His H	1,82	9,17	6,00	155
Isoleucina	Ile I	2,36	9,68	-	131
Leucina	Leu L	2,36	9,60	-	131
Lisina	Lys K	2,18	8,95	10,53	149
Metionina	Met M	2,30	9,20	-	131
Prolina	Pro P	1,99	10,60	-	115
Serina	Ser S	2,21	9,15	-	105
Tirosina	Tyr Y	2,20	9,11	10,07	181
Treonina	Thr T	2,63	10,43	-	119
Triptòfan	Trp W	2,38	9,39	-	204
Valina	Val V	2,32	9,62	-	117

3. Enzimologia

[Atenció: al final del document, en l'annex II, teniu explicacions sobre fonaments d'enzimologia necessaris per a fer els problemes. També hi trobareu alguns problemes resolts. Aquest material pot ajudar-vos a la comprensió i resolució dels problemes.]

3.1.- Calculeu la proporció entre les concentracions de substrat requerides per tal d'aconseguir una saturació del 80 % i del 10 %, respectivament, i suposeu un enzim amb cinètica de saturació hiperbòlica. ($[S]_{80}:[S]_{10}= 36$)

3.2.- Suposeu que un enzim segueix una cinètica de Michaelis-Menten amb una $K_m= 1$ mM. La velocitat inicial és 0,1 mM/min a concentració de substrat 10 mM. Es duplicaria la velocitat inicial si la concentració de substrat fóra 20 mM?

3.3.- Per tal d'estudiar la dependència de la velocitat d'una reacció catalitzada per un enzim amb la concentració de substrat, s'afegeix una quantitat constant d'enzim a una sèrie de mescles de reacció que contenen concentracions diferents de substrat. Les velocitats inicials de reacció es determinen en mesurar la quantitat de substrat consumit o de producte produït per unitat de temps. Considerant açò i els valors que figuren en la Taula:

- (a) Quina és la $V_{m\grave{a}x}$ d'aquesta reacció?
- (b) Per què v_0 és constant en concentracions de substrat per damunt de $2,0 \cdot 10^{-3}$ M?
- (c) Quina és la concentració d'enzim lliure en una concentració de substrat de $2,0 \cdot 10^{-2}$ M?

[S] (M)	v_0 ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
$2,0 \cdot 10^{-1}$	60
$2,0 \cdot 10^{-2}$	60
$2,0 \cdot 10^{-3}$	60
$2,0 \cdot 10^{-4}$	48
$1,5 \cdot 10^{-5}$	45
$1,3 \cdot 10^{-6}$	12

3.4.- La hidròlisi del pirofosfat a ortofosfat és important per impulsar reaccions biosintètiques com la síntesi del DNA. Aquesta reacció hidrolítica és catalitzada en *Escherichia coli* per una pirofosfatasa que té una massa molecular de 120 kDa i es troba constituïda per sis subunitats idèntiques. L'enzim purificat té una $V_{m\grave{a}x}$ de 2.800 unitats per mg d'enzim. En aquest cas, una unitat és definida com la quantitat d'enzim que hidrolitza 10 μmol de pirofosfat en 15 min a 37 °C, sota condicions d'assaig estàndard.

- (a) Quantes molècules de pirofosfat hi són hidrolitzades per s i per mg d'enzim?
- (b) Quants mols de centre actiu hi ha en 1 mg d'enzim? Cal suposar que cadascuna de les subunitats té un centre catalític.
- (c) Calculeu el nombre de recanvi de l'enzim.

[(a) 2800 unitats d'activitat (1mg d'enzim, E)= $10 \cdot 10^{-6}$ mol x 2800 u/15 min= $1,86 \cdot 10^{-3}$

mol/(min·mg E)= $31,1 \cdot 10^{-6}$ mol/(s·mg E). Passant mol a molècules: $31,1 \cdot 10^{-6} \times 6,023 \cdot 10^{23} = 1,9 \cdot 10^{19}$ molècules/(s·mg E); (b) $1 \cdot 10^{-3}$ g d'E/120000= $8,3 \cdot 10^{-9}$ mol E, per 6 subunitats: $8,3 \cdot 10^{-9}$ mol E x 6= $5,0 \cdot 10^{-8}$ mol de centre actiu; (c) nombre de recanvi= $31,1 \cdot 10^{-6} / 5,0 \cdot 10^{-8} = 622 \text{ s}^{-1}$

3.5.- Una solució de midó a l'1% (p/v), pH 6,7, és digerida amb 15 µg d'α-amilasa (152 kDa). Es determina la velocitat de producció de maltosa (342 Da) i es troba que la velocitat inicial màxima és de 8,5 mg de producte format per minut. Calculeu el nombre de recanvi i l'activitat específica.

[Calculem mol de producte/min= $8,5 \cdot 10^{-3}$ g/ 342= $24,8 \cdot 10^{-6}$ mol/min= $414,2 \cdot 10^{-9}$ mol/s. Mol d'enzim α-amilasa= $15 \cdot 10^{-6}$ g/152000= $9,9 \cdot 10^{-11}$, NR= $414,2 \cdot 10^{-9}/9,9 \cdot 10^{-11} = 4184 \text{ s}^{-1}$; L'activitat específica (AE)= $V_{\text{màx}}/\text{mg d'enzim}$: AE= $414,2 \cdot 10^{-9}/ 15 \cdot 10^{-3} \text{ mg} = 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol maltosa} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg amilasa}^{-1}$]

3.6. Supposeu que la glucosa es pot convertir en una altra substància mitjançant un enzim. La Taula següent recull, per aquest cas hipotètic, les velocitats de la reacció per a diferents concentracions de glucosa.

- (a) Introduïu aquestes dades de velocitat inicial enfront de la concentració de glucosa i uniu els punts mitjançant una corba suau. Analitzeu la corba i determineu la $V_{\text{màx}}$ i la K_{m} de l'enzim que catalitza aquesta reacció.
- (b) Utilitzeu un altra representació gràfica per a determinar de nou la $V_{\text{màx}}$ i K_{m} de l'enzim. Quins valors són més fiables? Per què?

[glucosa] (M)	v_0 (mmol·L ⁻¹ ·min ⁻¹)
$1,0 \cdot 10^{-5}$	150
$2,0 \cdot 10^{-5}$	256
$1,0 \cdot 10^{-4}$	600
$3,0 \cdot 10^{-4}$	770
$5,0 \cdot 10^{-4}$	818

3.7.- Un dels objectius de la biotecnologia actual és la construcció d'enzims més eficients en la catàlisi, emprant tècniques de DNA recombinant. Mitjançant la mutagènesi dirigida, hom pot obtenir enzims modificats, respecte de l'enzim silvestre, en posicions molt definides de l'estructura i amb propietats noves. Una vegada obtingut l'enzim mutant es procedeix a l'anàlisi dels seus paràmetres cinètics i es comparen amb els de l'enzim sense modificar. Amb aquestes tècniques, l'enzim que catalitza la

[A] (mM)	v_0 (µmol/min)	
	E_s	E_m
0,20	0,25	0,29
0,33	0,33	0,40
0,50	0,39	0,50
0,66	0,43	0,57
1,00	0,50	0,66

transformació de la substància A en B (anomenem-lo E_S) és modificat a una forma mutant (E_M). La Taula següent recull els resultats d'una anàlisi cinètica dels dos enzims davant la variació de la concentració de A.

- (a) Si sabem que en els dos casos s'emprarà $0,1 \mu\text{g}$ d'enzim ($M_r = 90\,000$), quina de les dues formes transforma més quantitat de substrat per unitat de temps sota condicions òptimes d'assaig?
- (b) Determineu gràficament els paràmetres cinètics per a les dues formes de l'enzim. Quina de les dues formes mostra més eficàcia sobre el substrat?

[(b) $K_m (E_S) 0,31 \text{ mM}$; $V_{m\grave{a}x} (E_S) 0,62 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; $K_m (E_M) 0,5 \text{ mM}$; $V_{m\grave{a}x} (E_M) 1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; eficàcia $k_{cat}/K_m 3\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1} (E_S)$ i $2,9\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1} (E_M)$]

3.8.- La fumarasa catalitza la conversió del fumarat en L-malat. L'enzim està constituït per quatre subunitats idèntiques.

[fumarat] (mM)	v_0 (mmol·min ⁻¹)
2,0	2,5
3,3	3,1
5,0	3,6
10,0	4,2

- (a) Calculeu-ne gràficament la K_m a partir de les dades de la Taula.
- (b) Calculeu el nombre de recanvi de l'enzim tenint en compte que en l'assaig enzimàtic s'utilitzaren $10 \mu\text{L}$ d'una solució $2\cdot 10^{-5} \text{ M}$ d'enzim.

[(a) $K_m 2 \text{ mM}$; (b) nombre de recanvi: $1,04\cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$]

3.9.- El fetge embrionari conté un enzim per a la reacció: $S \rightarrow P$. El fetge dels adults també conté aquesta activitat. En la Taula es mostren dades cinètiques d'ambdós enzims:

[S] (M)	v_0 (nmol/min)	
	adult, E_1	embrionari, E_2
$2,5\cdot 10^{-5}$	1,54	6,66
$5,0\cdot 10^{-5}$	2,86	10,00
$7,0\cdot 10^{-5}$	3,78	11,67
$1,0\cdot 10^{-4}$	5,00	13,33
$2,0\cdot 10^{-4}$	8,00	16,00
$3,0\cdot 10^{-4}$	10,00	17,10

(a) Determineu gràficament els paràmetres cinètics ($V_{m\grave{a}x}$ i K_M) de les dues activitats enzimàtiques. Quines conclusions podeu traure sobre la naturalesa de les activitats E_1 i E_2 a partir de l'anàlisi de les gràfiques anteriors?

(b) En aquest experiment s'utilitzaren 10 μL d'una solució de l'enzim E_1 de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Calculeu el nombre de recanvi d'aquest enzim sabent que la M_r és de 75.000.

[(a) E_1 K_M 0,33 mM, $V_{m\grave{a}x}$ 20 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$; E_2 K_M 0,055 mM, $V_{m\grave{a}x}$ 20 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$; (b) nombre de recanvi 10 s^{-1}]

3.10.- Un enzim (M_r 29 600) catalitza la reacció:



El seguiment del procés s'efectua en neutralitzar amb NaOH 0,1 M els protons que apareixen en 1 min d'incubació a 30 °C en tampó fosfat ($\text{p}K_{a2} = 6,9$), 6 mM, pH 6,9. Cada volum d'assaig conté 1 μg d'enzim. A partir de les dades de la Taula, calculeu:

$[\text{S}]\cdot 10^5$ (M)	volum de NaOH per a tornar a pH 6,9 (mL)
0,3	1,04
0,5	1,45
1,0	2,25
3,0	3,38
9,0	4,05

(a) K_M

(b) $V_{m\grave{a}x}$, expressada com a mol H^+ /min

(c) el nombre de recanvi

[(a) K_M 10 μM ; (b) $V_{m\grave{a}x}$ 446 $\mu\text{mol H}^+ \text{ min}^{-1}$; (c) nombre de recanvi $2,2\cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$]

3.11.- La descarboxilació d'un β -cetoàcid té lloc amb una velocitat inicial determinada per la velocitat de formació de CO_2 . L'assaig de l'enzim en funció de diferents concentracions de substrat ha donat els resultats de la Taula:

[cetoàcid] (mM)	mmol CO_2 alliberats durant el primer min
2,500	0,026
1,000	0,022
0,714	0,019
0,526	0,017
0,250	0,011

(a) Calculeu la K_M i la $V_{m\grave{a}x}$ per a l'enzim

(b) Si en cadascun dels assaigs enzimàtics s'utilitza 2,5 µg d'enzim (125 kDa), quin és el nombre de recanvi sota aquestes condicions?

[(a) K_m 0,48 mM; $V_{m\grave{a}x}$ 32 µmol·min⁻¹; (b) nombre de recanvi 26 000 s⁻¹]

3.12.- El producte d'una reacció (A → B) té color i presenta un màxim d'absorbància a 600 nm. Com que l'absorbància és proporcional a la concentració de producte, les mesures obtingudes amb un colorímetre permeten fer l'estudi cinètic de l'enzim que catalitza aquesta reacció. En la Taula es mostren els resultats d'un d'aquests estudis en què la velocitat inicial de la reacció (v_0) s'expressa com la variació d'absorbància produïda per minut ($\Delta A/\text{min}$) per a cadascuna de les concentracions de substrat utilitzades.

[A] (mM)	$v_0 \cdot (\Delta A/\text{min})$
2,5	0,13
5,0	0,21
10	0,30
20	0,37
40	0,43

(a) Determineu els paràmetres cinètics de l'enzim, $V_{m\grave{a}x}$ i K_m .

(b) Sabent que en aquests experiments s'ha utilitzat 1 nmol d'enzim, podeu calcular el nombre de recanvi de l'enzim? En cas que no, quina dada o experiment addicional caldria?

[(a) $V_{m\grave{a}x}$ 0,53 $\Delta A/\text{min}$; K_m 7,69 mM]

3.13.- La renina és una proteasa que hidrolitza l' α_2 -globulina del sèrum. A partir de les dades cinètiques recollides en la Taula següent:

[α_2 -globulina] (µM)	v_0 (µmol/min)	
	sense pepstatina	amb pepstatina
0,13	1,25	0,60
0,20	1,72	0,87
0,40	2,50	1,47
0,58	2,94	1,92
0,77	3,33	2,27

(a) Calculeu, a partir de la gràfica de la representació de dobles inversos, K_m i $V_{m\grave{a}x}$.

(b) Calculeu el nombre de recanvi de la renina sabent que en l'assaig s'utilitzaren 2 nmol d'enzim.

(c) La pepstatina és un pentapèptid microbià que en l'assaig s'utilitzà com a inhibidor. Quin tipus d'inhibició exerceix? Expliqueu-ho.

[(a) $V_{m\grave{a}x}$ 5,55 µmol/min; K_m 0,45 µM; (b) nombre de recanvi 46,3 s⁻¹]

3.14.- Els resultats de dos estudis sobre l'activitat catalítica de la glicogen-sintasa es mostren en la Taula. Els assaigs es feren mantenint constant la concentració de l'acceptor poliglucosa i variant la d'UDP-glucosa, en presència i en absència de ATP. Determineu gràficament el tipus d'inhibició i el valor de K_i .

[UDP-glucosa] (mM)	v_0 ($\mu\text{mol glucosa incorporada} \cdot \text{min}^{-1}$)	
	sense ATP	amb ATP 2,5 mM
0,8	10,0	2,0
1,4	12,5	3,3
3,3	22,0	6,7
5,0	25,0	10,0

[K_i 0,44 mM]

3.15.- L'enzim 6-fosfogluconat-deshidrogenasa catalitza la descarboxilació oxidativa de l'àcid 6-fosfogluconic, d'acord amb la reacció següent:



Aquest enzim s'inhibeix per l'agent químic I. Amb les dades cinètiques de la Taula, determineu el tipus d'inhibició exercida per I sobre la 6-fosfogluconat-deshidrogenasa. La concentració de l'àcid 6-fosfogluconic es manté constant i se'n varia la de NADP^+ .

[NADP^+] $\cdot 10^5$ (M)	v_0 (unitats arbitràries)	
	control	+I ($1,5 \cdot 10^{-5}$ M)
2	2,12	1,11
3	2,70	1,47
4	2,94	1,73
6	3,33	2,32
10	3,85	2,78

Determineu els paràmetres cinètics (i K_i) en presència i en absència de I.
 [$V_{\text{màx}} = 4,8$ u. a., $K_m = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M; $K_m(i) = 6,3 \cdot 10^{-5}$ M; $K_i = 9,8$ μM]

3.16.- Una preparació de glutamat-deshidrogenasa (M_r 60.000) conté 10 mg de proteïna per mL. Si 20 μL d'aquesta preparació s'assagen variant les concentracions de glutamat, en absència i en presència d'un inhibidor s'obtenen

els resultats que s'indiquen en la Taula (fixeu-vos que ja hi són representats els inversos):

$[S]^{-1}$ (mM^{-1})	v_0^{-1} ($\text{min} \cdot \text{mmol}^{-1}$)	
	sense I	$[I] = 2 \text{ mM}$
1	0,2	0,6
2	0,3	1,1
3	0,4	1,6
4	0,5	2,1

- (a) Calculeu els valors de $V_{\text{màx}}$ i K_M en absència i en presència d'inhibidor.
 (b) De quin tipus d'inhibició es tracta?
 (c) Calculeu el nombre de recanvi

[(a) $V_{\text{màx}} (\pm I) 10 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$; $K_M 1 \text{ mM}$; $K_{M(i)} 5 \text{ mM}$; (c) nombre de recanvi $50\,000 \text{ s}^{-1}$]

3.17. La hidròlisi de fenil- β -D-galactòsid per la β -D-galactosidasa és parcialment inhibida per ions Be^{2+} . Es mesuraren les velocitats inicials en diferents concentracions de substrat, en absència i en presència d'ions, i es varen obtenir els resultats que es recullen en la Taula.

$[S]$ (mM)	$v_0 \cdot 10^5$ ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ d'E}$)	
	- Be^{2+}	+ Be^{2+}
100	7,70	3,85
50	6,24	3,00
20	4,00	1,92
10	2,50	1,22
5	1,39	0,69

La massa molecular de l'enzim és de 75000 Da. Segons aquestes dades, determineu:

- (a) El tipus d'inhibició.
 (b) La K_M .
 (c) El nombre de recanvi.

[(b) $K_M 28,6 \text{ mM}$; (c) nombre de recanvi $7,5 \text{ s}^{-1}$]

3.18.- L'enzim malat-deshidrogenasa del citosol catalitza la reacció:



Aquest enzim ha estat aïllat i purificat del cor de porc i s'ha estudiat l'efecte que sobre l'activitat enzimàtica tenen l'AMP i la nicotinamida. Els

assaigs s'han fet a 25 °C contenint el medi d'incubació de l'enzim, concentracions variables de substrat, en tampó borat sòdic 50 mM, pH 7,5 i oxalacetat 5 mM. La velocitat de reacció s'ha mesurat seguint la variació de l'absorció de llum de 340 nm per al NADH.

[NADH] (mM)	A ₃₄₀ /min		
	control	nicotinamida, 200 mM	AMP, 20 mM
0,200	1,250	0,880	0,769
0,100	1,080	0,625	0,526
0,066	0,909	0,476	0,400
0,050	0,833	0,400	0,322
0,040	0,740	0,333	0,270

Determineu la K_m per al NADH. Calculeu K_i per ambdós inhibidors. En funció de llur estructura, discutiu-ne l'acció inhibidora.

[$K_m = 0,043$ mM; $K_{m(i)}(\text{Nicotinamida}) = 0,143$ mM; $K_{m(i)}(\text{AMP}) = 0,20$ mM, $K_i(\text{Nicotinamida}) = 86$ mM; $K_i(\text{AMP}) = 5,5$ mM]

3.19.- Una empresa farmacèutica està interessada en l'obtenció d'un fàrmac que actue inhibint l'enzim mevalonat-quinasa de la ruta de biosíntesi del colesterol. A tal efecte, s'ha encarregat un estudi per conèixer els paràmetres cinètics de l'enzim, els resultats dels quals es mostren en la Taula 1.

- Sabent que en l'assaig s'han utilitzat 10 nmol d'enzim, calculeu gràficament els valors de K_m , V_{\max} i el nombre de recanvi. Amb l'objecte de trobar un inhibidor, uns investigadors han sintetitzat compostos (I₁, I₂ i I₃) estructuralment similars al mevalonat que en cas d'actuar inhibint ho farien de manera competitiva. Per tal de seleccionar el més efectiu hauran de calcular K_i de cadascun d'ells. Els investigadors proposen, per minimitzar les despeses, calcular aquest paràmetre a partir de la mesura, en presència de $[I] = 1$ mM, de la v_0 a una única concentració de mevalonat de 5 mM. Els resultats obtinguts de l'assaig dels tres inhibidors es mostren en la Taula 2.
- Calculeu gràficament els valors de K_m^{ap} .
- Quin és el valor de K_i de cadascun d'aquests inhibidors? En la teua opinió, quin inhibidor funcionaria millor com a fàrmac per blocar la síntesi del colesterol? Justifiqueu la resposta.

Taula 1

[mevalonat] (mM)	v_0 (mmol/min)
1,25	0,13
2,50	0,21
5,00	0,29
10,00	0,37

Taula 2

Inhibidor	v_0 (mmol/min)
I ₁	0,22
I ₂	0,29
I ₃	0,14

[(a) V_{\max} 0,456 mmol/min; K_M 2,86 mM; k_{cat} 775 s⁻¹; (c) $K_i(I_1)$ 1,06 mM; $K_i(I_3)$ 0,35 mM; I₂ no inhibeix]

3.20.- El virus de la Immunodeficiència Humana I (HIV-I) codifica una proteasa monomèrica (M_r 21500) que és essencial per a l'empaquetament i la maduració del virus. Aquesta proteasa catalitza la hidròlisi d'un pèptid amb una k_{cat} de 1 000 s⁻¹ i una K_M de 75 mM.

- Què significa que el valor de K_M siga 75 mM?
- Calculeu V_{\max} per a una concentració d'enzim de 0,2 mg/mL.
- Un compost sintètic (I) que només es diferencia del pèptid substrat de la proteasa en el fet que els enllaços peptídics -CO-NH- estan substituïts per -CH₂-NH-, no és hidrolitzat per la proteasa, sinó que té una acció inhibidora. En les mateixes condicions experimentals que les emprades amb el substrat natural, en presència del compost I, a una concentració de 2,5 μM , la V_{\max} és de 9,3 mM/s, mentre que el valor de K_M és més alt. Quin tipus d'inhibidor és I? L'acció inhibidora d'I, està d'acord amb la seua estructura? Justifiqueu la resposta.
- Feu sobre una única gràfica les representacions que origina l'equació de Michaelis-Menten en el cas de la reacció no inhibida i de la inhibida.
- Les representacions dels valors inversos de velocitat enfront dels inversos de concentració de substrat us permeten calcular els valors dels paràmetres cinètics V_{\max} i K_M ? I diagnosticar el tipus d'inhibició? Justifiqueu les respostes.

[(b) V_{\max} = 9,3 mM/s]

3.21.- Molts productes d'ús quotidià, com són detergents, pasta dentífrica, bombons farcits de xarops i cervesa, contenen enzims afegits. Proposeu quin tipus d'enzims poden ser continguts en aquests productes i discutiu-ne les funcions possibles.

3.22.- El tofu és un producte present en les llavors de la soja amb un alt contingut proteic i que és molt emprat pels orientals en alimentació. Es prepara mitjançant un tractament tèrmic que elimina els potents inhibidors de tripsina presents en la soja. Expliqueu les raons per les quals en la preparació del tofu es fan aquests tractaments.

3.23.- La leucina-aminopeptidasa catalitza la hidròlisi d'enllaços peptídics. La Taula presenta les dades de velocitat relativa per a tres substrats.

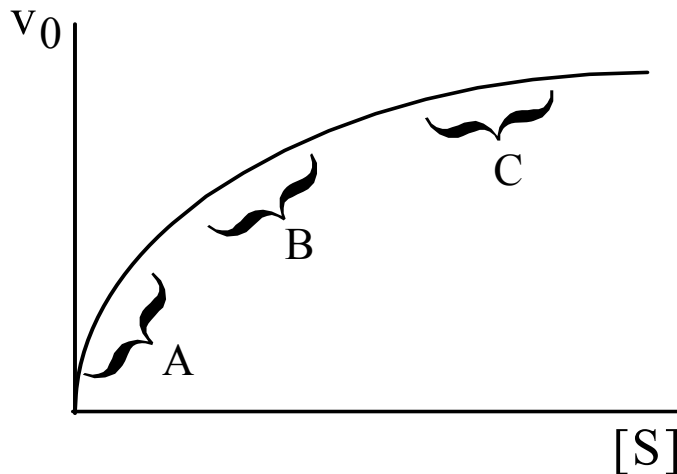
	Substrat	velocitat relativa
I	L-Leu-L-Ile	100
II	D-Leu-Gly	0
III	L-Ala-L-Leu	10

- (a) Per què s'observa tan gran diferència d'activitat entre el substrat I i el II?
 (b) I entre l'I i el III?

3.24.- En un determinat enzim, un residu de Ala està localitzat en una butxaca on s'uneix el substrat. Una mutació que consisteix en la substitució d'aquest residu per un de Gly no afecta l'activitat de l'enzim. Tanmateix, si l'Ala és substituïda per Glu, això porta una pèrdua completa d'activitat. Suggeriu una explicació a les observacions anteriors.

3.25.- Per a un enzim que segueix la cinètica de Michaelis-Menten, K_m és un paràmetre cinètic que no varia en un assaig d'activitat enzimàtica. Quin assaig faríeu, amb l'objectiu de comprovar el que acabem de dir, emprant una representació de Lineweaver-Burk?

3.26.- La figura adjunta representa una cinètica típica de Michaelis-Menten. Per a les frases següents indiqueu en quina regió (A, B, C) s'aplica millor. Justifiqueu les respostes.



- (a) El centre actiu està ocupat pel substrat la major part del temps.
 (b) El centre actiu es troba lliure la major part del temps.
 (c) És el rang de $[S]$ en el qual funcionen la majoria dels enzims *in vivo*.
 (d) Inclou el punt d'abscissa K_m .
 (e) La velocitat està limitada principalment pel nombre de centres catalítics.
 (f) La velocitat està limitada pel nombre de molècules de S.

3.27.- L'alumne A, havent estudiat en el laboratori la cinètica de la quimotripsina amb un substrat adient, ha obtingut els següents valors experimentals: $K_m = 4,9 \text{ mM}$, $V_{m\grave{a}x} = 1,50 \cdot 10^{-7} \text{ mM/min}$. L'alumna B, per contra, ha trobat els valors següents amb el mateix substrat i les mateixes condicions de temperatura i pH: $K_m = 5,0 \text{ mM}$, $V_{m\grave{a}x} = 7,0 \cdot 10^{-7} \text{ mM/min}$. En

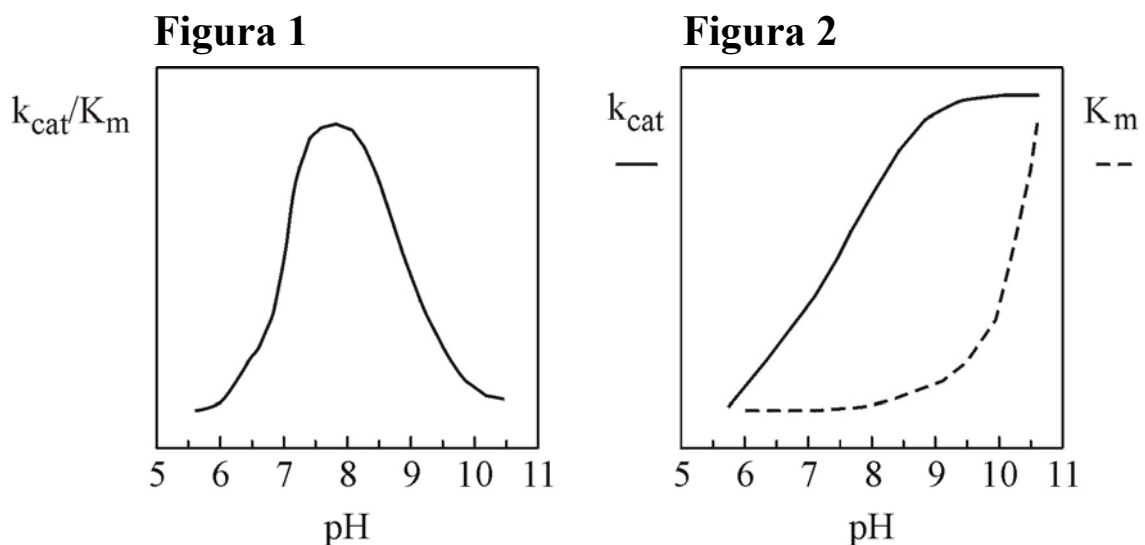
comparar els resultats, A exclama: “Hem descobert que la quimotripsina té almenys dos isoenzims”. L’alumna B li contesta: “No necessàriament, podria ser que la concentració d’enzim fóra diferent”. A quin dels dos li doneu la raó? Com podríem resoldre la discrepància? Aquests mateixos estudiants es plantejaren investigar l’efecte d’una substància inhibidora de l’activitat quimotripsina. Expliqueu amb detall com faríeu l’experiment i com podríeu determinar el tipus d’inhibició.

Nota: Cal considerar tots els factors que haurien de controlar durant la mesura de l’activitat enzimàtica.

3.28.- Comenteu la frase: “Si l’enzim té un nombre de recanvi de 100 s^{-1} significa que necessita 100 segons per a transformar un mol de substrat”.

3.29.- L’eficiència catalítica de molts enzims depèn del pH. La quimotripsina mostra un valor màxim de k_{cat}/K_m a pH 8,0 (Fig. 1). Quin és el significat d’aquesta observació? Una anàlisi detallada mostra que k_{cat} augmenta ràpidament entre pH 6 i 8 i roman constant a valors de pH més alts. Tanmateix, K_m augmenta ràpidament entre pH 8 i 10 (Fig. 2).

Expliqueu les observacions i obteniu conclusions sobre la naturalesa dels residus d’aminoàcid que poden ser crítics per a l’acció de la quimotripsina.



3.30.- Un investigador pretèn millorar l’activitat d’un enzim que catalitza la transformació de S en P. Com que se sap que en el centre actiu de l’enzim la Lys^{102} té un paper essencial, l’investigador es planteja la substitució d’aquest residu per Arg ($\text{Lys}^{102} \rightarrow \text{Arg}^{102}$, que origina l’enzim mutant 1) o per Glu ($\text{Lys}^{102} \rightarrow \text{Glu}^{102}$, que origina l’enzim mutant 2). Seguidament, l’investigador determinà els paràmetres cinètics K_m i k_{cat} per als tres enzims (original, mutant 1 i mutant 2) i obtingué els resultats següents:

	K_m (M)	k_{cat} (s⁻¹)
Enzim original	5 x 10 ⁻⁶	1.000
Mutant 1 (Lys¹⁰²→Arg¹⁰²)	500 x 10 ⁻⁶	1.000
Mutant 2 (Lys¹⁰²→Glu¹⁰²)	Sense activitat	

- (a) Definiu k_{cat}.
- (b) Quin és el significat de K_m? D'acord amb la diferència que hi ha entre els valors que presenta aquest paràmetre entre l'enzim original i l'enzim mutant 1, què en podeu deduir?
- (c) Com es veu afectada la V_{màx} del mutant 1 respecte de l'original?
- (d) Amb la substitució de Lys¹⁰² per Arg¹⁰² (enzim mutant 1), variarà l'eficiència catalítica de l'enzim? Justifiqueu la resposta.
- (e) A la vista del paràmetre enzimàtic que es modifica amb la mutació Lys¹⁰² → Arg¹⁰², quina pot ser la funció del residu Lys¹⁰² en el centre actiu de l'enzim?
- (f) Expliqueu per què la substitució Lys¹⁰² → Glu¹⁰² inactiva l'enzim.

3.31.- Qualsevol enzim és inhibit en certa manera per concentracions altes del producte de la reacció que catalitza. Quan el producte està present en concentració elevada pot inhibir l'enzim romanent al lloc actiu o separar-se i tornar-se a unir, i impedir així la unió del substrat. Els enzims controlats mitjançant retroinhibició són regulats al·lostèricament i manifesten una característica estructural especial que no presenten els enzims regulats de manera no al·lostèrica. Quina és aquesta característica i com fa possible que els enzims regulats de manera al·lostèrica siguin controladors més efectius que els que són inhibits només pels seus productes de la reacció?

3.32.- De quina manera afecta a un enzim de Michaelis un inhibidor irreversible? I un de reversible? Podríeu usar la diàlisi per tal de distingir els dos tipus d'inhibidors?

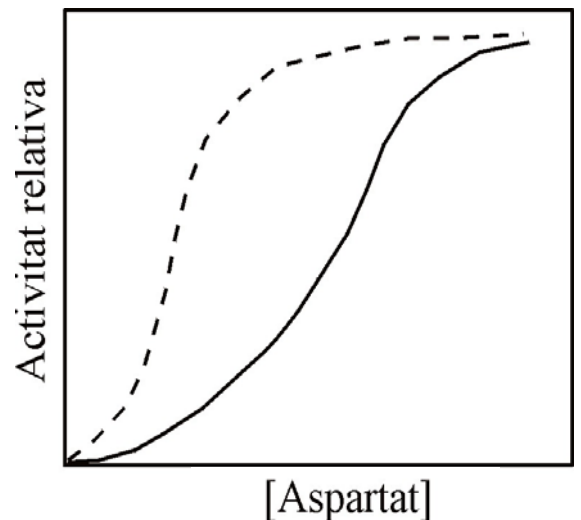
3.33.- El metanol és molt tòxic perquè es transforma metabòlicament en formaldehid per l'acció de l'alcohol deshidrogenasa. Part del tractament mèdic per a l'enverinament amb metanol consisteix a subministrar grans dosis d'etanol. Expliqueu per què penseu que aquest tractament és efectiu.

3.34.- En la columna I figuren tres mecanismes moleculars de regulació enzimàtica i en la II alguns trets que poden caracteritzar aquests mecanismes. Relacioneu ambdues columnes:

I	II
(1) al·lostèrisme	(a) canvi conformacional
(2) modificació covalent	(b) inhibició per producte final
(3) repressió genètica	(c) control de la concentració d'enzim
	(d) unió de lligand a lloc diferent en el centre actiu
	(e) fosforilació de residus de Ser
	(f) inhibició irreversible

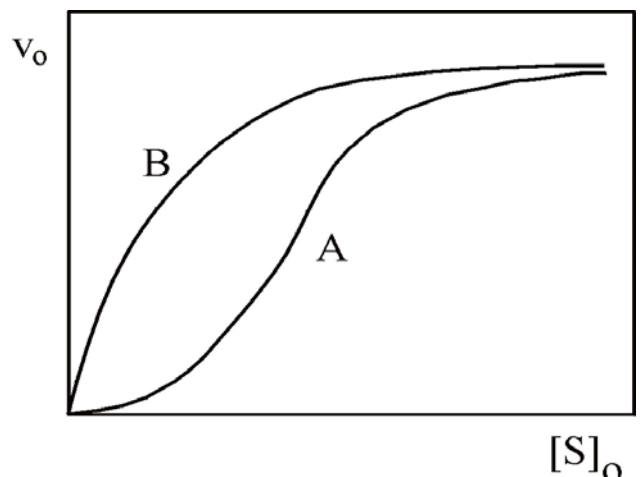
3.35.- La figura següent presenta alguns resultats corresponents a la mesura de l'activitat de l'aspartat-transcarbamoilasa (línia contínua).

- Podem dir que l'enzim presenta cooperativitat respecte al substrat (Asp)?
- Quina informació podeu obtenir sobre l'estructura tridimensional de l'enzim?
- Dibuixeu sobre la mateixa gràfica la cinètica de l'enzim en presència d'un efector positiu i un altre negatiu que afecten l'afinitat de l'enzim pel substrat Asp.
- Com podríeu explicar la corba corresponent a l'assaig emprant l'enzim prèviament escalfat a temperatura moderada (línia discontinua)?

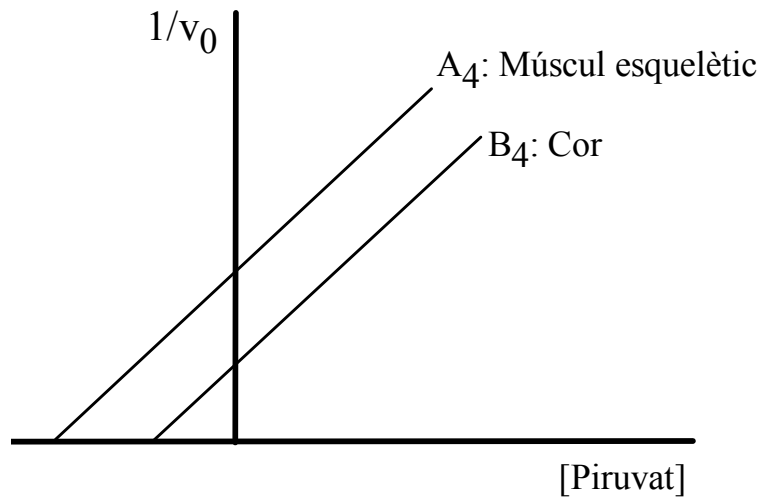


3.36.- La figura mostra la variació de la velocitat de reacció de l'enzim piruvat-quinasa en funció de la concentració de substrat en absència (corba A) i presència (corba B) de fructosa-1,6-bisfosfat (F-1,6-BP).

- A què podem atribuir la cinètica sigmoïde?
- Com influeix F-1,6-BP sobre l'activitat de l'enzim?
- Quin mecanisme pot explicar l'efecte que s'observa de F-1,6-BP sobre l'activitat?



3.37.- Els diferents isoenzims de la lactat-deshidrogenasa (LDH) són tetràmers amb dos tipus de cadenes polipeptídiques (A i B), cadascuna d'elles de M_r 33500. Aquests isoenzims de LDH tenen diferents valors de $V_{m\grave{a}x}$ i K_m per al piruvat (vegeu la figura). L'isoenzim predominant en múscul esquelètic conté quatre cadenes de tipus A, la qual cosa afavoreix la ràpida transformació de piruvat en lactat, mentre que al cor predomina la forma que conté quatre cadenes B que afavoreix la ràpida transformació de lactat en piruvat.



- Què són isoenzims?
- Quina és la M_r de l'holoenzim d'LDH
- Quantes formes isoenzimàtiques són teòricament possibles?
- Compareu els valors dels paràmetres cinètics dels isoenzims que es mostren en la figura. Quin dels dos és més eficaç?

4. Estructura i funció d'àcids nucleics

4.1.- Les dues cadenes complementàries d'un DNA tenen la mateixa composició en bases? Es verifica que $A+G = C+T$?

4.2.- Enumereu les diferències en composició química entre DNA i RNA.

4.3.- El virus del mosaic del tabac (TMV) conté un RNA de doble cadena com a genoma. Si la proporció d'adenina és 28 %, quina és la composició en les altres bases? [U = 28 %, C = G = 22 %]

4.4.- Un fragment de DNA de doble cadena conté 1 000 bp i un 58 % són G+C. Quants residus de desoxitimidina hi ha? [420]

4.5.- Si l'anàlisi d'un genoma víric resulta en: 32 % A, 16 % G, 40 % T i 12 % C, què podeu concloure sobre la seua estructura?

4.6.- Un òvul de *Drosophila* conté 0,17 pg de DNA distribuït en quatre cromosomes, la longitud relativa dels quals és 1:28:45:45. Calculeu la longitud del cromosoma de grandària intermèdia si cada parell de bases té una M_r de 642 i una longitud de 0,34 nm. [Calculem els parells de bases totals: $(0.17 \cdot 10^{-12} \text{g}/642) \times 6,023 \cdot 10^{23} = 1,59 \cdot 10^8$ pb. La longitud total: $1,59 \cdot 10^8 \times 0,34 \cdot 10^{-9} \text{m} = 0,0542 \text{m} = 54,2 \text{mm}$. El cromosoma mitjà és el $28/(1+28+45+45) = 0,23$: 23% del total, així que $54,2 \times 0,23 = 12,7 \text{mm}$]

4.7.- Un cromosoma humà mitjà conté 10^8 bp de DNA.

(a) Si cada parell de bases té una M_r de 660 i hi ha uns 2 g de proteïna (histones i no histones) per g de DNA, quina és la massa d'un cromosoma en g?

(b) Si estiguera totalment estès, quina mida faria?

(c) Si un cromosoma real fa uns 5 μm , quina és la relació de grandàries o grau de compactació?

(d) La formació de nucleosomes i la del solenoide de 30 nm explica en part la compactació del DNA en la cromatina. Si el solenoide conté sis nucleosomes per volta i té un pas de rosca de 10 nm, quin és el grau de compactació assolit? Compareu amb el resultat de l'apartat anterior.

[(a) $10^8 \times 660 = 6,6 \cdot 10^{10}$ g/mol de cromosoma i així la massa de la molècula de DNA és: $(6,6 \cdot 10^{10} \text{ g/mol}) / (6,023 \cdot 10^{23} \text{ molècules/mol}) = 1,09 \cdot 10^{-13} \text{g/molècula} = 0,1095 \text{ pg}$. Sumant la massa de les proteïnes: $0,1095 + (2 \times 0,1095) = 0,33 \text{ pg}$; (b) $10^8 \times 0,34 \cdot 10^{-9} = 0,034 \text{ m} = 3,4 \text{ cm}$; (c) $0,034 \text{ m} / 5 \cdot 10^{-6} \text{ m} = 6800$; (d) un nucleosoma conté uns 200 pb de DNA, i 6 nucleosomes 1200 pb que fan un longitud de $1200 \times 0,34 \cdot 10^{-9} \text{ m} = 4,1 \cdot 10^{-7} \text{ m}$, la qual es troba en 10 nm, el que significa una compactació de: $4,1 \cdot 10^{-7} / 10 \cdot 10^{-9} = 41$]

4.8.- La Taula recull el contingut (%) de G i C de diverses mostres de DNA aïllades de diferents espècies així com les temperatures de fusió (T_m) corresponents.

- (a) Representeu una gràfica que il·lustre aquests resultats.
- (b) Useu la gràfica i formuleu una expressió que relacione la temperatura de fusió d'una mostra amb el seu contingut de G+C.
- (c) Durant una investigació s'obtingueren dues mostres més de DNA amb un percentatge de G+C de 41,8 % i 39,6 %, respectivament. Calculeu la T_m .

Espècie	% (G+C)	T_m (°C)
Llevat	35,8	84,0
Humà	37,5	84,7
Rata	40,0	85,7
<i>B. subtilis</i>	44,0	87,5
<i>E. coli</i>	51,0	90,0
<i>P. aeruginosa</i>	68,0	97,0
<i>M. tuberculosis</i>	70,3	98,0

4.9.- El cromosoma d'*E. coli* conté $4,60 \cdot 10^6$ bp.

- (a) Si la velocitat de replicació d'una sola forqueta de replicació és de 1 000 pb/s, quant tardarà a replicar-se el cromosoma sencer del bacteri?
- (b) Sota condicions molt favorables, el temps de generació d'*E. coli* és de 20 min. Com és possible això si la forqueta de replicació no pot anar a més de 1000 bp/s i només hi ha un origen de replicació?

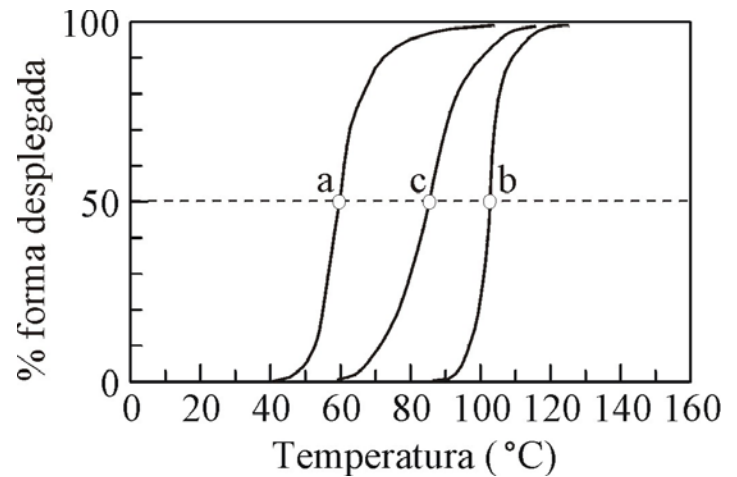
[35 min]

4.10.- El genoma d'*E. coli* té aproximadament 4,6 Mbp i conté uns 2 000 gens. El genoma d'un mamífer pot tenir unes 3 Gbp i se'n transcriuen uns 50 000 gens. Si un gen mitjà en el bacteri té 2000 bp de llargària, calculeu el percentatge del genoma bacterià que no es transcriu. Calculeu la proporció del genoma de mamífers que constitueixen els exons, suposant que la grandària dels seus productes gènics és també 2 kb. [Més d'un 85 % del genoma bacterià es transcriu; els exons representen un 3,3 % del genoma de mamífer.]

4.11.- Compareu els enllaços d'hidrogen (grups donadors i acceptors, orientació, etc.) en les hèlixs α de les proteïnes i en la doble hèlix de DNA. Comenteu la funció d'aquests en l'estabilització d'ambdues estructures.

4.12.- Les histones són proteïnes nuclears bàsiques. Quines cadenes laterals d'aminoàcids contribuiran probablement a la unió de les histones amb el DNA?

4.13.- La figura següent presenta unes corbes de fusió per a poli(AT) [a], poli(GC) [b] i per a un DNA natural [c]. Expliqueu per què s'observen diferències en les temperatures de fusió (T_m , temperatura necessària per assolir un 50 % de desnaturalització).



4.14.- Durant la manipulació de fragments de DNA, sovint es tallen en trossos més petits emprant endonucleases de restricció. Les de tipus II tallen específicament determinades seqüències palindròmiques. Escriviu la cadena complementària i identifiqueu la seqüència palindròmica del polidesoxinucleòtid esquematitzat a continuació. Consulteu un text per tal de conèixer quin enzim pot tallar aquesta seqüència i com ho faria.



4.15.- El genoma d'*E. coli* conté alguns “punts calents” on les mutacions ocorren amb una freqüència superior en uns altres llocs del cromosoma. Alguns d'aquests es caracteritzen per la presència de la base 5-metilcitosina. Si es considera l'elevada tendència a desaminar-se d'aquesta base, per què la seua presència dóna lloc a mutacions freqüents? [La desaminació, la pèrdua del grup amino, de la 5-metilcitosina converteix la base citosina en timina]

4.16.- Si es descobriera una espècie que continguera una DNA-polimerasa amb activitat polimeritzadora en direcció $3' \rightarrow 5'$ a més de l'activitat polimeritzadora $5' \rightarrow 3'$, quines activitats enzimàtiques i altres proteïnes ja no serien necessàries per a la replicació del DNA? Quines serien les característiques generals de la replicació en aquest nou organisme?

4.17.- Una solució aquosa conté DNA-polimerasa III i les sals magnèsiques de dATP, dGTP, dCTP i dTTP. Se separen quatre alíquotes d'aquesta solució i s'hi afegeixen les següents molècules de DNA:

Alíquota 1: una cadena circular tancada de 1 000 nucleòtids.

Alíquota 2: una doble cadena circular tancada de 1 000 nucleòtids.

Alíquota 3: una cadena circular tancada de 1 000 nucleòtids aparellats amb 500 nucleòtids d'una cadena lineal que té l'extrem $3'$ -OH lliure.

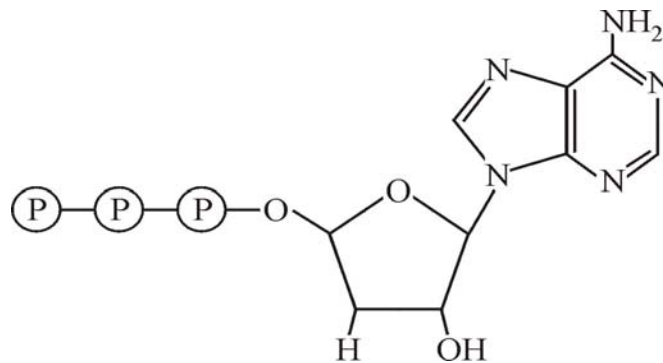
Alíquota 4: una molècula lineal de doble cadena que conté 1 000 pb de nucleòtids amb el $3'$ -OH lliure en cadascun dels extrems.

En quina de les quatre alíquotes pot haver síntesi de DNA? Justifiqueu la resposta.

4.18.- A diferència de la DNA-polimerasa, l'RNA-polimerasa no té activitat correctora. Per què aquesta mancança no disminueix la viabilitat cel·lular? Si un organisme tinguera un enzim que emprara un RNA com a motlle per a sintetitzar el DNA, quin efecte tindria això sobre la taxa de mutació de l'organisme?

4.19.- La RNA-polimerasa és un exemple de proteïna que s'uneix a DNA. Citeu-ne unes altres. També és un exemple d'enzim amb subunitats catalítiques i reguladores. Citeu-ne unes altres.

4.20.- La cordicepina 5'-trifosfat és un anàleg de l'ATP amb l'estructura següent:



Suposant que aquest compost és reconegut per l'RNA-polimerasa, quin efecte pot tenir l'addició d'aquesta droga en un cultiu de bacteris? I en un cultiu de cèl·lules animals? [Hi ha que fixar-se en l'estructura de l'anàleg, en particular sobre els grups funcionals que participen en la formació de enllaços necessaris per a formar polinucleòtids]

4.21.- Enumereu tres característiques del tRNA que el diferencien de l'mRNA i de l'rRNA.

4.22.- La RNasa P és una ribonucleoproteïna responsable de la maduració dels precursors dels tRNA. El tractament de la RNasa P amb proteases no n'afecta l'activitat mentre que la capacitat catalítica es perd totalment en presència de RNasa A. Expliqueu-ho. [Recordeu que hi ha enzims que no són de naturalesa proteica i per tant no són afectats per activitats destructives proteases]

4.23.- L'anèmia falciforme és una malaltia genètica causada per una mutació en el gen que codifica la cadena β de l'hemoglobina humana. En les cèl·lules malaltes trobem un polipèptid que en la posició 6 té una Val en compte del Glu

que hom pot trobar a l'hemoglobina normal. Quin canvi en el gen justifica més probablement aquesta substitució? [Necessiteu el codi genètic per a respondre]

4.24.- L'mRNA que especifica la cadena α de l'hemoglobina humana conté la seqüència següent:

.....UCCAAAUACCGUUAAGCUGGA...

El tetrapèptid C terminal codificat per part d'aquesta seqüència és:

-Ser-Lys-Tyr-Arg

En l'hemoglobina *Constant Spring*, la regió corresponent de la cadena α és:

-Ser-Lys-Tyr-Arg-Gln-Ala-Gly-...

Quina és la possible mutació que origina l'hemoglobina *Constant Spring*? [Necessiteu el codi genètic]

4.25.- Oligonucleòtids amb la seqüència *Shine-Dalgarno* bloquen la traducció en bacteris, però no en cèl·lules eucariòtiques. Per què?

4.26.- Quan en un sistema acel·lular actiu en la síntesi proteica s'afegeix un poliribonucleòtid artificial format per un triplet repetit [per exemple, poli(XYZ) en què X, Y i Z són qualsevol dels quatre ribonucleòtids], per què se sol obtenir una mescla de dos o tres tipus de polipèptids? Predieu els productes de la traducció de $(GUA)_n$ i de $(UUA)_n$. [Depèn de com són llegits els codons, "d'on comença" la lectura dels triplets, del marc de lectura]

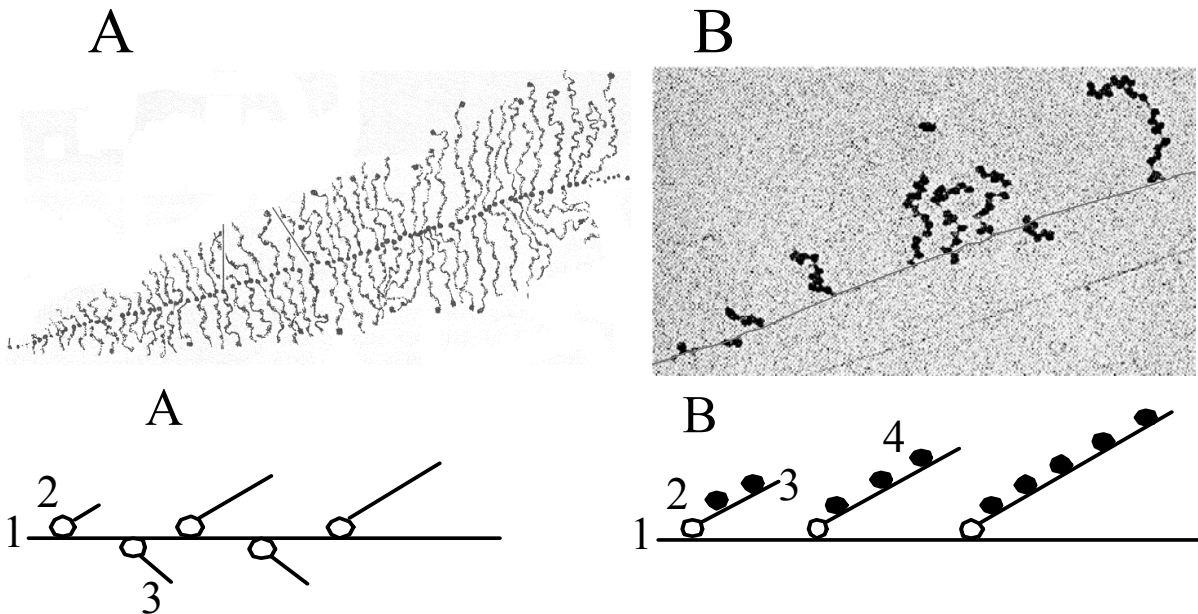
4.27.- Tenint en compte les regles d'aparellament de bases i el codi genètic:

- (a) Escriviu la seqüència de la molècula de mRNA que se sintetitzaria a partir de la següent **cadena motlle** de DNA i assenyaieu-ne els extrems 5' i 3'.

5'-GCGTTATCTAGTACCGTTAAG-3'

- (b) Quina seqüència d'aminoàcids codifica la molècula de mRNA sintetitzada en l'apartat anterior (se suposa que el fragment llegit comença en l'extrem 5'). Indiqueu els extrems amino- i carboxil-terminal del fragment polipeptídic resultant.

4.28.- A continuació, es mostren unes micrografies realitzades per Oscar Miller sobre la síntesi de l'rRNA en nuclèol d'una cèl·lula eucariòtica (A) i la transcripció i traducció simultànies en bacteris (B), així com uns esquemes interpretatius.



- Identifiqueu en cada cas els components dels esquemes.
- Si es tracta d'un àcid nucleic, localitzeu els extrems 3' i 5' respectivament.
- En B hi ha síntesi de polipèptid; dibuixeu-lo i indiqueu-ne la longitud relativa i l'extrem N o C.
- Indiqueu la direcció d'avanç dels diferents complexos enzimàtics.
- Els processos mostrats en B poden ocórrer de la mateixa manera en cèl·lules eucariòtiques?

Codi genètic

primera posició (extrem 5')	Segona posició				Tercera posició (extrem 3')
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

ANNEX I

Nocions bàsiques sobre solucions tampó. Alguns problemes resoltos

Ionització de l'aigua

L'aigua és una molècula neutra, però amb una certa tendència a ionitzar-se.



En aigua pura s'acompleix: $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ M}$, i en qualsevol solució l'equació que governa aquest equilibri és:

$$[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-] = K_w = 10^{-14} \text{ M}^2 \text{ (a } 25 \text{ °C)}$$

Conegut com a *producte iònic de l'aigua*, K_w .

Per a qualsevol solució:

quan:	$[\text{H}^+] > 10^{-7} \text{ M}$	$[\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ M}$	$[\text{H}^+] < 10^{-7} \text{ M}$
la solució és:	Àcida	Neutra	Bàsica (alcalina)

Per tal d'evitar exponencials, es defineix: **pH = -log [H⁺]** i així,

quan:	pH < 7	pH = 7	pH > 7
la solució és:	Àcida	Neutra	Bàsica (alcalina)

L'escala de pH oscil·la entre: 0.....7.....14

Els fluids biològics solen tenir un pH entre 6,5-7,5, conegut com a *pH fisiològic*.

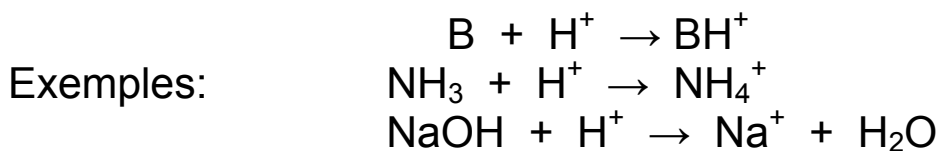
Àcids i bases

Un àcid és una substància que genera protons (H^+):



Exemples: $\text{HCl} \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}^+$
 $\text{CH}_3\text{-COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$

Una base és una substància que capta protons, per la qual cosa fa disminuir la $[\text{H}^+]$ i, per tant, puja el pH.

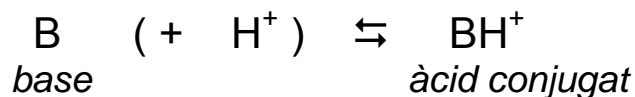


Qualsevol àcid, en dissociar-se passa a una forma amb capacitat de captar protons, és a dir amb propietats d'una base (*base conjugada*).



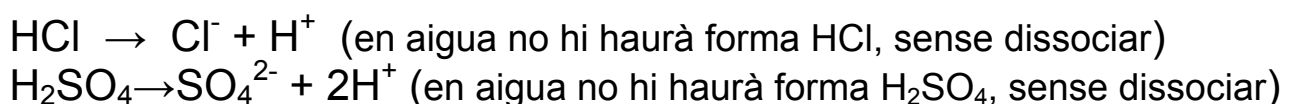
Les bases conjugades tenen propietats complementàries al àcids dels quals deriven, així, a un àcid que cedeix fàcilment protons li correspon una base conjugada amb dificultat per unir-los.

De la mateixa manera, qualsevol base quan es protona es transforma en una espècie amb capacitat de cedir protons, és a dir, en un àcid (*àcid conjugat*).



Ací només considerarem els àcids, i les bases són estudiades en tant que els seus àcids conjugats corresponents.

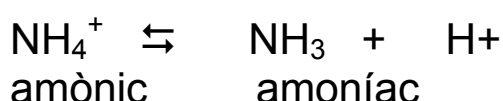
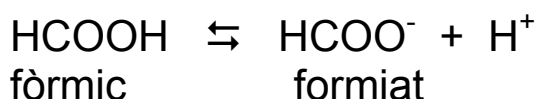
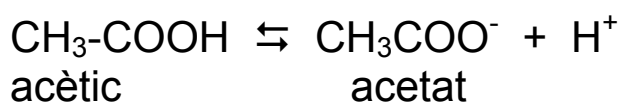
Àcids forts: són aquells que, dissolts en aigua, es dissocien completament i alliberen tots els H^+ possibles. En la solució no queda forma sense dissociar. Exemples d'àcids forts:



Àcids febles: són aquells que es dissocien parcialment i així en la solució existeixen les espècies dissociada i no dissociada en equilibri:



Exemples:



La força dels àcids, la tendència a cedir protons, queda determinada per la constant d'equilibri de la reacció, coneguda com a *constant àcida de dissociació* K_a .

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

Com més desplaçada cap a la dreta està una reacció de dissociació, major és K_a i més fort és l'àcid.

Per tal d'evitar els exponencials (igual que amb el pH), es defineix el pK_a com:

$$pK_a = -\log K_a$$

Un àcid és més fort com més gran és el seu valor de K_a o, el que és el mateix, més xicotet és el seu pK_a .

Exemples de K_a i pK_a d'àcids febles:

àcid	K_a	pK_a
fòrmic	$1,78 \cdot 10^{-4}$	3,75
acètic	$1,74 \cdot 10^{-5}$	4,76
butíric	$1,54 \cdot 10^{-5}$	4,82
NH_4^+ (amònic)	$5,62 \cdot 10^{-10}$	9,25

Com que K_a i $[H^+]$ estan relacionats, pK_a i pH també:

Si traiem logaritmes de l'equació de K_a :

$$\log K_a = \log [H^+] + \log ([A^-]/[HA])$$

i els ordenem: $-\log [H^+] = -\log K_a + \log ([A^-]/[HA])$.

Per definició de pK_a i pH i si els substituïm, resulta:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad \text{Equació de Henderson-Hasselbalch}$$

Aquesta equació vincula el pH d'una solució amb la relació de concentracions de forma dissociada i no dissociada d'un àcid feble

present en la solució. Coneguda la relació d'un àcid i la seua base conjugada ($[A^-]/[HA]$), es pot conèixer el pH de la solució i a l'inrevés.

El fet que els àcids febles, en solució aquosa, existeixen en equilibri amb les seues formes dissociades fa que aquestes substàncies actuen com a amortidores del pH. Un **amortidor de pH**, o **tampó** com també se'ls coneix, és una substància que ofereix resistència als canvis de pH quan s'afegeixen àcids o bases fortes a la solució en què es troben.

Si s'afegeixen H^+ , per exemple un àcid fort, a una solució tamponada, la forma dissociada de la substància tampó reacciona amb els H^+ afegits i forma l'àcid conjugat. Així, la majoria dels H^+ adicionats són eliminats i no contribueixen al pH i, per tant, aquest baixa molt poc: la solució es resisteix a la baixada de pH.

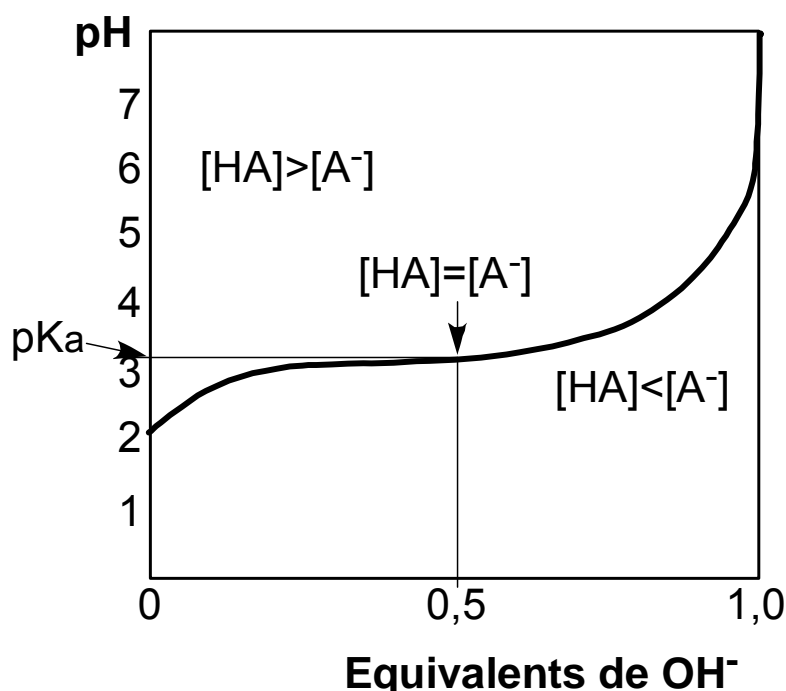


L'addició d'una base forta (OH^-) a la solució amortidora elimina H^+ , però la dissociació de la forma protonada del tampó els repon i, per tant, el pH no puja:

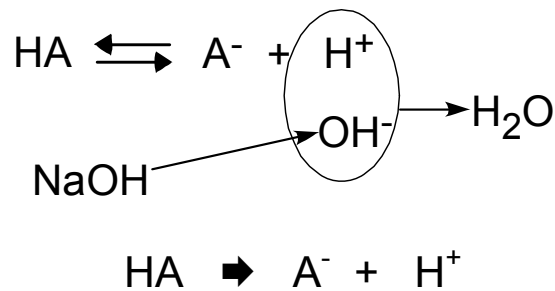


Es considera que un àcid feble funciona com a tampó en l'interval de pH al voltant del seu $pK_a \pm 1$. La màxima capacitat tampó d'un àcid feble té lloc quan $[HA]=[A^-]$ que, d'acord amb l'equació de Henderson-Hasselbalch, és quan $pH=pK_a$.

La capacitat tampó d'un àcid feble es manifesta en la seua *corba de valoració*. Una valoració consisteix en l'addició, a poc a poc, d'una base forta (per exemple NaOH) sobre la solució de l'àcid, en què cal mesurar a cada moment el pH de la solució.



Inicialment, com que es tracta d'un àcid feble, predomina la forma no dissociada $[HA] > [A^-]$. Quan s'hi afegeix base forta, aquesta reacciona amb els H^+ de la solució i desplaça l'equilibri de dissociació de l'àcid feble cap a la dreta, major dissociació:



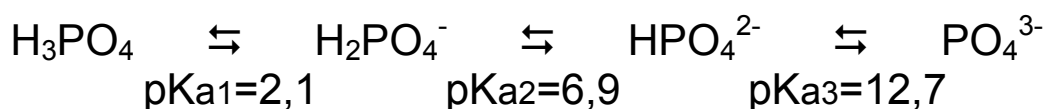
Quan s'han afegit exactament 0,5 equivalents de base forta, la meitat de l'àcid s'haurà desprotonat i es compleix que $[HA] = [A^-]$. Ara, i d'acord amb l'equació de Henderson-Hasselbalch, resulta que $pH = pK_a$, el pH de la solució coincideix amb el pK_a de l'àcid.

Si es prossegueix adicionant OH^- , continua la dissociació i ara es compleix que $[HA] < [A^-]$. La desprotonació completa arriba quan s'ha afegit 1 equivalent de base forta.

La capacitat amortidora de l'àcid feble s'observa en la regió en què la línia és quasi horitzontal i coincideix amb $pH = pK_a \pm 1$. En aquesta zona, una addició important de NaOH no genera un canvi important del pH (de fet, el canvi de pH és molt petit). Aquesta resistència al canvi de pH no s'observa en solucions sense capacitat amortidora de pH.

Àcids polipròtics

Hi ha àcids que contenen més d'un grup dissociable, com per exemple l'àcid fosfòric (H_3PO_4) i tots els aminoàcids ($H_3N^+ - CHR - COOH$). Aquests àcids polipròtics tenen tants valors de pK_a com grups dissociables. Així, si posem per cas l'àcid fosfòric, els equilibris de dissociació i els valors de pK_a corresponents són:

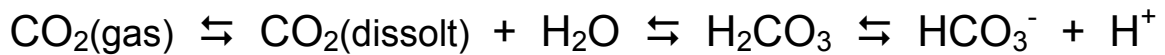


Les corbes de valoració dels àcids polipròtics són més complexes, amb tantes zones també com valors de pK_a . Amb solucions d'àcids polipròtics es treballa considerant-la una mescla de diferents àcids amb diferents pK_a .

Tampons fisiològics

El principal amortidor del pH intracel·lular és el fosfat $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, i el $\text{pK}_{a2} = 6,9$, corresponent al segon equilibri, realitza la funció tampó.

Bicarbonat/anhídrid carbònic: és el tampó més important en el plasma sanguini, on el HCO_3^- es troba en una elevada concentració (mitjana de 24 mM). La concentració del CO_2 és més baixa, però es produeix constantment des dels teixits. El diòxid de carboni reacciona ràpidament amb l'aigua (de fet, l'enzim anhidrasa-carbònica del plasma accelera aquesta reacció) i genera àcid carbònic. El pK_a d'aquest àcid és 6,1, lluny del pH plasmàtic (7,2), però com que el CO_2 és exhalat contínuament en el pulmó, el conjunt d'aquest sistema tampona efectivament la sang a pH fisiològic:



Si es genera un excés de H^+ , el bicarbonat HCO_3^- els capta, tot el sistema es desplaça cap a l'esquerra i més quantitat de CO_2 és exhalat. En un medi alcalí el H_2CO_3 es dissocia i tot el sistema es desplaça cap a la dreta i en manté el pH.

Tampons no fisiològics

S'utilitzen molt en investigació bioquímica per tal d'evitar els canvis de pH durant reaccions i processos experimentals. N'hi ha molts, però entre els més emprats es troba el Tris: Tris (hidroximetil) aminometà, amb un $\text{pK}_a = 8,1$.

Alguns dels problemes proposats resolts

1.1.- Calculeu les concentracions de les espècies del tampó àcid acètic/acetat sòdic 0,1 M, pH 5,0. Dades: àcid acètic pK_a 4,75. [$\text{CH}_3\text{COOH} = 0,0365$ M i $\text{CH}_3\text{COO}^- = 0,0635$ M]



Apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch a aquest equilibri:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}\right) \quad (1)$$

A més a més, les concentracions de les dues espècies sumen la concentració total del tampó (0,1 M).

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] + [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0.1 \quad (2)$$

Així, tenim un sistema de dues equacions (1 i 2) amb dues incògnites ($[\text{CH}_3\text{COO}^-]$ i $[\text{CH}_3\text{COOH}]$).

$$5,0 = 4,75 + \log\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}\right) \Rightarrow$$
$$0,24 = \log\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}\right)$$

$$\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = \text{antilog}(0,24) \Rightarrow$$
$$\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = 1,738$$

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 1,738 \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

$$1,738 \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}] + [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,1 \Rightarrow$$
$$2,738 \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,1 \Rightarrow$$
$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,0365 \text{ M} \Rightarrow [\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,0635 \text{ M}$$

1.5.- Quin és el pH d'una solució preparada mesclant 0,74 mL d'àcid acètic glacial (17,5 M), 0,58 g d'acetat sòdic sòlid (Mr 82,03) i aigua fins a 200 mL?
Dades: àcid acètic pK_a 4,75. **[pH 4,49]**

L'equilibri del tampó és: $\text{CH}_3\text{COOH} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$

Calculem els mol de cada espècie:

$$\text{Àcid acètic } 0,74 \cdot 10^{-3} \text{ L} \times 17,5 \text{ mol/L} = 0,013 \text{ mol} \Rightarrow$$
$$0,013 \text{ mol} / 0,2 \text{ L} = 0,065 \text{ M} \quad (200 \text{ mL} = 0,2 \text{ L})$$

$$\text{Acetat sòdic } 0,57 \text{ g} / 82,03 \text{ (g/mol)} = 0,007 \text{ mol} \Rightarrow$$
$$0,007 \text{ mol} / 0,2 \text{ L} = 0,035 \text{ M}$$

Si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch a l'equilibri implicat:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}\right)$$
$$\text{pH} = 4,75 + \log(0,035/0,065) = 4,49.$$

1.7.- L'àcid acètic té un pK_a al voltant de 4,7. Les següents solucions tampó d'acetat de pH 4,7: (A) 1 mM, (B) 10 mM i (C) 100 mM

- (a) Ordeneu-les de major a menor capacitat per amortir els canvis de pH resultants de l'addició de H^+ .
- (b) Quina quantitat de H^+ serien capaces d'amortir 100 mL de cadascuna de les tres solucions?
- (c) Si aquestes solucions foren més àcides que pH 4,7, tindrien més o menys capacitat amortidora de H^+ ? I si el pH fóra més alt que 4,7?
- (d) Discussiu les qüestions anteriors en el cas de l'addició de OH^- .

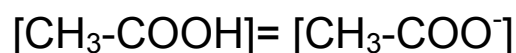
[(a) $C > B > A$; (b) A: 0,05 mmol; B: 0,5 i C: 5]

- (a) Ordeneu-les de major a menor capacitat per amortir els canvis de pH resultants de l'addició de H^+ .**

L'equilibri àcid-base implicat com a amortidor del pH és:



Per a les tres solucions, el pH coincideix amb el pK_a de l'àcid acètic, en aquest pH les concentracions de forma protonada i desprotonada coincideixen (si s'aplica l'equació de Henderson-Hasselbalch):



Així, en aquest pH és on presenten la màxima capacitat amortidora del pH.

Per altra banda, a més concentració d'ambdues espècies, més capacitat tampó tindrà la solució, per això:



- (b) Quina quantitat de H^+ serien capaces d'amortir 100 mL de cadascuna de les tres solucions?**

Calcularem, per a cada solució, la concentració i el nombre de mol de les espècies del tampó:

(A) tampó acetat 1 mM, pH = 4,7

$$4,7 = 4,7 + \log\left(\frac{[CH_3-COO^-]}{[CH_3-COOH]}\right)$$



Si solucionem aquest sistema de dues equacions amb dues incògnites



En 100 mL: mol $\text{CH}_3\text{-COO}^- = 0,1 \text{ L} \times 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} = 0,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$,

i

mol $\text{CH}_3\text{-COOH} = 0,1 \text{ L} \times 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L} = 0,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

Per tant, la quantitat de H^+ que poden ser amortits (“absorbits”) per aquesta solució (A), si es desplaça l’equilibri cap a l’esquerra, gairebé coincideix amb la quantitat de forma desprotonada ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$) del tampó: $0,05 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$

(B) tampó acetat 10 mM, pH= 4,7

De la mateixa manera que hem fet per a (A), arribem a:

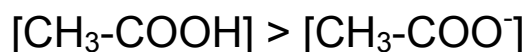
$0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol de H}^+$

(C) tampó acetat 100 mM, pH= 4,7

També arribem en aquest cas a: $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol de H}^+$

(c) Si aquestes solucions foren més àcides que pH 4,7, tindrien major o menor capacitat amortidora de H^+ ? I si el pH fóra més alt que 4,7?

Amb un pH menor que 4,7, la concentració de la forma protonada és major que la de la forma dissociada (fàcilment deduïble de l’equació de Henderson-Hasselbalch)



i així les solucions presentarien una capacitat **més baixa** per a absorbir H^+ , per a amortir la baixada de pH que suposa l’addició de protons.

Amb un pH major que 4,7, la concentració de la forma desprotonada és major que la de la forma protonada (fàcilment deduïble de l’equació de Henderson-Hasselbalch): $[\text{CH}_3\text{-COOH}] < [\text{CH}_3\text{-COO}^-]$. Per això, la capacitat d’absorbir H^+ es veuria **augmentada** i resistiria més la baixada de pH per l’addició de protons.

(d) Discutiú les qüestions anteriors en el cas de l'addició de OH⁻.

L'addició d'una base forta, de OH⁻, consumeix protons (H⁺ + OH⁻ → H₂O), la qual cosa tendeix a augmentar el pH de la solució. En presència d'un tampó, la forma protonada es dissocia (CH₃-COOH → CH₃-COO⁻ + H⁺), repon gran part dels protons consumits i resisteix així la pujada de pH.

Per tant, en l'apartat (a), el raonament és el mateix i així la capacitat de resistir l'augment de pH en eliminar H⁺ per l'addició de OH⁻ de les solucions segueix l'ordre: **C>B>A**. En l'apartat (b), també seguint el mateix raonament, s'arriba a:

OH⁻ amortits per (A)= $0,05 \cdot 10^{-3}$ mol

OH⁻ amortits per (B)= $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol

OH⁻ amortits per (C)= $5 \cdot 10^{-3}$ mol

Per a l'apartat (c), **quan el pH fóra inferior a 4,7, la resistència a l'increment de pH per l'addició de OH⁻ seria major**, ja que la concentració de forma protonada és més gran ([CH₃-COOH]>[CH₃-COO⁻]). Per contra, **amb pH>4,7, la concentració de forma protonada és més petita i així la capacitat d'amortir el canvi de pH per l'addició de OH⁻ és més baixa**.

1.10.- Descriu la preparació d'1 L de tampó fosfat potàssic 0,045 M pH 7,5 partint de:

(a) fosfat monopotàssic (136 Da) i fosfat bipotàssic (174 Da);

(b) solucions 0,045 M dels dos fosfats anteriors;

(c) àcid fosfòric 15 M i KOH 1,5 M;

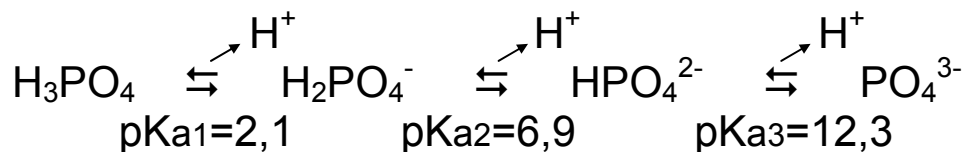
(d) fosfat monopotàssic i KOH sòlid (56 Da);

(e) fosfat bipotàssic i HCl 2 M;

(f) fosfat tripotàssic (212 Da) i HCl 2 M.

Dades: els pK_a de l'àcid fosfòric són: 2,1, 6,9 i 12,3. [Si completem amb aigua fins a 1 L, el tampó contindrà: (a) 6,264 g bipotàssic i 1,224 g monopotàssic; (b) 0,8 L bipotàssic i 0,2 L monopotàssic; (c) 3 mL fosfòric i 54 mL KOH; (d) 6,12 g monopotàssic i 2,02 g KOH sòlid; (e) 7,83 g bipotàssic i 4,5 mL HCl 2 M; (f) 9,54 g tripotàssic i 27 mL HCl 2 M]

L'àcid fosfòric és polipròtic i presenta els equilibris de dissociació següents:



Com que el tampó que s'ha de preparar ha de tenir pH 7,5, les espècies que el compondran són: $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-}$. Aquest equilibri inclou l'interval de pH = pKa \pm 1, és a dir, entre pH 5,9 i pH 7,9. Les altres dues espècies del fosfat (H_3PO_4 i PO_4^{3-}) pràcticament no existeixen en aquest valor de pH i no es consideraran en els càlculs.

Així, l'equilibri implicat: $\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$
si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa}_2 + \log\left(\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}\right) \Rightarrow \\ 7,5 &= 6,9 + \log\left(\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}\right) \Rightarrow \\ 0,6 &= \log\left(\frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}\right) \Rightarrow \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} = 4,0 \quad (1) \end{aligned}$$

A més, la concentració total de fosfat és de 0,045 M, per tant:
 $[\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,045 \text{ M} \quad (2)$

Es resol el sistema de dues equacions (1) i (2) i s'arriba a:

$$\begin{aligned} [\text{H}_2\text{PO}_4^-] &= 0,009 \text{ M} \quad (9 \text{ mM}) \\ [\text{HPO}_4^{2-}] &= 0,036 \text{ M} \quad (36 \text{ mM}) \end{aligned}$$

Aquestes són les concentracions que hi haurà presents de les dues espècies per a obtenir una solució tampó fosfat 0,045 M i pH 7,5. I aquest mateix tampó el podem preparar de diferents maneres dependent d'allò que tinguem al laboratori, per exemple:

(a) Fosfat monopotàssic (136 Da) i fosfat bipotàssic (174 Da).

Quina quantitat de fosfat monopotàssic (KH_2PO_4) i fosfat bipotàssic (K_2HPO_4) es necessita per a preparar 1 L d'aquesta solució tampó?

Com que disposem dels sòlids de les dues espècies implicades en l'equilibri anterior, en forma de sals potàssiques, hem de calcular els grams de cadascuna d'elles que cal afegir per a obtenir la concentració adient en 1 L de solució final:

Fosfat monopotàssic: $1 \text{ L} \times 0,009 \text{ mol/L} \times 136 \text{ g/mol} = 1,224 \text{ g}$

Fosfat bipotàssic: $1 \text{ L} \times 0,036 \text{ mol/L} \times 174 \text{ g/mol} = 6,264 \text{ g}$

El tampó es prepararà dissolent **1,224 g** de fosfat monopotàssic (KH_2PO_4) i **6,264 g** de fosfat bipotàssic (K_2HPO_4) en aigua i completant fins a 1 L. El pH de la solució serà 7,5 (es pot comprovar al pHmetre).

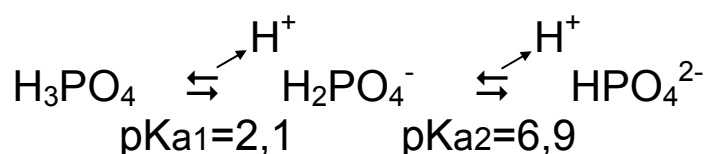
(b) Solucions 0,045 M dels dos fosfats anteriors.

Disposem ja de les solucions següents: fosfat monopotàssic 0.045 M, KH_2PO_4 i fosfat bipotàssic 0,045 M, K_2HPO_4 .

Com hem calculat anteriorment, agafarem 0,009 mol de KH_2PO_4 :
 $0,009 \text{ mol} \times 1 \text{ L} / 0,045 \text{ mol} = \mathbf{0,2 \text{ L}}$. I, a més, agafarem 0,036 mol de K_2HPO_4 :
 $0,036 \text{ mol} \times 1 \text{ L} / 0,045 \text{ mol} = \mathbf{0,8 \text{ L}}$.

(c) Àcid fosfòric 15 M i KOH 1,5 M.

En aquest cas no es disposa de les dues espècies directament implicades en el tampó, sinó que es parteix d'una solució concentrada de la forma totalment protonada: H_3PO_4 , àcid fosfòric. Per dissociar aquesta forma fins aconseguir les dues espècies desitjades, i amb les proporcions adequades per a obtenir un pH de 7,5, es disposa de la base forta KOH (hidròxid potàssic).



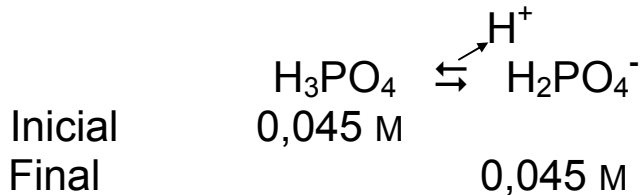
Primerament, prepararem una solució de 0,045 M d'àcid fosfòric, ja que és l'única forma del fosfat de la qual disposem:

$0,045 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} \times \text{L} / 15 \text{ mol} = 0,003 \text{ L} = 3 \text{ mL}$ de H_3PO_4

Després, calcularem el volum de KOH 1,5 M necessari per a dissociar l'àcid fosfòric i desplaçar els equilibris fins arribar a les

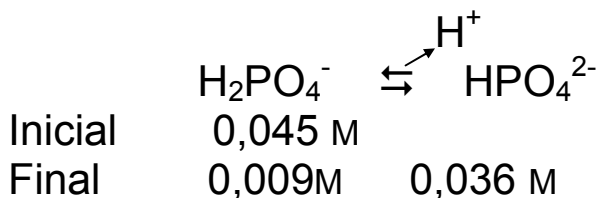
proporcions adients: H_2PO_4^- , 0,009 M i HPO_4^{2-} , 0,036 M. Ho farem de la manera següent:

i) Calcularem quants mol de OH^- (en forma de KOH) són requerits per a dissociar completament 0,045 M de H_3PO_4 i aconseguir una solució 0,045 M de H_2PO_4^- :



$$0,045 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,045 \text{ mol de KOH}$$

ii) Ara afegirem suficient OH^- (KOH) per a aconseguir dissociar 0,036 M de l'espècie H_2PO_4^- i originar 0,036 M de l'espècie HPO_4^{2-}



$$0,036 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,036 \text{ mol de KOH}$$

Sumem les dues quantitats de KOH: $0,045 + 0,036 = 0,081$ mol de KOH.

Calculem ara el volum de KOH 1,5 M que conté 0,081 mol:
 $0,081 \text{ mol} \times 1 \text{ L} / 1,5 \text{ mol} = 0,054 \text{ L} = 54 \text{ mL KOH } 1,5 \text{ M}.$

Per tant, el tampó es prepararà mesclant **3 mL de H_3PO_4 15 M** i **54 mL de KOH 1,5 M**, completant a 1 L amb aigua. La solució tindrà un pH de 7,5.

(d) Fosfat monopotàssic i KOH sòlid (56 Da).

Tot el fosfat de la solució provindrà de la forma H_2PO_4^- , des de la seua sal KH_2PO_4 . Així, calculem els grams d'aquesta sal en què hi ha 0,045 mol:

$$0,045 \text{ mol} \times 136 \text{ g/mol} = 6,12 \text{ g}$$

Ara, amb 0,036 mol KOH es dissociarà l'espècie H_2PO_4^- , per aconseguir 0,036 mol de l'espècie HPO_4^{2-} requerida. Calculem els grams de KOH que contenen 0,036 mol: $0,036 \text{ mol} \times 56 \text{ g/mol} = 2,02 \text{ g}$.

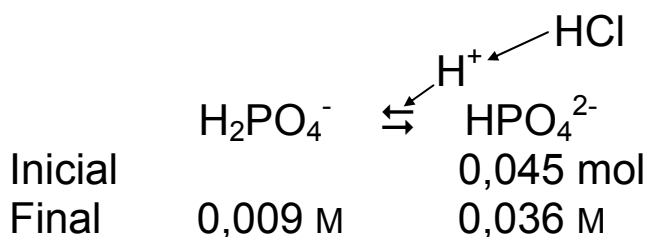
El tampó es prepararà amb **6,12 g de fosfat monopotàssic**, **2,02 g de KOH** i aigua fins a 1 L. El pH d'aquesta solució tampó serà 7,5.

(e) Fosfat bipotàssic i HCl 2 M.

De les dues espècies de la substància tampó, disposem de la forma dissociada (HPO_4^{2-}) com a sal potàssica (K_2HPO_4). Així, tot el fosfat de la solució vindrà des d'aquesta sal, ja que necessitarem 0,045 mol, que en pes són:

$$0,045 \text{ mol} \times 174 \text{ g/mol} = 7,83 \text{ g de } \text{K}_2\text{HPO}_4$$

Amb l'àcid fort, l'àcid clorhídric (HCl), desplaçarem l'equilibri cap a l'esquerra i protonarem 0,009 M (0,009 mol en 1L) de HPO_4^{2-} per a aconseguir 0,009 M (0,009 mol en 1 L) de l'espècie H_2PO_4^- :



Seguidament, calculem el volum de HCl 2 M que conté 0,009 mol:

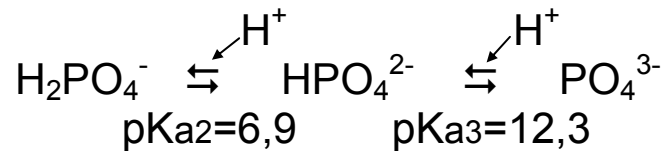
$$0,009 \text{ mol} \times 1 \text{ L} / 2 \text{ mol} = 0,0045 \text{ L} = 4,5 \text{ mL}$$

El tampó es prepararà amb **7,83 g de fosfat bipotàssic**, **4,5 mL de HCl** i aigua fins a 1 L. El pH d'aquesta solució tampó serà 7,5.

(f) Fosfat tripotàssic (212 Da) i HCl 2 M.

Tot el fosfat present en la solució provindrà de l'espècie completament dissociada, PO_4^{3-} , en forma de sal tripotàssica, K_3PO_4 . Amb l'àcid fort, HCl, desplaçarem l'equilibri cap a l'esquerra fins que

aconseguem les espècies HPO_4^{2-} i H_2PO_4^- i en les proporcions adequades:

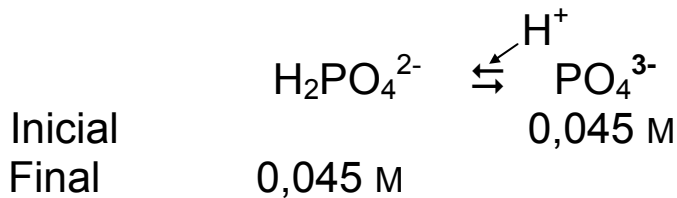


En primer lloc, prepararem una solució 0,045 M fosfat tripotàssic:

$$0,045 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} \times 212 \text{ g/mol} = 9,54 \text{ g de } \text{K}_3\text{PO}_4$$

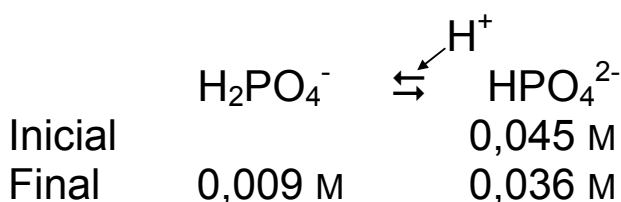
A continuació, calculem el volum de HCl 2 M necessari per a la protonació del PO_4^{3-} :

i) mol de HCl requerits per a protonar completament 0,045 M de PO_4^{3-} i aconseguir una solució 0,045 M de HPO_4^{2-} :



$$0,045 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,045 \text{ mol de HCl}$$

ii) Ara afegirem suficient HCl per a aconseguir protonar 0,009 M de l'espècie HPO_4^{2-} i originar 0,009 M de l'espècie H_2PO_4^-



$$0,009 \text{ mol/L} \times 1 \text{ L} = 0,009 \text{ mol de HCl}$$

Sumem ambdues quantitats de HCl: $0,045 + 0,009 = 0,054$ mol de HCl.

Calculem ara el volum de HCl 2 M que conté 0,054 mol:

$$0,054 \text{ mol} \times 1 \text{ L} / 2 \text{ mol} = 0,027 \text{ L} = 27 \text{ mL HCl 2 M.}$$

Així, el tampó es prepararà mesclant **9,54 g de K_3PO_4** i **27 mL de HCl 2 M**, ajustant a 1 L amb aigua. La solució tindrà un pH de 7,5.

1.11.- Ismael i David són dos estudiants de segon curs que estan realitzant les pràctiques. En una de les sessions prepararen una solució tampó d'acetat sòdic prenent 9,5 mL d'àcid acètic, 3,8 g de NaOH i aigua fins a 1 litre.

(a) Quina és la concentració del tampó que prepararen? I el pH?

Durant la preparació de la solució tampó, un d'ells, per error, afegí 20 mL d'àcid clorhídric 1 M. Ismael suggerí que no importava molt, i va dir: "bah, al cap i a la fi, com que es tracta d'una solució amortidora, el pH no variarà". En canvi, l'opinió del David era ben diferent: "com que el HCl és un àcid fort, segur que el pH de la solució tampó disminueix".

(b) Quin dels dos estudiants té raó? Per què? Calculeu el canvi de pH, si penseu que se n'ha produït una variació.

Dades: àcid acètic (Mr 60,05; densitat 1,05 g/ml, 17,5 M; pK_a 4,75); hidròxid sòdic Mr 40. [(a) 0,166 M, pH 4,88; (b) pH 4,66]

(a) Quina és la concentració del tampó que prepararen? I el pH?

L'equilibri del tampó implicat és:



A partir de la mescla realitzada, calculem les concentracions de l'àcid i de la base conjugada en la solució final:

9,5 mL d'àcid acètic (17,5 M) per a un volum d'1 L

$$9,5 \cdot 10^{-3} \text{ L} \times 17,5 \text{ mol/L} = 0,166 \text{ M} = [\text{CH}_3\text{COOH}]$$

Com que totes les formes del tampó, protonada (CH₃COOH) i desprotonada (CH₃-COO⁻), deriven de l'àcid acètic, **la concentració del tampó és: 0,166 M.**

Ara, si afegim base forta, NaOH, es dissocia l'àcid acètic i es forma acetat. Els mol d'acetat formats són els mateixos que els de NaOH afegit:

$$\text{mol NaOH} = 3,8 \text{ g} / 40 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} = 0,095 \text{ mol, que per a un litre}$$

$$\text{Molaritat de NaOH} = 0,095 \text{ mol} / 1 \text{ L} = 0,095 \text{ M}$$

Per tant, les concentracions d'ambdues espècies del tampó són:

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,095 \text{ M; } [\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,166 - 0,095 = 0,071 \text{ M}$$

Si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log\left(\frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]}\right);$$
$$\text{pH} = 4,75 + \log(0,095/0,071) = 4,88$$

(b) Quin dels dos estudiants té raó? Per què? Calculeu el canvi de pH, si penseu que se n'ha produït una variació.

En afegir un àcid fort, HCl, part dels protons adicionats hauran estat absorbits pel tampó i s'haurà desplaçat l'equilibri àcid-base cap a l'esquerra:



Calculem les concentracions d'ambdues espècies del tampó després de l'addició dels 0,02 mol de HCl a 1 L de solució:

$$[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,095 \text{ M} - 0,02 \text{ M} = 0,075 \text{ M}$$

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,071 + 0,02 = 0,091 \text{ M}$$

Si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch, calculem el pH de la solució resultant després de l'error:

$$\text{pH} = 4,75 + \log(0,075/0,091) = 4,66$$

L'estudiant David és el que té raó encara que el canvi de pH produït ($\Delta\text{pH} = 0,2$ unitats) no és molt importat. El tampó preparat pot, així i tot, ser utilitzat, tot dependrà del seu ús posterior.

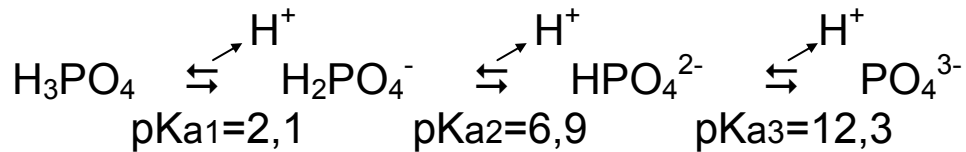
1.12.- Hom pretén estudiar *in vitro* la reacció enzimàtica catalitzada per l'enzim glucoquinasa de fetge de rata:



Per tal de mantenir el pH al voltant de 7,6, que és l'òptim de l'enzim, disposem de dos tampons diferents: fosfat 0,2 M pH 7,6 i Tris 0,2 M pH 7,6. Durant la reacció, es produeixen 0,04 equivalents de H^+/L . Quin és el tampó més adient per mantenir les condicions de la reacció més properes a les òptimes? Per què? Calculeu el pH de cadascun dels tampons al final de la reacció.

Dades: pK_{a2} de l'àcid fosfòric= 6,9; pK_a del Tris= 8,1. [Fosfat pH 7,14; Tris pH 6,72]

El tampó fosfat és polipròtic i els equilibris de dissociació són:



A pH 7,6, les úniques espècies que hi ha i formen el tampó són:



Si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_{a2} + \log\left(\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}\right)$$

$$7,6 = 6,9 + \log\left(\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}\right) \Rightarrow 0,7 = \log\left(\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}\right)$$

$$\frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]} = 5,0 \quad (1) \text{ i també: } [HPO_4^{2-}] + [H_2PO_4^-] = 0,2 \text{ M} \quad (2)$$

Si resollem el sistema de dues equacions, arribem a:

Fosfat monopotàssic: $[H_2PO_4^-] = 0,033 \text{ M} \text{ (33 mM)}$

Fosfat bipotàssic: $[HPO_4^{2-}] = 0,167 \text{ M} \text{ (167 mM)}$

Aquestes són les concentracions presents perquè el tampó fosfat 0,2 M tinga un pH 7,6.

Si durant la reacció es produeixen 0,04 equivalents de H^+ /L, les concentracions finals (f) d'ambdues espècies seran:

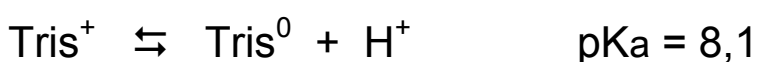
$$[H_2PO_4^-]_f = 0,033 \text{ M} + 0,04 \text{ M} = 0,073 \text{ M}$$

$$[HPO_4^{2-}]_f = 0,167 \text{ M} - 0,04 \text{ M} = 0,127 \text{ M}$$

Amb l'equació de Henderson-Hasselbalch determinem el pH resultant després de l'aparició dels 0,04 mol/L de H^+ .

$$pH = 6,9 + \log\left(\frac{0,127}{0,073}\right) = 6,9 + \log(1,74) = 6,9 + 0,24 = 7,14$$

Amb el Tris, l'equilibri participant com a tampó és:



Amb l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$7,6 = 8,1 + \log \left(\frac{[\text{Tris}^0]}{[\text{Tris}^+] } \right) \Rightarrow -0,5 = \log \left(\frac{[\text{Tris}^0]}{[\text{Tris}^+] } \right)$$

$$\frac{[\text{Tris}^0]}{[\text{Tris}^+] } = 0,316 \quad (1)$$

$$\text{i també } [\text{Tris}^0] + [\text{Tris}^+] = 0,2 \text{ M} \quad (2)$$

Si resollem el sistema de dues equacions, tenim:

$$[\text{Tris}^+] = 0,152 \text{ M (152 mM)}$$

$$[\text{Tris}^0] = 0,048 \text{ M (48 mM)}$$

Aquestes són les concentracions presents perquè el tampó Tris 0,2 M tinga un pH 7,6.

Si durant la reacció es produeixen 0,04 equivalents de H^+/L , les concentracions finals (f) d'ambdues espècies seran:

$$[\text{Tris}^+]_f = 0,152 \text{ M} + 0,04 \text{ M} = 0,192 \text{ M}$$

$$[\text{Tris}^0]_f = 0,048 \text{ M} - 0,04 \text{ M} = 0,008 \text{ M}$$

i si apliquem de nou l'equació de Henderson-Hasselbalch, determinem el pH resultant:

$$\text{pH} = 8,1 + \log \left(\frac{0,008}{0,192} \right) = 8,1 + \log(0,042) = 8,1 - 1,38 = 6,72$$

Amb els resultats obtinguts, **el tampó fosfat és més adient** per a mantenir el pH del medi de reacció el més prop possible del pH òptim de l'enzim. Amb fosfat com a tampó, el pH descendeix des de 7,6 a 7,14, mentre que amb Tris el descens és més important, de 7,6 a 6,72.

2.1.- El aminoàcids contenen grups dissociables i poden ser utilitzats com a substàncies amortidores de pH. Descriu la preparació de 500 mL de solució tampó glicina de concentració 0,1 M i pH 3,0 a partir de:

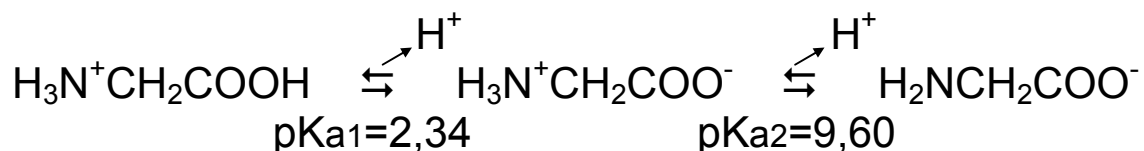
(a) La sal sòlida de clorhidrat de glicina ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH}\cdot\text{Cl}^-$; Mr 110,45) i NaOH sòlid (Mr 40).

(b) La sal glicinat sòdic ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-\cdot\text{Na}^+$; Mr 98) i HCl 1 M.

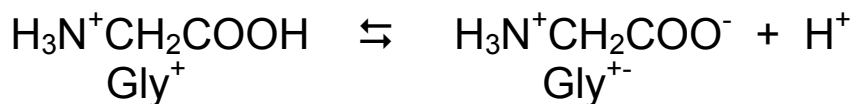
(c) Glicina isoelèctrica sòlida ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$; Mr 75) i HCl 1 M.

Dades: pK_{a1} 2,34; pK_{a2} 9,60. [(a) 5,52 g de clorhidrat de glicina; 1,69 g de NaOH i aigua fins 500 mL; (b) 4,9 g glicinat sòdic; 59 mL HCl 1 M i aigua fins 500 mL; (c) 3,75 g glicina, 9 mL HCl 1 M i aigua fins 500 mL]

La glicina és dipròtica i així els equilibris de dissociació són:



A pH 3,0 les úniques espècies que hi ha i formen el tampó són:



Si apliquem l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa}_1 + \log\left(\frac{[\text{Gly}^{+ -}]}{[\text{Gly}^+]}\right)$$

$$3,0 = 2,34 + \log\left(\frac{[\text{Gly}^{+ -}]}{[\text{Gly}^+]}\right) \Rightarrow 0,66 = \log\left(\frac{[\text{Gly}^{+ -}]}{[\text{Gly}^+]}\right)$$

$$\frac{[\text{Gly}^{+ -}]}{[\text{Gly}^+]} = 4,57 \quad (1) \quad \text{i també: } [\text{Gly}^{+ -}] + [\text{Gly}^+] = 0,1 \text{ M} \quad (2)$$

Si resollem el sistema de dues equacions, arribem a:

$$[\text{Gly}^+] = 0,018 \text{ M} \quad (18 \text{ mM})$$

$$[\text{Gly}^{+ -}] = 0,082 \text{ M} \quad (82 \text{ mM})$$

Aquestes són les concentracions presents perquè el tampó glicina/glicinat 0,1 M tinga pH 3,0.

Calculem ara els mol de cada espècie en la solució:

$$\text{Gly}^+: 0,5 \text{ L} \times 0,018 \text{ mol/L} = 0,009 \text{ mol}$$

$$\text{Gly}^{+ -}: 0,5 \text{ L} \times 0,082 \text{ mol/L} = 0,041 \text{ mol}$$

$$\text{i la concentració total: } 0,5 \text{ L} \times 0,1 \text{ mol/L} = 0,05 \text{ mol}$$

(a) La sal sòlida de clorhidrat de glicina ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH} \cdot \text{Cl}^-$; Mr 110,45) i NaOH sòlid (Mr 40).

Tota la glicina de la solució provindrà de la Gly⁺, des de la seua sal clorhidrat de glicina (Gly⁺Cl⁻). Així, calculem els grams d'aquesta sal:

$$0,05 \text{ mol} \times 110,45 \text{ g/mol} = 5,52 \text{ g de clorhidrat de glicina}$$

Amb NaOH desplaçarem l'equilibri cap a la dreta fins que aconseguim 0,041 mol de l'espècie Gly^{+ -}:

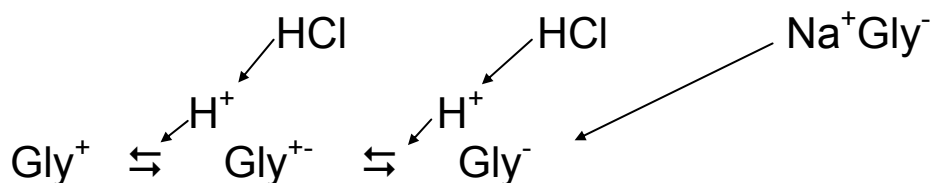
$$0,041 \text{ mol} \times 40 \text{ g/mol} = 1,69 \text{ g de NaOH}$$

(b) La sal glicinat sòdic ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^- \cdot \text{Na}^+$; Mr 98) i HCl 1 M.

Ara tota la glicina de la solució provindrà de l'espècie completament dissociada, Gly^- , en forma de sal glicinat sòdic (Na^+Gly^-). Així, calculem els grams d'aquesta sal:

$$0,05 \text{ mol} \times 98 \text{ g/mol} = 4,9 \text{ g de glicinat sòdic}$$

Amb l'àcid fort, HCl, desplaçarem l'equilibri cap a l'esquerra fins que aconseguim les espècies Gly^{+-} i Gly^+ i en les proporcions adequades:



La addició de 0,05 mol de HCl protona completament 0,05 mol de Gly^- per a aconseguir 0,05 mol de Gly^{+-} . Ara afegirem suficient HCl per a aconseguir protonar 0,009 mol de l'espècie Gly^{+-} i originar 0,009 mol de l'espècie Gly^+

Sumem ambdues quantitats de HCl: $0,05 + 0,009 = 0,059$ mol de HCl.

Calculem ara el volum de HCl 1 M que conté 0,059 mol:

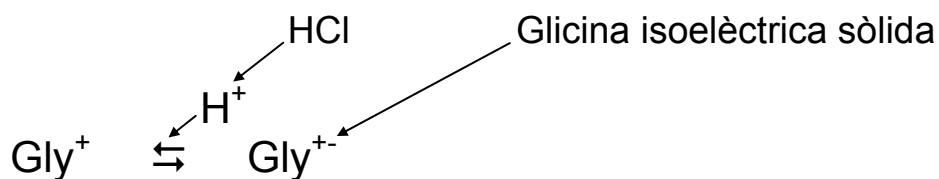
$$0,059 \text{ mol} / 1(\text{mol/L}) = 0,059 \text{ L} = 59 \text{ mL HCl 1 M.}$$

(c) Glicina isoelèctrica sòlida ($\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$; Mr 75) i HCl 1 M.

L'espècie Gly^{+-} és l'única disponible així que els grams a pesar per a tenir 0,05 mol són:

$$0,05 \text{ mol} \times 75 \text{ g/mol} = 3,75 \text{ g de glicina isoelèctrica}$$

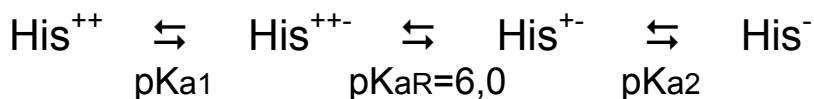
Afegirem HCl per a desplaçar l'equilibri cap a l'esquerra fins que aconseguim 0,009 mol de Gly⁺:



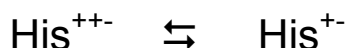
$$0,009 \text{ mol} / 1 \text{ (mol/L)} = 0,009 \text{ L} = \mathbf{9 \text{ mL HCl 1 M}}$$

2.2.- El valor de pK_a del grup imidazole de la histidina és 6,0. A pH 7,0, quin percentatge de molècules d'histidina tindran protonat el grup imidazole? Si la concentració de la histidina en la solució de pH 7,0 és 15 mM, quin volum de HCl 1 M hauria d'afegir-se a 1 litre de solució per arribar al 90 % de les molècules amb el grup imidazole amb càrrega? Quin valor de pH tindria la solució després d'afegir HCl? [**His⁺⁺⁻ 9,09 %; 12,14 mL; pH 5,05**]

Abreujadament els equilibris de dissociació de la histidina són:



A pH 7,0 les úniques espècies que hi ha són:



Amb l'equació de Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa}_R + \log\left(\frac{[\text{His}^{+-}]}{[\text{His}^{++-}]}\right)$$

$$7,0 = 6,0 + \log\left(\frac{[\text{His}^{+-}]}{[\text{His}^{++-}]}\right) \Rightarrow 1 = \log\left(\frac{[\text{His}^{+-}]}{[\text{His}^{++-}]}\right)$$

$$[\text{His}^{+-}]/[\text{His}^{++-}] = 10 \text{ i també: } [\text{His}^{+-}] + [\text{His}^{++-}] = 100 \text{ (\%)}$$

$$\text{i arribem a: } \mathbf{[\text{His}^{+-}] = 90,9 \% \text{ i } [\text{His}^{++-}] = 9,1 \%}$$

Sent la concentració total 15 mM, podem calcular les concentracions de cadascuna de les espècies:

$$[\text{His}^{+-}] = 90,9 \% \times 15 \text{ mM} \Rightarrow \mathbf{13,635 \text{ mM}}$$

$$i [\text{His}^{++}] = 9,1 \% \times 15 \text{ mM} \Rightarrow 1,365 \text{ mM}$$

Per saber el volum d'HCl necessari per a produir el canvi en els percentatges de les espècies calculem les concentracions finals d'aquestes:

	His^{++}	\rightleftharpoons	His^{+-}
Inicial	1,365 mM (9,1%)		13,635 mM (90,9%)
Final	13,5 mM (90%)		1,5 mM (10%)

mol HCl a afegir = $13,5 \text{ mM} - 1,365 \text{ mM} = 12,13 \text{ mM} = 0,0121 \text{ mol}$
i el volum d'HCl 1M necessari: $0,0121 \text{ mol} / 1 \text{ (mol/L)} = 0,0121 \text{ L} = 12,13 \text{ mL}$.

Podem conèixer el pH final aplicant de nou l'equació de Henderson-Hasselbalch:

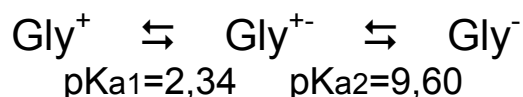
$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{aR}} + \log\left(\frac{[\text{His}^{+-}]}{[\text{His}^{++}]}\right)$$

$$\text{pH} = 6,0 + \log(10/90) = 6,0 + \log(0,11) = 5,05$$

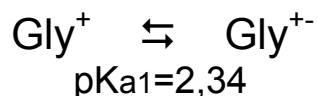
2.5.- Indiqueu la càrrega neta (+, zero, -) de Gly, Asp, Lys i His a pH: 1; 2,1; 4 i 10. [Els resultats es mostren en la Taula.]

Com a exemples calcularem la càrrega de la Gly als diferents pH:

Els equilibris corresponents de la glicina són:



A pH 1,0 només considerem l'existència del primer equilibri de dissociació:



i així podem establir el següent sistema d'equacions expressant les concentracions com a fraccions molars :

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pK}_{\text{a1}} + \log\left(\frac{[\text{Gly}^{+-}]}{[\text{Gly}^+]}\right) \\ [\text{Gly}^+] + [\text{Gly}^{+-}] &= 1 \end{aligned}$$

$$1,0 = 2,34 + \log ([\text{Gly}^{+-}]/[\text{Gly}^{+}]) \Rightarrow [\text{Gly}^{+-}]/[\text{Gly}^{+}] = 0,046$$

i arribem a:

$$\begin{aligned}[\text{Gly}^{+}] &= 0,96 \\ [\text{Gly}^{+-}] &= 0,04\end{aligned}$$

La càrrega neta (Q) és: $0,96 (+) + 0,04 (0) = +0,96$

A pH 2,1, de nou només existeix el primer equilibri i aplicant de nou el sistema de dues equacions anterior (però ara amb pH 2,1), arribem a:

$$\begin{aligned}[\text{Gly}^{+}] &= 0,63 \\ [\text{Gly}^{+-}] &= 0,365\end{aligned}$$

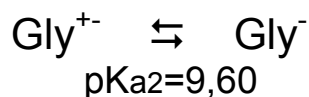
La Q = $0,63 (+) + 0,365 (0) = +0,63$

A pH 4,0, considerem com a bona aproximació que només existeix el primer equilibri. Amb el sistema de dues equacions (pH 4,0) arribem a:

$$\begin{aligned}[\text{Gly}^{+}] &= 0,02 \\ [\text{Gly}^{+-}] &= 0,98\end{aligned}$$

i $Q = 0,02 (+) + 0,98 (0) = +0,02$ (proper per tant al punt isoelèctric (pI) de l'aminoàcid)

A pH 10 només existeix el segon equilibri de dissociació:



i ara el sistema d'equacions a aplicar és:

$$\begin{aligned}\text{pH} &= pK_{a2} + \log ([\text{Gly}^{-}]/[\text{Gly}^{+-}]) \\ [\text{Gly}^{+-}] + [\text{Gly}^{-}] &= 1\end{aligned}$$

$$10 = 9,6 + \log ([\text{Gly}^{-}]/[\text{Gly}^{+-}]) \Rightarrow [\text{Gly}^{-}]/[\text{Gly}^{+-}] = 2,51$$

i:

$$\begin{aligned}[\text{Gly}^{-}] &= 0,72 \\ [\text{Gly}^{+-}] &= 0,28\end{aligned}$$

La càrrega neta: $Q = 0,28 (0) + 0,72 (-) = -0,72$

ANNEX II

Nocions bàsiques per a la resolució de problemes d'enzimologia

Determinació de paràmetres cinètics: $V_{m\grave{a}x}$, K_m , k_{cat} i k_{cat}/K_m

Determinació gràfica de K_m i $V_{m\grave{a}x}$

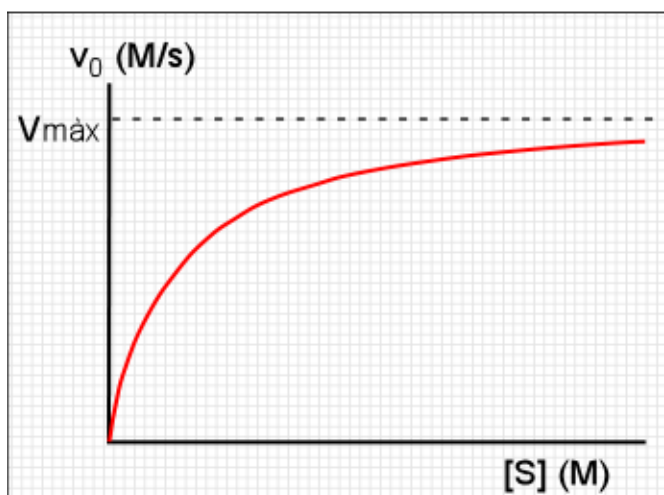
En els problemes en què s'han de deduir paràmetres cinètics a partir de dades de $[S]$ i de v_0 , sempre cal obtenir primerament els valors dels inversos i indicar correctament les unitats que els corresponga. Aquests valors s'utilitzen per a fer una representació de dobles inversos (Lineweaver-Burk).

Amb paper mil·limetrat es representen els valors inversos de concentració de substrat, és a dir $1/[S]$ (o el que és el mateix, $[S]^{-1}$, eix x, abscisses) enfront dels valors inversos de v_0 , és a dir $1/v_0$ (o el que és el mateix, v_0^{-1} , eix y, ordenades) corresponents. Centreu la gràfica i utilitzeu una escala adequada per als valors representats. Indiqueu **sempre**, sobre els eixos de la gràfica, allò que es representa i les unitats que els corresponen. Ajusteu els punts obtinguts a una recta.

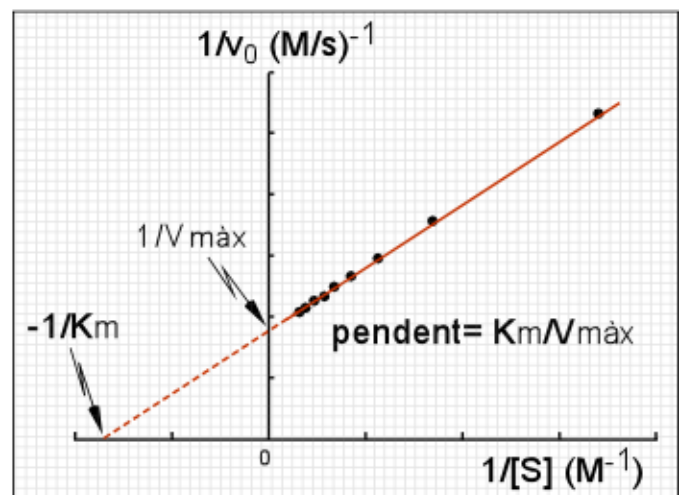
Deduïu el punt de tall amb l'eix d'ordenades (eix y), que correspon a $1/V_{m\grave{a}x}$. Extrapoleu la recta fins que talle l'eix d'abscisses (eix x), que es correspon amb $-1/K_m$. A partir d'aquests valors, que tindran unitats inverses, calculeu les magnituds de $V_{m\grave{a}x}$ i K_m , respectivament. Recordeu incloure les unitats corresponents.

$$v_0 = \frac{V_{m\grave{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{m\grave{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\grave{a}x}}$$



Representació directa



Representació dobles inversos

La velocitat de reacció v_0 es defineix com la variació de la concentració de substrat o producte amb el temps, per tant, les unitats de v_0 són M/s ($M \cdot s^{-1}$) o els seus submúltiples (mM/s, μ M/s, etc). No obstant això, moltes vegades se'ns proporciona només l'activitat enzimàtica, que expressa la quantitat de substrat transformat o producte generat per unitat de temps i així les unitats són: mol/s ($\text{mol} \cdot s^{-1}$) o els seus submúltiples. En aquests casos, es procedeix d'igual manera considerant l'activitat enzimàtica com a v_0 . En altres ocasions, fins i tot s'utilitzen unitats arbitràries per a expressar v_0 , i també el procediment és el mateix. Només heu de considerar en aquests casos que la $V_{\text{màx}}$ deduïda tindrà les mateixes unitats que aquelles de v_0 proporcionades.

Molt sovint, les magnituds de concentració o de v_0 proporcionades són molt petites, per exemple 10^{-5} . Per tal d'evitar arrossegat molts decimals o els exponencials durant la representació gràfica i així facilitar els càlculs posteriors, prèviament les magnituds es multipliquen per un factor (en l'exemple $\times 10^5$) que converteix els valors numèrics en altres molt més manejables. Aquest factor multiplicador s'ha d'indicar, juntament amb les unitats, en la Taula de dades que conté els valors resultants. Cal tenir en compte aquest factor per a obtenir els valors inversos i els valors finals dels paràmetres cinètics.

Càlcul del nombre de recanvi o k_{cat}

El nombre de recanvi (k_{cat}) es calcula a partir de la $V_{\text{màx}}$ deduïda gràficament sabent que $V_{\text{màx}} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0$. On $[E]_0$ és la concentració total d'enzim. Així, $k_{\text{cat}} = V_{\text{màx}}/[E]_0$, i les unitats resultants, s^{-1} (o min^{-1}). Amb enzims oligomèrics, amb més d'un centre actiu, cal dividir pel nombre de centres actius. El nombre de recanvi expressa la quantitat màxima (en mol/L o mol) de substrat transformat per unitat de temps (habitualment segons) i per mol/L o mol de centre actiu d'enzim.

Sempre cal tenir en compte la manera en què s'expressa la v_0 , ja que la quantitat o concentració total d'enzim ($[E]_0$) ha de venir expressada de manera similar a v_0 per poder calcular la k_{cat} . Per exemple, quan la v_0 s'expressa en mM/s, la concentració total d'enzim haurà d'estar expressada en mM. Però si v_0 apareix en mol/s, aleshores cal expressar la quantitat d'enzim, o de centres actius, en mol.

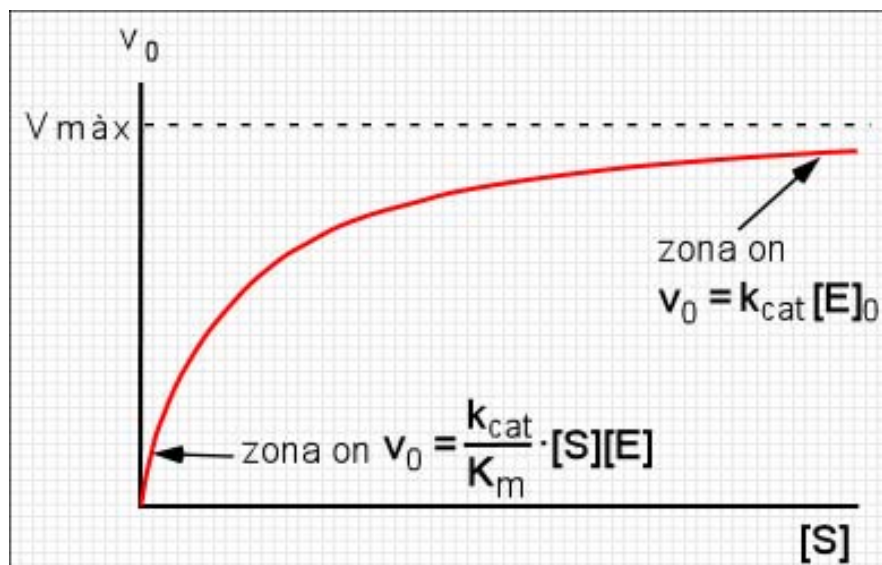
Sovint s'ha de calcular la concentració molar total o el nombre total

de mol de l'enzim a partir dels grams o dels grams/L que proporciona l'enunciat del problema. En aquest cas, ha d'indicar la massa molecular de l'enzim.

Determinació de l'eficàcia catalítica d'un enzim

El quocient k_{cat}/K_m és una constant cinètica de segon ordre *aparent* i així té unitats de $M^{-1}\cdot s^{-1}$. Aquesta constant combina, en el mecanisme de Michaelis-Menten ($E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow E + P$), l'efectivitat de la transformació del substrat unit (ES) en producte (P, segona etapa del mecanisme) i l'efectivitat de la unió productiva del substrat (S) i de l'enzim (E) lliures (primera etapa). Freqüentment, el quocient k_{cat}/K_m es considera indicatiu de l'eficàcia dels enzims.

La identificació de k_{cat}/K_m com a constant de segon ordre i de la seua importància com a indicador de l'eficiència dels enzims es pot veure clarament quan la concentració de S és baixa, quan $[S] \ll [E]_0$. En aquestes condicions, l'aproximació, $[E] \approx [E]_0$, duu a l'equació cinètica de segon ordre: $v_0 = (k_{cat}/K_m)[S][E]$ (realment aquesta equació és vàlida per a qualsevol $[S]$), la qual origina el tram recte en la representació de Michaelis-Menten de v_0 enfront de la $[S]$.



El quocient k_{cat}/K_m sovint es coneix com a *constant d'especificitat* perquè informa de la preferència d'un enzim per substrats alternatius.

Exemple de resolució de problema d'obtenció de paràmetres cinètics d'un enzim: problema 3.10.

3.10.- Un enzim (Mr 29 600) catalitza la reacció:



El seguiment del procés s'efectua neutralitzant amb NaOH 0,1 M els protons que apareixen en 1 min d'incubació a 30 °C en tampó fosfat ($pK_{a2} = 6,9$), 6 mM, pH 6,9. Cada volum d'assaig conté 1 µg d'enzim. A partir de les dades de la Taula, calculeu:

$[S] \cdot 10^5$ (M)	volum de NaOH per a tornar a pH 6,9 (mL)
0,3	1,04
0,5	1,45
1,0	2,25
3,0	3,38
9,0	4,05

- (a) K_m ;
- (b) $V_{m\grave{a}x}$, expressada com a mols H^+ /min;
- (c) el nombre de recanvi.

[(a) K_m 10 µM; (b) $V_{m\grave{a}x}$ 446 µmol $H^+ \cdot \text{min}^{-1}$; (c) nombre de recanvi $2,2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$]

En la reacció catalitzada per aquest enzim, els protons són un dels productes i són aquests els mesurats per a obtenir la v_0 . La variació de la concentració de H^+ amb el temps es determina a partir dels mL de NaOH necessaris per a neutralitzar-los. Pot considerar-se una manera indirecta d'estimació de la velocitat de la reacció. En la Taula, la concentració del substrat apareix multiplicada per un factor 10^5 , i açò significa que les $[S]$ emprades realment són les següents (*el desenvolupament que ve immediatament a continuació té la intenció de facilitar l'explicació d'aquest exemple i NO cal fer-lo usualment en la resolució dels problemes*):

$[S]$ (M)	$[S] \cdot 10^5$ (M)	$1/[S]$ (M^{-1})	$(1/[S]) \cdot 10^5$ (M^{-1})
$0,3 \cdot 10^{-5}$	0,3	$3,33 \cdot 10^5$	3,33
$0,5 \cdot 10^{-5}$	0,5	$2,0 \cdot 10^5$	2,0
$1,0 \cdot 10^{-5}$	1,0	$1,0 \cdot 10^5$	1,0
$3,0 \cdot 10^{-5}$	3,0	$0,33 \cdot 10^5$	0,33
$9,0 \cdot 10^{-5}$	9,0	$0,11 \cdot 10^5$	0,11

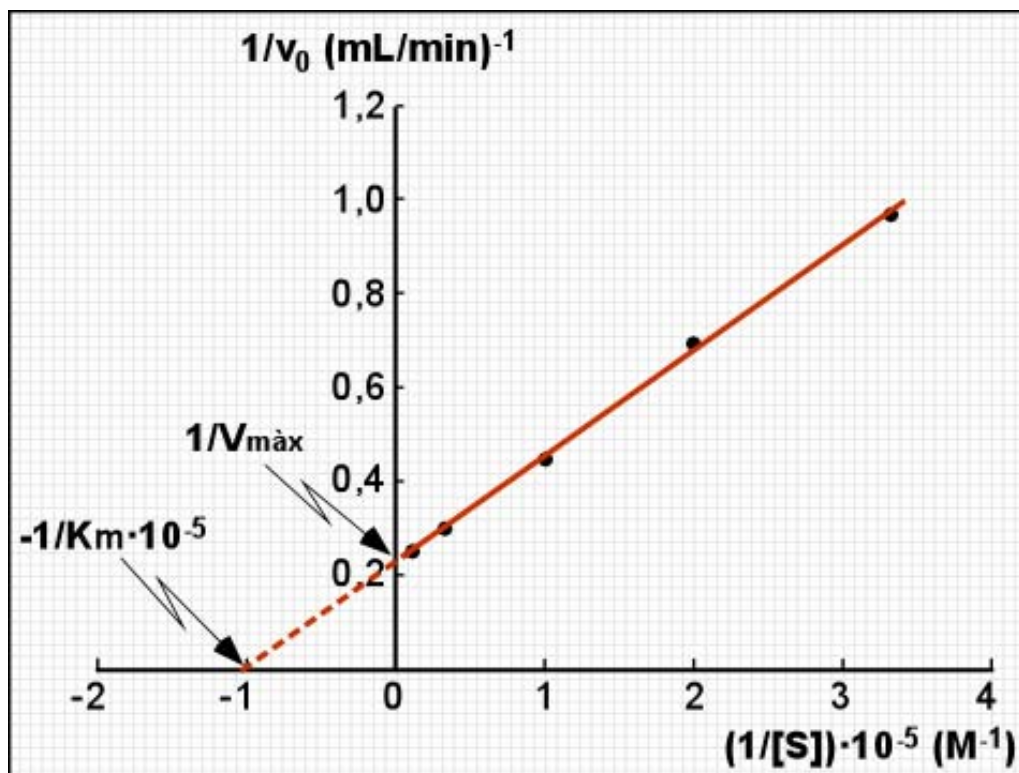
Per a facilitar els càlculs, tots els valors de $[S]$ ha estat multiplicats

per 10^5 i queda indicat dalt de la columna corresponent. A l'hora d'obtenir els inversos, els valors numèrics els multipliquem pel factor 10^{-5} , i de nou ho indiquem en la seua columna.

Calculem també els inversos de v_0 . En aquest cas, la velocitat és donada en mL/min (mL de NaOH 0,1 M necessaris per a neutralitzar els H^+ generats). Construïm una nova Taula amb els dobles inversos:

$(1/[S]) \cdot 10^{-5} (M^{-1})$	$(1/v_0) (mL/min)^{-1}$
3,33	0,961
2,0	0,690
1,0	0,444
0,33	0,296
0,11	0,247

Representem aquestes dades, $1/[S] \cdot 10^{-5} M^{-1}$ en abscisses i $1/v_0 (mL/min)^{-1}$ en ordenades.



Des de la gràfica obtenim:

(a) K_m .

$$(-1/K_m) \cdot 10^{-5} = -1 \Rightarrow K_m = 1 \cdot 10^{-5} M = 10 \mu M$$

(b) $V_{m\grave{a}x}$, expressada com a mols H^+ /min.

$1/V_{m\grave{a}x} = 0,2244 \Rightarrow V_{m\grave{a}x} = 4,46 \text{ mL/min}$, que hem de passar a unitats de mol de H^+ /min, per a la qual cosa tenim en compte la concentració de NaOH utilitzat:

$$V_{m\grave{a}x} = 4,46 \text{ mL/min} \times 0,1 \text{ mol/L} \times 1\text{L}/10^3\text{mL} = 0,000446 \text{ mol/min} = 446 \mu\text{mol } H^+/\text{min}$$

(c) El nombre de recanvi.

El nombre de recanvi (k_{cat}) el calculem a partir de la $V_{m\grave{a}x}$ deduïda gràficament quan sabem que $V_{m\grave{a}x} = k_{cat} \cdot [E]_0$. Primer calculem la quantitat d'enzim en mol, unitats en què tenim també la velocitat inicial (mol H^+ /min). Segons l'enunciat, cada mesura ha estat obtinguda amb $1 \mu\text{g}$ ($1 \cdot 10^{-6} \text{ g}$) d'enzim, la massa molecular del qual és de 29 600, així:

$$\text{Mol totals d'enzim} = 1 \cdot 10^{-6} / 29\ 600 = 3,38 \cdot 10^{-11} \text{ mol}$$

$$\text{Nombre de recanvi} = k_{cat} = V_{m\grave{a}x} \text{ (mol/s)} / \text{mol } E_0.$$

$$\text{Nombre de recanvi} = k_{cat} = 446 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} / 3,38 \cdot 10^{-11} \text{ mol d'E} = 132,0 \cdot 10^5 \text{ min}^{-1}$$

dividint ara per 60 per a obtenir-lo en segons:

$$\text{nombre de recanvi} = k_{cat} = 2,2 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$$

Problemes d'inhibició reversible

En general, els problemes d'inhibició es resolen de la mateixa manera descrita anteriorment: utilitzant la representació de dobles inversos per a deduir els paràmetres cinètics K_m i $V_{m\grave{a}x}$ en absència i en presència de l'inhibidor.

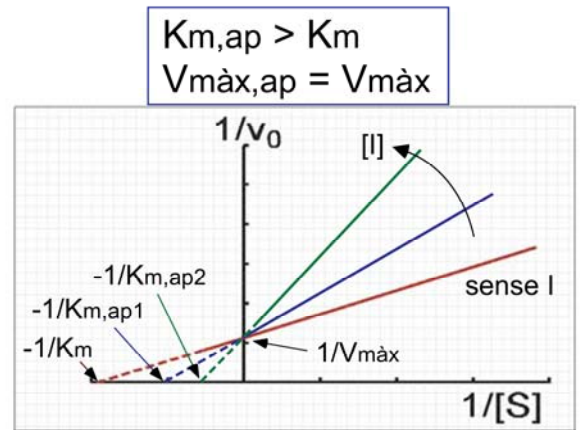
Les representacions gràfiques resultants i la manera en què són modificats els paràmetres cinètics per la presència de l'inhibidor permet deduir el tipus d'inhibició (competitiva, acompetitiva o mixta) exercida per l'inhibidor particular.

Competitiva

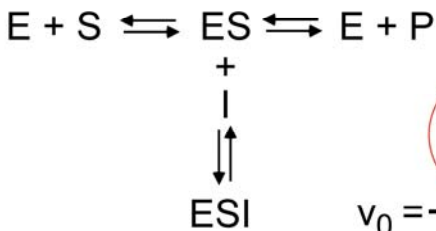


$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

$K_{m,ap}$



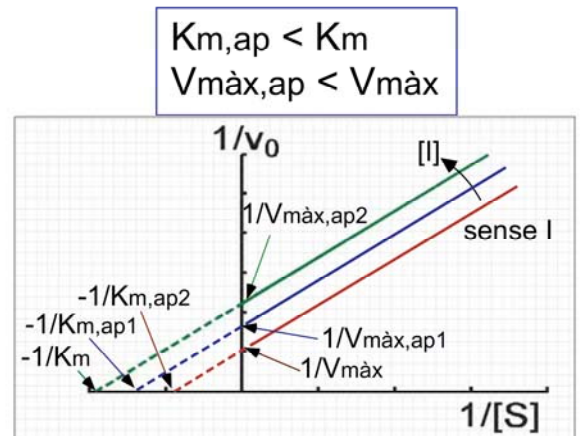
Acompetitiva



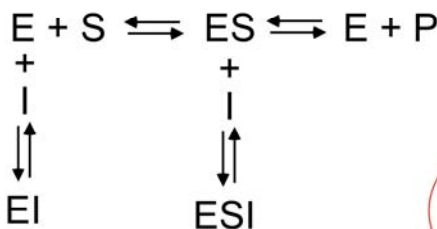
$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]}$$

$V_{\max,ap}$

$K_{m,ap}$

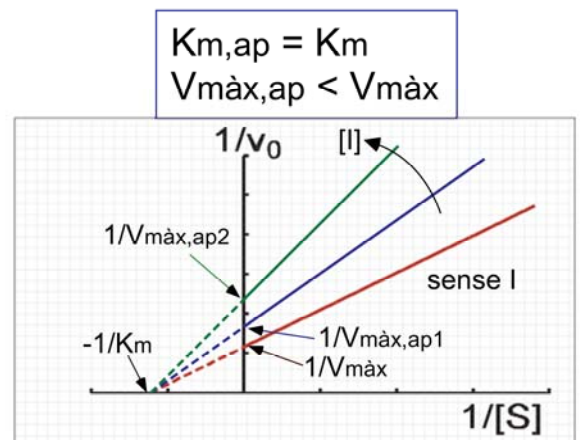


Mixta



$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$V_{\max,ap}$



A partir de $V_{\max,ap}$ i $K_{m,ap}$, paràmetres cinètics resultants de l'anàlisi en presència de l'inhibidor, es dedueix la constant de dissociació de l'inhibidor en l'enzim, K_i .

En la inhibició competitiva, la K_i es determina des de: $K_{m,ap} = K_m \cdot \{1 + ([I]/K_i)\}$.

Per a la inhibició acompetitiva, a partir de: $K_{m,ap} = K_m / (1 + [I]/K_i)$ o de $V_{\max,ap} = V_{\max} / (1 + [I]/K_i)$.

En cas que es tracte d'una inhibició mixta en què l'inhibidor s'uneix igualment a l'enzim lliure (E) i al complex ES, K_i s'obté de:

$$V_{m\grave{a}x,ap} = V_{m\grave{a}x} \cdot \{1 + ([I]/K_i)\}.$$

En tots aquests casos, és necessari conèixer la concentració de l'inhibidor (una dada del problema). La K_i té unitats de concentració (M, o els seus submúltiples).

Exemple de resolució de problema d'inhibició reversible: problema 3.15

3.15.- L'enzim 6-fosfogluconat-deshidrogenasa catalitza la descarboxilació oxidativa de l'àcid 6-fosfogluconic, d'acord amb la reacció següent:



Aquest enzim s'inhibeix per l'agent químic I. Amb les dades cinètiques de la Taula, determineu el tipus d'inhibició exercida per I sobre la 6-fosfogluconat-deshidrogenasa. La concentració de l'àcid 6-fosfogluconic es manté constant i es varia la de NADP^+ .

[NADP ⁺] · 10 ⁵ (M)	v ₀ (unitats arbitràries)	
	control	+I (1,5 · 10 ⁻⁵ M)
2	2,12	1,11
3	2,70	1,47
4	2,94	1,73
6	3,33	2,32
10	3,85	2,78

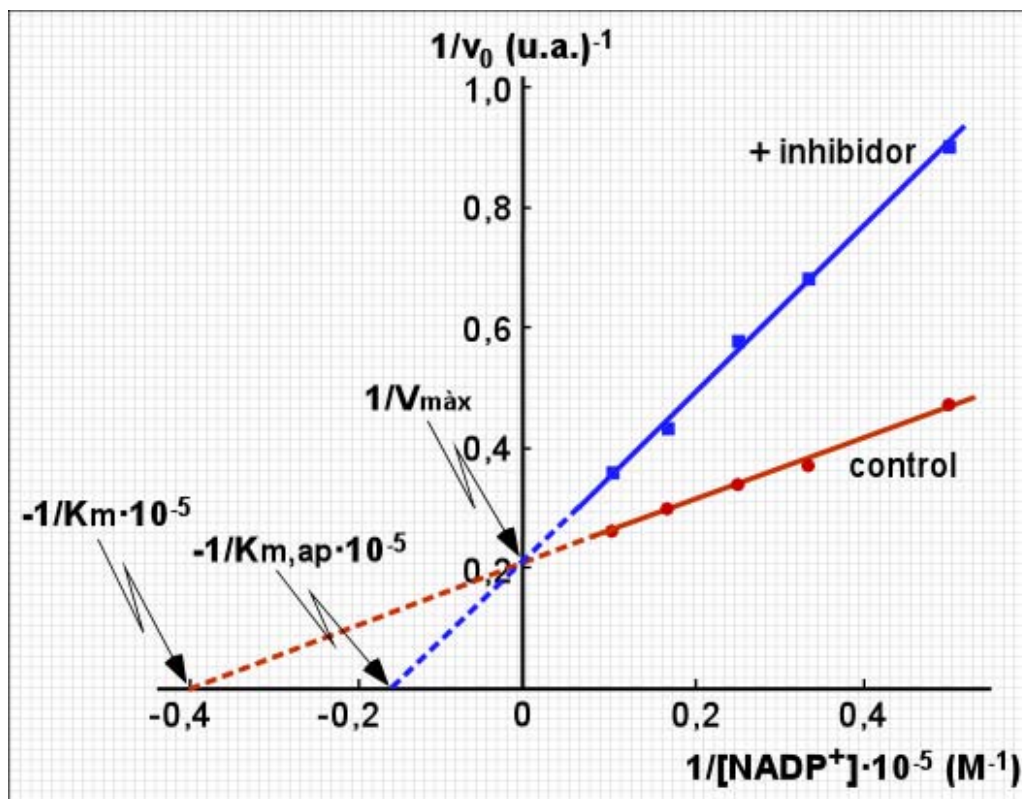
Determineu els paràmetres cinètics (i K_i) en presència i en absència de I. [$V_{m\grave{a}x} = 4,8$ u. a., $K_m = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M; $K_{m(i)} = 6,3 \cdot 10^{-5}$ M; $K_i = 9,8 \mu\text{M}$]

En primer lloc, deduïm els inversos dels valors de concentració del substrat (NADP^+) i de les velocitats inicials (v_0) en absència i presència de l'inhibidor I. En aquest problema, les unitats de velocitat inicial són unitats arbitràries, però això no impedeix poder obtenir els paràmetres cinètics de l'enzim. Això sí, la $V_{m\grave{a}x}$ deduïda estarà en unitats arbitràries.

Així, obtenim la Taula següent:

	$1/v_0$ (unitats arbitràries) ⁻¹	
$1/[NADP^+] \cdot 10^{-5}$ (M ⁻¹)	control	+ I (1,5 · 10 ⁻⁵ M)
0,50	0,47	0,90
0,33	0,37	0,68
0,25	0,34	0,58
0,17	0,30	0,43
0,10	0,26	0,36

A continuació, representem aquests valors ($1/v_0$ vs $1/[S]$), sense oblidar afegir les unitats en els eixos corresponents.



Des de la gràfica obtenim els paràmetres cinètics:

Sense inhibidor: $(-1/K_m) \cdot 10^{-5} = -0,40 \rightarrow K_m = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 Amb inhibidor: $(-1/K_{m,ap}) \cdot 10^{-5} = -0,16 \rightarrow K_{m,ap} = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Amb inhibidor i sense: $1/V_{m\grave{a}x} = 0,21 \rightarrow V_{m\grave{a}x} = 4,8 \text{ u. a.}$

Com que $V_{m\grave{a}x,ap} = V_{m\grave{a}x}$ i $K_{m,ap} > K_m$, la inhibició exercida per l'agent I és de **tipus competitiva**.

Ara podem deduir K_i , ja que: $K_{m,ap} = K_m \{1 + ([I]/K_i)\}$

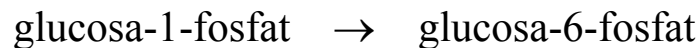
$K_i = [I] / \{(K_{m,ap}/K_m) - 1\} \rightarrow K_i = 1,5 \cdot 10^{-5} / \{(6,3 \cdot 10^{-5} / 2,5 \cdot 10^{-5}) - 1\}$
 $K_i = 0,98 \cdot 10^{-5} = 9,8 \mu\text{M}$

5. Bioenergètica

5.1.- Com és possible que si la reacció de la glucosa en atmosferes oxidants ($\text{glucosa} + 6 \text{O}_2 \rightarrow 6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O}$) és molt exergònica ($\Delta G^{0'} = -2\,872 \text{ kJ/mol}$) aquesta substància siga estable quan s'emmagatzema en recipients del laboratori? Completeu la resposta amb una gràfica.

5.2.- Per tal de determinar el valor de ΔG d'una reacció a l'interior d'una cèl·lula, quina informació necessitariau?

5.3.- Fosfoglucomutasa catalitza la reacció:



Experimentalment, s'ha trobat que la mescla de reacció en l'equilibri conté 5,0 % de glucosa-1-fosfat, a 25 °C. Calculeu (a) la K'_{eq} i (b) $\Delta G^{0'}$ d'aquesta reacció. ($R = 8,32 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$).

[(a) 19; (b) -7,3 kJ/mol]

5.4.- Quina és la direcció de cadascuna de les reaccions següents si totes les substàncies reaccionants estan presents inicialment en quantitats equimoleculares? Utilitzeu les dades de la taula de valors de $\Delta G^{0'}$ adjunta.

- ATP + creatina \rightarrow creatina fosfat + ADP
- ATP + fructosa \rightarrow fructosa-6-fosfat + ADP
- ATP + piruvat \rightarrow fosfoenolpiruvat + ADP
- ATP + glucosa \rightarrow glucosa-6-fosfat + ADP

Molecule	$\Delta G^{0'}$	
	kcal/mol	kJ/mol
Glucose-6-phosphate	-3.3	-13.8
Fructose-6-phosphate	-3.8	-15.9
Glucose-1-phosphate	-5	-20.9
ATP \rightarrow ADP + P_i	-7.3	-30.5
ATP \rightarrow AMP + PP_i	-7.7	-32.2
PP_i	-8.0	-33.5
Phosphocreatine	-10.3	-43.1
Glycerate-1,3-bisphosphate	-11.8	-49.4
Carbamoyl phosphate	-12.3	-51.5
Phosphoenolpyruvate	-14.8	-61.9

En el cas de la reacció (c), calculeu $\Delta G^{0'}$ i la K'_{eq} a 25 °C ($R = 8,32 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$).

[31,4 kJ mol⁻¹; 3,2·10⁵]

5.5.- Calculeu el valor de ΔG fisiològica de la reacció catalitzada per isocitrat-deshidrogenasa a 25 °C i pH 7,0, sabent que:

$$[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 8$$

$$[\alpha\text{-oxoglutarat}] = 0,1 \text{ mM}$$

$$[\text{isocitrat}] = 0,02 \text{ mM}$$

i considerant condicions estàndard per al CO_2 .

(Dades: ΔG^0 de la reacció és -33 kJ mol^{-1} ; $R = 8,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

Aquesta reacció és un possible punt de control metabòlic. Expliqueu-ho.

Calculeu la K'_{eq} .

$$[-34,16 \text{ kJ/mol}; \Gamma = 6,25 \cdot 10^{-1} \text{ M i } K'_{\text{eq}} = 6,22 \cdot 10^5 \text{ M}]$$

5.6.- La relació $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ en cèl·lules de llevat respirant activament és aproximadament 10. Quin ha de ser el valor de la relació $[\text{3-fosfoglicerat}]/[\text{1,3-difosfoglicerat}]$ intracel·lular perquè la reacció ($3\text{PG} + \text{ATP} \rightarrow 1,3\text{BPG} + \text{ADP}$) catalitzada per la fosfoglicerat-quinasa siga termodinàmicament favorable en la direcció de síntesi de 1,3-difosfoglicerat? Hom sap que ΔG^0 de la reacció és 18 kJ mol^{-1} a la temperatura de 25 °C.

[>145]

5.7.- La fosfoarginina és una forma de reserva de grups fosfat en alguns organismes. El valor de ΔG^0 de la hidròlisi d'aquest compost és -32 kJ/mol .

(a) Calculeu ΔG de la reacció que ocorre en músculs a 25 °C i pH 7,0 quan les concentracions de fosfoarginina, arginina i P_i són respectivament 0,07 M, 0,03 M i 0,005 M. ($R = 8,3 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$).

(b) Calculeu el valor de K'_{eq} de la reacció.

(c) Què són ΔG^0 i ΔG ? Per què són diferents?

$$[\Delta G = -47,2 \text{ kJ/mol}; K'_{\text{eq}} = 4,23 \cdot 10^5 \text{ M}]$$

5.8.- Algunes reaccions biosintètiques termodinàmicament desfavorables ($\text{A} \rightarrow \text{B}$) ocorren perquè en acoblar-se a la reacció $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ ($\Delta G^0 = -32 \text{ kJ/mol}$) s'aconsegueix desplaçar sensiblement l'equilibri de la reacció.

(a) Calculeu la K'_{eq} de la reacció biosintètica desfavorable $\text{A} \rightarrow \text{B}$, que té un valor de ΔG^0 de 25 kJ/mol .

(b) Escriviu la reacció acoblada i calculeu-ne el valor de ΔG^0 .

(c) Moltes cèl·lules tenen relacions de $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ de 400 o superiors. Calculeu la relació $[\text{B}]/[\text{A}]$ quan *in vivo* la $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ és de 400, la $[\text{P}_i]$ és de 5 mM i el ΔG de la reacció acoblada és de -15 kJ/mol a 25 °C.

(Dades: $R = 8,3 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$)

$$[K'_{\text{eq}} = 4,03 \cdot 10^{-5}; \Delta G^0 = -7 \text{ kJ/mol}; [\text{B}]/[\text{A}] = 3 \text{ 120}]$$

5.9.- La conversió de glucosa a lactat s'acompanya d'un ΔG^0 de -217 kJ mol^{-1} . En una cèl·lula anaeròbica, aquesta conversió s'acobla a la síntesi de 2 mols de ATP per mol de glucosa.

(a) Calculeu el ΔG^0 de la reacció acoblada (ΔG^0 d'hidròlisi de ATP és $-32,2 \text{ kJ mol}^{-1}$).

(b) Calculeu l'eficiència del procés.

(c) Considerant la mateixa eficiència que en anaerobiosi, quants mols de ATP per mol de glucosa s'obtindrien en un organisme aeròbic on la glucosa és oxidada a CO_2 i H_2O ($\Delta G^0 = -2 867,5 \text{ kJ mol}^{-1}$)?

[(a) -153 kJ mol^{-1} ; (b) 30 %; (c) 26,4 mol ATP/mol glucosa].

5.10.- Una persona d'uns 70 kg consumeix aproximadament 11 700 kJ per dia.

(a) Si considerem que els sistemes d'utilització d'energia tenen una eficiència del 50 % i que ΔG per a la reacció de síntesi de ATP a partir de ADP i P_i és $+50 \text{ kJ/mol}$, calculeu quants grams de ATP sintetitza diàriament aquesta persona? (Dada: ATP, $M_r = 551$).

(b) Si considerem que la quantitat de ATP corporal és d'aproximadament 50 g, calculeu el nombre de vegades que 1 molècula de ATP se sintetitza i degrada cada dia.

[(a) 64,5 kg; (b) 1 290 vegades]

5.11.- Caminar consumeix aproximadament 65 kcal/km. Per a la hidròlisi de ATP ($\text{ADP} + \text{P}_i$), la reacció que impulsa la contracció muscular, el valor de ΔG^0 és $-7,3 \text{ kcal/mol}$ ($-30,5 \text{ kJ/mol}$).

(a) Calculeu quants grams de ATP han de produir-se per a caminar 1 km.

(b) La síntesi de ATP està acoblada a l'oxidació de la glucosa ($\Delta G^0 = -686 \text{ kcal/mol}$). Quants grams de glucosa es metabolitzen realment per produir aquesta quantitat de ATP? (suposeu que l'oxidació de la glucosa solament s'utilitza per a generar ATP i que el 40 % de l'energia generada en aquest procés s'empra per a fosforilar el ADP. La massa molar de la glucosa és 180 g/mol i la del ATP és 507 g/mol).

[4 512,3 g de ATP; 42,6 g de glucosa]

5.12.- Els mamífers de l'Àrtic, per exemple els rens, contenen en les potes i ungles una quantitat d'àcids grassos insaturats superior a la de la resta del cos. Té algun avantatge fisiològic aquest fet?

5.13.- La concentració de creatina en l'orina és aproximadament 40 vegades superior a la del sèrum. Calculeu el valor de ΔG requerit per al pas de creatina des de la sang a l'orina, a 37°C . ($R = 8,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

[9,5 kJ/mol]

5.14.- La concentració extracel·lular de Cl^- és de 123 mM i la intracel·lular és 4 mM. En quina direcció fluirà el Cl^- a través del seu canal obert quan el potencial de membrana es trobe en l'interval de -60 mV a +30 mV?

[-2,7 kJ/mol; -11,37 kJ/mol]

5.15.- Calculeu el cost energètic del funcionament de la bomba sodi-potassi. El potencial de la membrana plasmàtica, on la bomba es localitza, és de -0,07 V en el sentit de fóra cap a dins. L'organisme està a 37 °C, $F= 96,5 \text{ kJ/mol}\cdot\text{V}$. (Dades: $[\text{Na}^+]_i= 10 \text{ mM}$ i $[\text{Na}^+]_e= 140 \text{ mM}$; $[\text{K}^+]_i= 100 \text{ mM}$ i $[\text{K}^+]_e= 5 \text{ mM}$).

[42,5 kJ/mol]

5.16.- El procés de síntesi de ATP en mitocondri està estretament acoblat al transport de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna des de l'espai intermembrana fins a la matriu. S'han mesurat les concentracions de H^+ a ambdós costats de la membrana interna durant aquest procés i ha resultat que a l'espai intermembrana 15 és vegades superior al que hi ha a la matriu; mentre que el potencial transmembrana ($\Delta\Psi$), definit com el potencial en l'interior menys el de l'exterior, resultà que en aquests mitocondris era de -0,15 V.

(a) Calculeu el valor de ΔG de la reacció de tornada d'1 mol de protons cap a la matriu mitocondrial.

(b) A la vista dels valors anteriors, quants mols de protons han de retornar a través de la ATP-sintasa perquè siga possible la síntesi d'1 mol de ATP?

Dades: La reacció de síntesi de ATP té un valor de ΔG^0 de 30,5 kJ/mol i de ΔG de 57 kJ/mol; $R= 8,3 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$; $T= 298 \text{ K}$ i $F= 96 \text{ kJ/mol}\cdot\text{V}$.

[-21,1 kJ/mol; 3 mols de protons]

5.17.- Quin és el rendiment de ATP de la fosforilació oxidativa acoblada a la cadena de transport electrònic si la diferència de potencial estàndard per a la parella NAD^+/NADH és -0,32 V i per a la parella $1/2 \text{ O}_2/\text{H}_2\text{O}$ és +0,82 V? Preneu ΔG^0 d'hidròlisi de ATP com $-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Considereu que en la cèl·lula hi ha condicions estàndard i que en el procés se sintetitzen 2,5 ATP. (Dades: 25 °C, $R= 8,3 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, $F= 96,5 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$)

[34,7%].

5.18.- Quan l'ascorbat és substrat de la cadena respiratòria s'oxida i transfereix 2 electrons al citocrom c. Quina és la relació P/O d'aquest procés? Quina és l'eficiència de la fosforilació oxidativa acoblada a l'oxidació de l'ascorbat? (Dades: E^0 (ascorbat)= 0.08 V; E^0 ($1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$)= +0,82 V; $F=96,4 \text{ kJ mol}^{-1}\text{V}^{-1}$; ΔG^0 hidròlisi ATP= $-30,5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

[10,7%]

5.19.- Com es pot explicar, segons la teoria quimiosmòtica, que el 2,4-dinitrofenol estimule indefinidament el consum d'oxigen en una suspensió de mitocondris? Per què la injecció de 2,4-dinitrofenol a una rata provoca immediatament un augment de la temperatura corporal?

5.20.- La síndrome de Luft està causada, possiblement, per una alteració de la permeabilitat als protons de la membrana mitocondrial interna. Expliqueu els símptomes observats en aquesta malaltia: hipertèrmia, respiració augmentada i debilitat muscular.

5.21.- El teixit adipós marró és una forma de teixit adipós que es troba a la part superior de l'esquena de molts animals joves. Els mitocondris d'aquest teixit tenen una relació P/O < 1 per a la síntesi de ATP acoblada a l'oxidació del NADH. Quina pot ser la possible funció d'aquest teixit?

5.22.- Quan se subministra l'analgèsic Demerol (meperidina) a una suspensió de mitocondris respirant activament, es redueix el consum de O₂ i les relacions NADH/NAD⁺ i Q/QH₂ augmenten considerablement. Què inhibeix el Demerol?

5.23.- Les subunitats *c* del component F₀ de la ATP-sintasa mitocondrial formen un canal iònic a través de la membrana interna. Quan algun dels residus essencials de glutàmic o d'aspàrtic de la subunitat *c* reacciona amb dicitclohexilcarbodiimida (DCCD), la subunitat és incapaç de participar en el transport de H⁺. Com afectarà el DCCD al transport electrònic mitocondrial? Què es podria esperar que passara quan s'afegeix un desacoblador (2,4-DNP) als mitocondris tractats amb DCCD? Com es veuria afectada la síntesi de ATP en els casos anteriors? Raoneu la resposta.

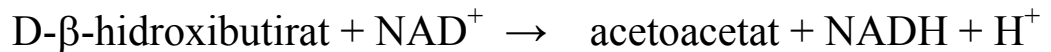
5.24.- Si afegim oligomicina a una suspensió de mitocondris actius, s'observa una disminució del transport electrònic i de la síntesi de ATP. Si després d'aquest tractament amb oligomicina s'afegeix 2,4-dinitrofenol, es produeix un augment de la velocitat del transport d'electrons sense variació de la síntesi de ATP. Què inhibeix l'oligomicina? Doneu una explicació en termes de la teoria quimiosmòtica.

5.25.- Tant l'oligomicina com el cianur inhibeixen la fosforilació oxidativa quan el substrat és NADH o succinat. El dinitrofenol pot usar-se per distingir entre aquests dos inhibidors. Explica-ho.

5.26.- Cal esperar que el NADH afegit a una suspensió de partícules submitocondrials s'oxide? Si el que s'afegeix és citocrom *c*, s'oxidaria?

5.27.- En experiments sobre el funcionament de la cadena respiratòria s'empren mitocondris aïllats als quals se'ls subministra succinat o D- β -hidroxibutirat com a font d'electrons per a la cadena de transport electrònic.

La utilització de D- β -hidroxibutirat es basa en el fet que aquest compost pot actuar com a font de NADH mitocondrial, ja que en matriu mitocondrial una deshidrogenasa el transforma en acetoacetat segons la reacció:



- (a) Discutiu la utilitat de subministrar D- β -hidroxibutirat, en lloc de directament NADH com a font d'electrons en experiments respiratoris amb mitocondris aïllats.
- (b) I si l'experiment s'haguera fet amb partícules submitocondrials, podria haver-se administrat directament NADH? Expliqueu-ho.

5.28.- L'atractilòsid, un inhibidor de la translocasa ADP/ATP, bloca la fosforilació oxidativa en mitocondris; en canvi, en partícules submitocondrials no té aquest efecte. Tanmateix, els desacobladors, els inhibidors del transport d'electrons i l'oligomicina, afecten ambdós sistemes. Expliqueu aquestes observacions.

5.29.- El cianur és tòxic perquè s'uneix als àtoms de Fe^{3+} del complex format pels citocroms *a* i *a*₃, i inhibeix la cadena respiratòria.

- (a) Per què el cianur impideix que l'oxigen accepti electrons de la cadena?
- (b) Un antídote en cas d'enverinament amb cianur és el subministrament immediat de nitrit sòdic (NaNO_2), ja que els nitrits transformen el Fe^{2+} de l'hemoglobina a Fe^{3+} (metahemoglobina). Donada l'afinitat del cianur pel Fe^{3+} del grup hemo, suggeriu de quina manera pot actuar el nitrit per a reduir els efectes del cianur sobre la cadena respiratòria mitocondrial.
- (c) Una altra teràpia utilitzada en casos d'enverinament per cianur consisteix en el subministrament de quantitats elevades de blau de metilè. Expliqueu quin és el fonament d'aquest antídote, sabent que el potencial de reducció en condicions estàndard del blau de metilè ($E^0 = +0,01 \text{ V}$) és similar al de la ubiquinona (+0,04).

5.30.- Una deficiència de coure en una cèl·lula pot causar una alteració en la fosforilació oxidativa. Per què?

5.31.- Per a l'èxit de la teoria quimiosmòtica de Mitchell fou essencial la possibilitat de preparar partícules submitocondrials. L'assaig d'aquestes partícules per observar la síntesi de ATP dóna com a resultat que la producció de ATP és baixa en presència de ADP, O_2 i un tampó fisiològic de pH 7,0. Si considerem que el sistema de transport d'electrons i la partícula F_0F_1 funcionen amb normalitat. Quin canvi, relativament poc important, en el sistema d'assaig, es podria fer per tal que augmentara la fosforilació oxidativa? Per què?

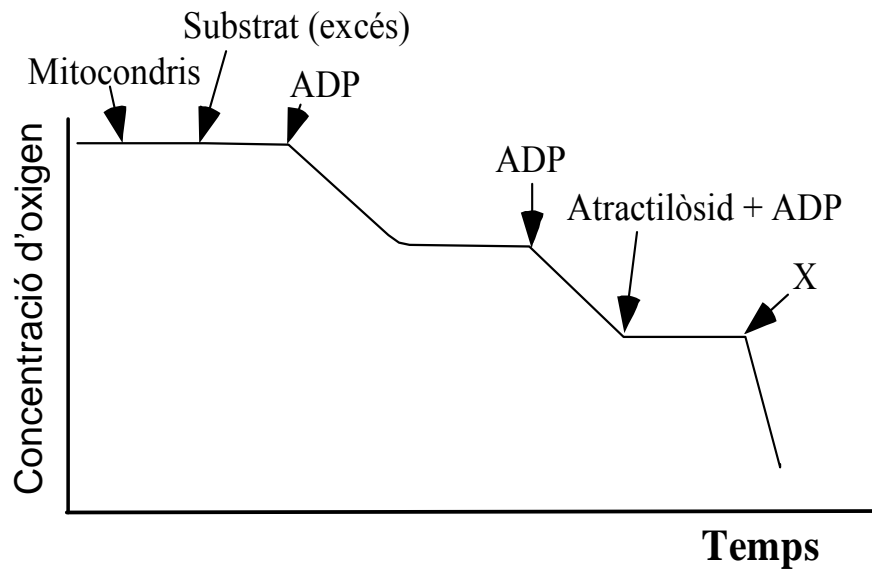
5.32.- En un medi hipotònic, els mitocondris s'unflen i s'afecten llurs membranes. Per consegüent, en aquests mitocondris pot augmentar la velocitat de respiració fins que arribi a ser la de l'estat respiratori 3 (velocitat de respiració màxima perquè no hi ha limitació de O_2 , ADP o substrat reduït), encara que no s'afegisca ADP. A més, simultàniament amb l'augment de la velocitat de respiració, la P/O disminueix a 0. Suggerix una explicació a aquestes observacions. Si en lloc de mitocondris foren cloroplastos, què passaria?

5.33.- Dibuixeu una gràfica, com les que es mostren més avall, que representi l'evolució del consum d'oxigen en funció del temps (línea contínua) i la síntesi de ATP en funció del temps (línea discontinua) que trobaríeu en un experiment respiratori en el qual una suspensió de mitocondris fóra incubada seqüencialment amb els compostos següents, de manera que quan s'hi afegeix un producte, tots els afegits anteriorment encara hi són:

1. succinat (pot entrar al mitocondri)
2. ADP + P_i
3. oligomicina
4. dinitrofenol
5. rotenona
6. cianur

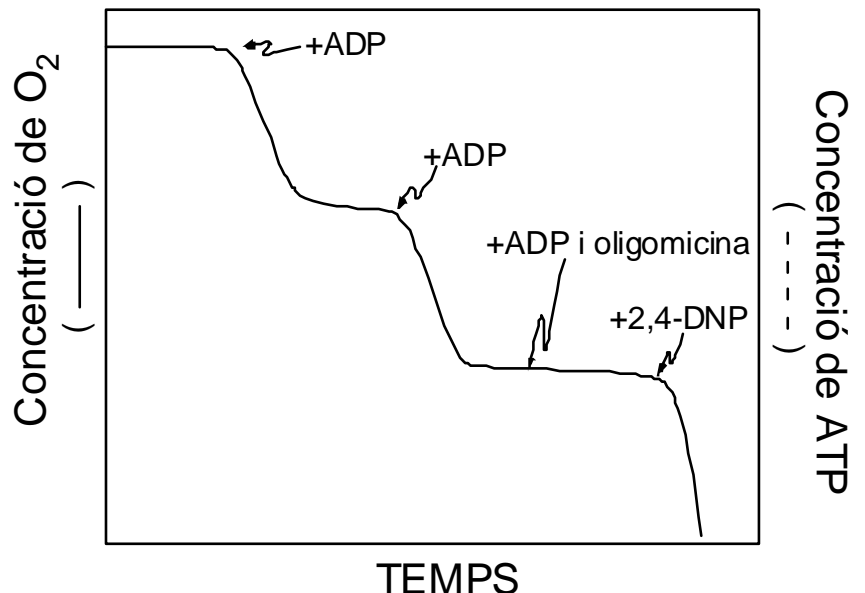
Justifiqueu el que ocorre després de l'addició del compost corresponent en cada etapa, en base als vostres coneixements sobre el funcionament de la cadena respiratòria mitocondrial i la fosforilació oxidativa (electrofosforilació).

5.34.- En la figura es representen els resultats obtinguts d'un estudi de respiració amb mitocondris en suspensió en un medi que conté P_i en excés (les fletxes indiquen l'addició d'algun component al medi).



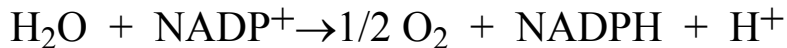
- Quin substrat pot haver-se addicionat?
- Dibuixeu** sobre la figura, en línia discontinúta, la gràfica corresponent a la producció de ATP al llarg d'aquest experiment.
- Interpreteu els resultats basant-vos en la teoria quimiosmòtica. Quin compost pot ser X?

5.35.- Quan en un experiment s'incuben mitocondris en un tampó fosfat en presència de succinat, no es consumeix oxigen fins que no s'afegeix ADP (vegeu la figura). El consum d'oxigen s'atura quan s'acaba el ADP o s'afegeix oligomicina i recomença quan s'afegeix 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP).



Dibuixeu sobre la figura, en línia discontinúta, la gràfica corresponent a la producció de ATP al llarg d'aquest experiment i **interpreteu**, basant-vos en la teoria quimiosmòtica, els resultats de les **dues** representacions (variació de la concentració d'oxigen i de la de ATP). Què s'hauria d'afegir en lloc de l'oligomicina per tal que el 2,4-DNP no tinguera cap efecte?

5.36.- La reducció del NADP⁺ en els cloroplastos es pot resumir amb la reacció següent:



Aquest procés és favorable? Què és el que el fa possible en la naturalesa? (Dades: E^0 1/2 O₂/H₂O= 0,82 V; E^0 NADP⁺/NADPH= -0,32 V; F= 96,5 kJ/mol. V)

$[\Delta G^0 = 220 \text{ kJ/mol}]$

5.37.- El fong *Bipolaris maydis* ocasiona grans pèrdues en agricultura. La malaltia que causa en les plantes és deguda a una toxina que fa que únicament la membrana interna mitocondrial resulte permeable a ions i a molècules petites. Quin procés afecta aquesta toxina? Com és possible que aquesta toxina afecte les plantes, organismes que sintetitzen ATP en el cloroplast durant la fotosíntesi?

5.38.- La llum que reben les algues que viuen a 100 m de profunditat és verda. L'anàlisi de la composició d'aquestes algues mostra que la major part dels pigments que contenen són de color roig (ficoeritrines) i que la quantitat de clorofil·la *a* és petita. Quina funció tenen ambdós tipus de pigments en aquestes algues?

5.39.- En els experiments de Jagendorf, en què un gradient de pH imposat artificialment provoca la síntesi de ATP, l'addició de DCMU fa innecessari mantenir els cloroplastos en la foscor. Per què?

5.40.- En el fotosistema I, encara que estiguen presents uns altres pigments, sols el pigment P700 cedeix electrons a la cadena de transport d'electrons on l'últim acceptor és el NADP⁺. Quina funció tenen aquests altres pigments?

5.41.- El DCMU és un herbicida que inhibeix el transport d'electrons del fotosistema II al fotosistema I, a nivell de la plastoquinona. Expliqueu quin serà el seu efecte sobre:

- (a) la fotoreducció del NADP⁺;
- (b) l'escisió fotolítica de l'aigua.

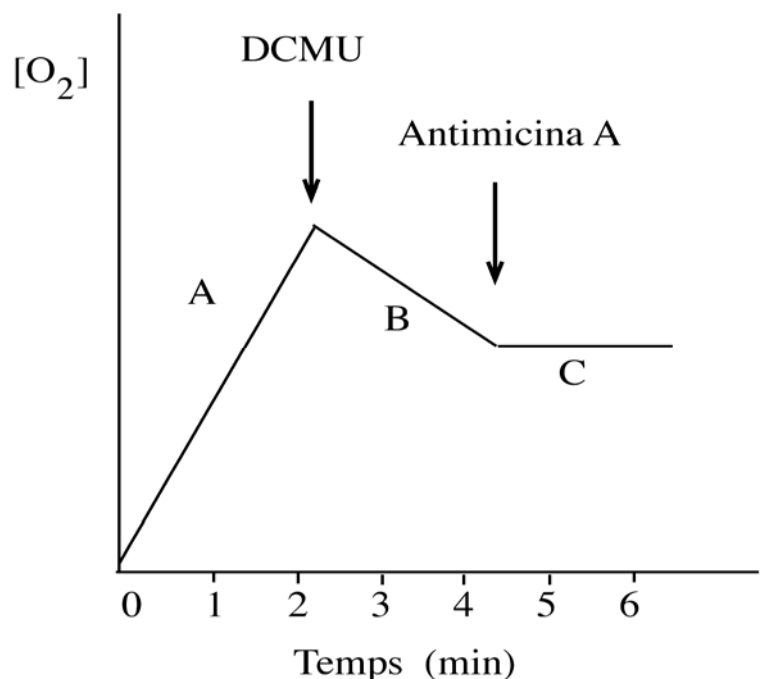
5.42.- Comenteu i/o expliqueu les frases següents:

- (a) L'augment del pH de l'estroma afavoreix la síntesi de ATP en el cloroplast.

- (b) En el procés de fotofosforilació cíclica no es genera NADPH i la síntesi de ATP no s'acompanya d'alliberament d'oxigen perquè el fotosistema II no intervé.
- (c) Per cada molècula de O_2 que es produeix en el fotosistema I, s'absorbeixen 4 fotons en la cadena de transport fotosintètica, 2 en el fotosistema I i 2 en el fotosistema II.

5.43.- Quan la relació $[NADPH]/[NADP^+]$ als cloroplastos és elevada, la fotofosforilació és predominantment cíclica. En aquesta situació, s'allibera O_2 ? Es produeix NADPH?

5.44.- Un investigador ha comprat un elèctrode d'oxigen per tal d'utilitzar-lo per a mesurar la producció o el consum d'oxigen d'un alga unicel·lular eucariota fotosintètica. Quan submergeix l'elèctrode en un cultiu d'aquest alga i il·lumina amb llum blanca, l'investigador observa que la concentració d'oxigen en la solució evoluciona com indica el tram A de la figura annexa. Als dos minuts, l'investigador afegeix DCMU al cultiu i ocorre el que s'observa en el tram B. Atès que s'esperava que el tram B fóra horitzontal, l'investigador pensa que l'aparell no funciona correctament; però discutint amb un col·lega, aquest li recomana que afegesca antimicina A a la suspensió d'algues, la qual cosa fa als 4 minuts d'haver començat l'experiment. A partir d'aquell moment, l'evolució de l'oxigen es correspon amb el tram C. Interpreteu la gràfica obtinguda i indiqueu, per a cada tram, quin procés o processos biològics expliquen l'evolució de la concentració d'oxigen en el cultiu d'algues i de quina manera són afectats pels composts químics que se li han afegit.



Advertiment: DCMU és un compost que impedeix la reducció de la plastoquinona. L'antimicina A impedeix la reducció del citocrom *c*.

6. Metabolisme

6.1.- Als voltants del 1930, Albert Szent-Györgyi féu la interessant observació que l'addició de petites quantitats d'oxalacetat o malat a suspensions de múscul de colom, estimulaven el consum d'oxigen de la preparació. Sorprenentment, la quantitat d'oxigen consumit era bastant superior a la quantitat necessària per a una oxidació completa (a CO_2 i H_2O) de l'oxalacetat o del malat. Com ho explicariéu?

6.2.- En els experiments que permeteren dilucidar el cicle de l'àcid cítric, Krebs observà que l'addició de malonat a extractes de múscul esquelètic de colom inhibeix la utilització de piruvat i provoca l'acumulació de succinat.

- (a) Per què utilitzà preparacions de múscul de vol de colom per fer aquests estudis?
- (b) Per què inhibeix el malonat?
- (c) Què va concloure Krebs quan va trobar que, en les preparacions tractades amb malonat, s'acumulava succinat després de l'addició de citrat, isocitrat o α -oxoglutarat?
- (d) Com s'explica que, en les preparacions tractades amb malonat, també s'acumule succinat després d'afegir fumarat, malat o oxalacetat?
- (e) Com expliqueu que se supere la inhibició de la utilització de piruvat si amb el piruvat s'afegeix oxalacetat, malat o fumarat?

6.3.- Relacioneu la funció química amb cadascun dels cofactors recollits en la Taula:

Cofactor	Funció química
1. NAD^+	a. Transport de grups acil
2. FAD	b. Transport de CO_2
3. CoASH	c. Oxidació de grups hidroxil
4. Lipoamida	d. Reaccions reductores per a la síntesi d'àcids grassos
5. TPP	e. Oxidació per a formar dobles enllaços carboni-carboni
6. Biotina	f. Transportador de grups acil acoblat amb oxidació-reducció
7. NADH	g. Reducció de dobles enllaços carboni-carboni
8. FADH_2	h. Reducció de grups carbonil
9. NADPH	i. Descarboxilació de α -oxoàcids

6.4.- Anomeneu els enzims del cicle de l'àcid cítric que catalitzen reaccions d'oxidoreducció (redox). Escriviu la reacció que catalitzen i indiqueu els cofactors que hi participen acceptant equivalents de reducció i quina és la seua destinació.

6.5.- En el cicle de l'àcid cítric de cèl·lules animals es produeix GTP directament mitjançant fosforilació a nivell de substrat. En quina etapa es produeix? Expliqueu el mecanisme d'aquesta reacció i per què es considera aquesta síntesi equivalent a sintetitzar un ATP.

6.6.- La glicòlisi pot funcionar sota condicions anaeròbiques i aeròbiques, mentre que el cicle de l'àcid cítric és estrictament aeròbic en eucariotes. Per què?

6.7.- (a) Expliqueu i/o comenteu la frase: "El carboni metil de cada molècula d'acetil CoA que entra en el cicle de l'àcid cítric sempre correspon al C3 del piruvat".

(b) Quina és la funció del cicle de l'àcid cítric?

6.8.- L'oxalacetat es forma en l'última etapa del cicle de l'àcid cítric. Pot haver síntesi neta d'oxalacetat a partir d'acetil CoA, utilitzant només enzims i cofactors del cicle de l'àcid cítric, sense que disminuïsquen els altres intermediaris?

6.9.- El fluoroacetat és un raticida que quan entra en la cèl·lula es transforma en fluoroacetil CoA. En el cor de rates tractades amb aquest compost, s'observa una disminució dels intermediaris del cicle de l'àcid cítric, excepte de citrat que, per contra, s'acumula. Com actua i per què és fatal aquest verí?

6.10.- La malaltia del beriberi està provocada per una deficiència de tiamina. Aquests malalts tenen elevats nivells de piruvat i α -oxoglutarat en sang. Quins enzims i reaccions metabòliques esdevindran més lentes en un individu que pateix beriberi?

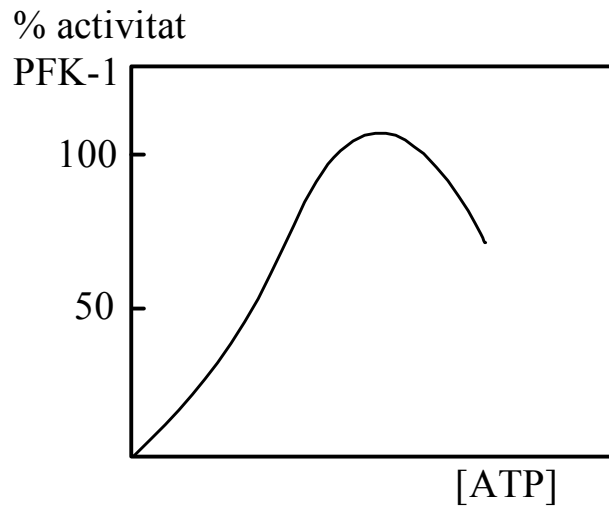
6.11.- Expliqueu els avantatges que té per a la cèl·lula cadascuna de les reaccions reguladores següents:

- La isocitrat-deshidrogenasa s'activa per ADP.
- La piruvat-carboxilasa s'activa per acetil CoA.
- El complex de l' α -oxoglutarat-deshidrogenasa s'inhibeix per ATP.
- La isocitrat-deshidrogenasa i el complex de l' α -oxoglutarat-deshidrogenasa s'activen per Ca^{2+} .

6.12.- La glucosa que entra en una cèl·lula és ràpidament fosforilada a glucosa-6-fosfat. Indiqueu tres destinacions metabòliques d'aquesta molècula fosforilada. Sota quines circumstàncies metabòliques tindran lloc cadascun d'ells? Anomeneu els enzims reguladors implicats en aquests processos i escriviu la reacció que catalitzen.

6.13.- Si s'afegeix fosfat marcat radioactivament ($^{32}\text{P}_i$) a un extracte cel·lular de fetge, s'incorporarà la marca radioactiva a algú dels intermediaris o productes de la glicòlisi? Expliqueu-ho.

6.14.- L'arsenat (AsO_4^{3-}) és químicament similar al fosfat i pot substituir-lo en la major part de, sinó en totes, les reaccions fosforolítiques. Tanmateix, els èsters d'arsenat són molt poc estables i s'hidrolitzen espontàniament. Per exemple, gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa pot utilitzar arsenat en lloc de fosfat (arsenòlisi en lloc de fosforòlisi). El producte glicerat-1-arseno-3-fosfat pot hidrolitzar-se, no enzimàticament, a 3-fosfoglicerat i arsenat.



- Per què es diu que l'arsenat és un desacoblador de la fosforilació a nivell de substrat?
- Per què l'arsenat és una substància tòxica per un organisme que depèn absolutament de la glicòlisi per cobrir les seues necessitats energètiques?
- Doneu algun altre exemple de reacció que es pugui desacoblar amb arsenat.

6.15.- S'ha descobert un mutant d'un organisme anaerobi facultatiu que té una gliceraldehid-3-fosfat-deshidrogenasa que catalitza l'oxidació directa de gliceraldehid-3-fosfat a 3-fosfoglicerat sense passar per cap intermediari. El mutant sobreviu en medi aerobi, però no en un d'anaerobi. Expliqueu les possibles causes d'aquest comportament.

6.16.- Per a una concentració determinada de F6P, l'activitat fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) augmenta a causa de l'increment de la concentració de ATP. A partir d'un determinat valor, concentracions creixents de ATP causen la inhibició de PFK-1 (vegeu la figura). Com és possible que l'ATP siga substrat i inhibidor de PFK-1? Quin és el mecanisme de regulació de l'activitat de PFK-1 pel ATP i quin és el seu significat a nivell de la regulació de la glicòlisi?

6.17.- Louis Pasteur, en estudiar la fermentació alcohòlica del llevat, observà que l'addició d'oxigen a un cultiu anaerobi originava una dràstica disminució de la velocitat de consum de glucosa. Aquest efecte pot ser contrarestat per l'addició de 2,4-dinitrofenol.

- (a) Per què disminueix el consum de glucosa en presència d'oxigen? Justifiqueu la resposta en termes d'enzims concrets.
- (b) Per què el 2,4-dinitrofenol contraresta aquest efecte?

6.18.- En un eritròcit en el qual s'estiga produint la glicòlisi, quin serà l'efecte d'un sobtat increment de:

- (a) glucosa-6-fosfat;
- (b) fructosa-2,6-bisfosfat;
- (c) AMP;
- (d) fructosa-1,6-bisfosfat

6.19.- En un cultiu bacterià anaerobi s'acumula lactat a mesura que progressa la fermentació. Decidiu si les situacions següents són certes o falses. Justifiqueu les respostes.

- (a) El més probable és que el cultiu estiga creixent en glucosa ja que pocs altres compostos poden ser fermentats pels bacteris.
- (b) El cultiu no pot produir CO_2 .
- (c) Si es fa entrar aire contínuament en el cultiu, el nivell de lactat continuarà augmentant.
- (d) L'addició de malonat, que inhibeix la succinat-deshidrogenasa, blocarà la producció de lactat perquè impedeix la reoxidació del NADH a NAD^+ .
- (e) La transformació de piruvat en lactat es produeix en dues etapes i l'única funció que té és evitar l'acumulació de piruvat en la cèl·lula per tal que no es modifiqui el pH citosòlic.
- (f) Com que la reacció catalitzada per la lactat-deshidrogenasa no produeix cap ATP, la glicòlisi anaeròbia podria ser més eficient si el piruvat fóra el producte final de la ruta en lloc del lactat.

6.20.- S'ha observat que quan certs llevats es cultiven en un medi deficient en ferro, la producció d'etanol augmenta respecte a la d'un cultiu aerobi normal. Doneu una explicació bioquímica a aquest fet.

6.21.- Després d'un exercici muscular intens, la concentració de lactat en sang augmenta molt. Quina és la causa metabòlica d'aquest fenomen? Al cap d'un període curt de temps, aquest lactat torna al nivell normal. Quina n'ha estat la destinació?

6.22.- Durant l'exercici muscular intens, la glicòlisi subministra l'ATP necessari per a la contracció muscular. La reacció catalitzada per la lactat-deshidrogenasa, tot i que no subministra ATP, és essencial en aquest procés. Quina és la funció d'aquesta reacció?

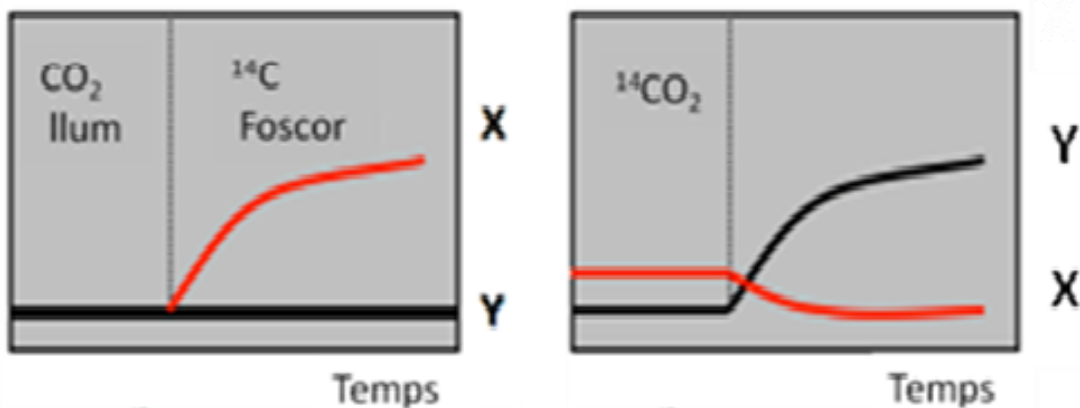
6.23.- El pàncrees allibera glucagó en resposta a nivells baixos de glucosa en sang. En les cèl·lules hepàtiques, el glucagó té un paper clau en la regulació de les velocitats de les rutes oposades glicòlisi-gluconeogènesi mitjançant el control de la concentració de fructosa-2,6-bisfosfat.

- Per què l'hormona glucagó regula selectivament el funcionament d'enzims implicats en el metabolisme d'hidrats de carboni en les cèl·lules hepàtiques però no en altres teixits?
- Si el glucagó produeix un descens en els nivells de fructosa-2,6-bisfosfat, de quina manera pot induir un increment de la concentració de glucosa en la sang?

6.24.- Expliqueu per què els malalts amb una deficiència en glucosa-6-fosfatasa hepàtica són hipoglucèmics.

6.25.- Calvin i els seus col·legues utilitzaren l'alga unicel·lular *Chlorella* per estudiar les reaccions d'assimilació del carboni en la fotosíntesi. Ells incubaren amb $^{14}\text{CO}_2$ suspensions il·luminades d'algues i seguiren al llarg del temps l'aparició de ^{14}C en dos compostos (X, Y) en dues condicions diferents. Suggeriu les identitats de X i Y.

- Després d'incubar amb llum i CO_2 no marcat, s'apaguen els llums i s'hi afegeix $^{14}\text{CO}_2$. En aquestes condicions, X és el primer compost que apareix marcat amb ^{14}C ; Y no es marca.
- Les algues s'il·luminen i s'incuben amb $^{14}\text{CO}_2$. Es mantenen il·luminades fins que tot el $^{14}\text{CO}_2$ ha desaparegut. En aquestes condicions, X es marca ràpidament, però perd la radioactivitat amb el temps, mentre que Y es fa més radioactiu amb el temps.



6.26.- Expliqueu i/o comentes les frases següents:

- (a) L'enzim que catalitza la síntesi i la degradació de fructosa-2,6-bisfosfat, l'efector al·lostèric més potent de fosfofructoquinasa-1 i de fructosa-1,6-bisfosfatasa, està fosforilat o desfosforilat en resposta a senyals hormonals.
- (b) La ribulosa-1,5-bisfosfat-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) participa de manera important en el metabolisme dels animals donat que proporciona el poder reductor (NADPH) que necessiten per a la biosíntesi d'àcids grassos.
- (c) cAMP és l'únic segon missatger que es coneix i, a més, sempre es troba en la mateixa concentració en l'espai extracel·lular, on exerceix els seus ben coneguts efectes glicogenogènics.
- (d) Una funció principal del ATP és subministrar energia per a processos endergònics no favorables, com és el del transport d'electrons des de l'aigua fins al NADP⁺ en la fotosíntesi.

6.27.- Un nadó de dos mesos d'edat fou ingressat en un hospital perquè presentava hipotonia (debilitat muscular) i no augmentava de pes. Després de fer-li diverses proves, se li diagnosticà un defecte en una de les subunitats del complex multienzimàtic de la piruvat-deshidrogenasa.

- (a) Com expliqueu que les concentracions plasmàtiques de lactat i d'alanina foren anormalment elevades? Feu referència a les reaccions de formació d'aquests metabòlits.
- (b) L'excés de lactat i d'alanina pot explicar-se per un defecte en la piruvat-carboxilasa? Expliqueu-ho.
- (c) Una reducció d'un 40 % en els sucres de la dieta és molt efectiva per a alleujar els símptomes de l'acidosi làctica en els malalts que tenen aquest defecte genètic de la piruvat-deshidrogenasa. Expliqueu en què es fonamenta aquesta teràpia.

6.28.- Per què els animals no emmagatzemen grans quantitats de glicogen en el múscul quan se'ls alimenta amb una dieta rica en sucres?

6.29.- Un mateix senyal hormonal pot regular simultàniament i coordinadament la biosíntesi i degradació de glicogen. Expliqueu-ho.

6.30.- Quin és l'efecte de cadascuna de les situacions següents sobre la velocitat a la qual es metabolitza el glicogen?

- (a) un augment de la $[Ca^{2+}]$.
- (b) un augment de la [glucagó].
- (c) un augment del nivell de glucosa en sang.
- (d) l'activació de la glicogen-fosforilasa-fosfatasa.
- (e) inhibició de l'adenilat-ciclasa.

Per què?

6.31.- El senyal intracel·lular iniciat per l'aparició del segon missatger cAMP es desactiva gràcies al funcionament d'una fosfodiesterasa que hidrolitza cAMP a AMP. S'ha trobat que la cafeïna inhibeix l'activitat d'aquesta fosfodiesterasa. Discutiu quin efecte tindrà aquest compost sobre el metabolisme de la glucosa i del glicogen.

6.32.- Una mostra de glicogen d'un malalt hepàtic s'incuba amb P_i , glicogen-fosforilasa normal i l'enzim desramificant normal. La relació entre glucosa-1-fosfat i glucosa formada en aquesta reacció és de 100. Quina és la deficiència enzimàtica més probable del glicogen en aquest malalt?

6.33.- Per tal d'estudiar el metabolisme del glicogen muscular es marcà radioactivament el glicogen muscular d'una rata i, després d'injectar-li adrenalina, es trobà que:

- (a) si la rata es trobava en repòs, la marca radioactiva apareixia únicament en forma d'un compost gasós d'un carboni;
- (b) si la rata estava realitzant un exercici anaeròbic intens, la marca radioactiva es trobava als 2 min en sang, en forma d'un compost de 3 carbonis; i al cap d'uns 30 min, la marca radioactiva apareixia, en sang, en forma de glucosa.

Identifiqueu els diferents compostos que apareixen marcats radioactivament en sang després de la injecció d'adrenalina, feu un esquema dels processos que tenen lloc en cada cas (a i b) i indiqueu-hi els òrgans implicats.

6.34.- Quina és la funció dels fosfolípids en les lipoproteïnes? Per què és necessari que les apolipoproteïnes tinguin dos dominis, l'un hidrofílic i l'altre hidrofòbic?

6.35.- Compareu la síntesi i degradació d'àcids grassos pel que fa a:

- (a) localització subcel·lular;
- (b) transport de substrats al compartiment on tenen lloc;
- (c) reductors i oxidants;
- (d) organització del sistema enzimàtic.

Afegiu-hi un altre aspecte diferent entre ambdós processos.

6.36.- Persones amb nivells anormalment baixos de carnitina en els músculs pateixen de debilitat muscular durant l'exercici moderat. A més, els seus músculs tenen nivells significativament alts de triacilglicerols.

- (a) Expliqueu aquests dos efectes.
- (b) Poden aquestes persones metabolitzar el glicogen muscular aeròbicament?

6.37.- Contràriament al que diu la llegenda, els camells no emmagatzemen aigua en llurs gepes. Aquestes són grans dipòsits de greix que constitueixen una font important d'aigua. Expliqueu-ho.

6.38.- Expliqueu per què un esquimal amb una dieta inadequada d'hidrats de carboni pot millorar el seu estat nutricional si menja greix amb àcids grassos de nombre imparell d'àtoms de carboni.

6.39.- En un sistema *in vitro* és necessària la presència de HCO_3^- perquè hi haja síntesi d'àcids grassos. Tanmateix, si s'utilitza bicarbonat marcat isotòpicament, no s'observa la incorporació del carboni marcat del bicarbonat en els àcids grassos naixents. Expliqueu aquesta aparent contradicció.

6.40.- En un experiment, s'injectà, a una rata, alanina marcada amb ^{14}C en la posició 3 i després de dues hores se li va extraure el fetge, del qual s'extraguieren els lípids. S'observà que el palmitat aïllat contenia isòtop radioactiu. Com es pot justificar aquest fet? Indiqueu, en un esquema breu, les transformacions que tingueren lloc.

6.41.- Quan la producció d'acetyl CoA supera la capacitat del cos per a oxidar-lo, s'acumulen acetoacetat, D- β -hidroxibutirat i acetona, que generades en grans quantitats poden superar la capacitat amortidora de la sang i fer disminuir el pH de la sang. Aquesta acidificació afecta negativament la capacitat dels eritròcits per transportar l'oxigen i, consegüentment, el cervell pot quedar privat d'oxigen i es produeix un coma mortal. Expliqueu com una dieta molt baixa en calories pot originar aquesta producció massiva de cossos cetònics.

6.42.- Expliqueu de quina manera pot ajudar una dieta baixa en hidrats de carboni i greixos a disminuir el greix corporal.

6.43.- El residu de serina de l'acetil CoA-carboxilasa, que és diana de la proteïna-quinasa dependent de AMP, està substituït per alanina. Quina serà la conseqüència metabòlica d'aquesta mutació?

6.44.- A diferència del fetge, el teixit adipós no té glicerol-quinasa. Quina conseqüència té aquesta absència sobre la destinació del glicerol obtingut després de la mobilització dels triacilglicerols de reserva? Si les cèl·lules adiposes no contenen glicerol-quinasa, de quina manera obtenen el glicerol-3-fosfat necessari per a la síntesi de triacilglicerols?

6.45.- Mostreu com el nitrogen de l'alanina pot aparèixer com a ió amoni. Quina és la destinació d'aquest amoni?

6.46.- En relació amb el metabolisme nitrogenat, com afectaria un mamífer una disminució del nombre de mitocondris en les seues cèl·lules hepàtiques. I una disminució d'arginasa. Per què?

6.47.- La ureasa és un enzim que es troba en moltes plantes i microorganismes. La font comercial més freqüent n'és la bajoca *Canavalia eusiformis*. Quan a conills ben alimentats se'ls injecta ureasa, immediatament tenen fortes convulsions i moren, per què?

6.48.- Expliqueu per què la producció d'urea està disminuïda de manera important durant el dejuni prolongat (40 dies) en comparació amb el de 3 dies.

6.49.- Per què es dona instruccions de beure molta aigua a la gent que consumeix una dieta alta en proteïnes?

6.50.- Es tracta de relacionar les rutes metabòliques amb els compartiments cel·lulars on tenen lloc:

- (1) Citosol;
- (2) Mitocondri;
- (3) Glioxisoma;
- (4) Membrana interna mitocondrial;
- (5) En citosol i mitocondri parcialment;
- (6) Estroma;
- (7) Membrana plasmàtica de bacteris;
- (8) Membrana tilacoïdal.

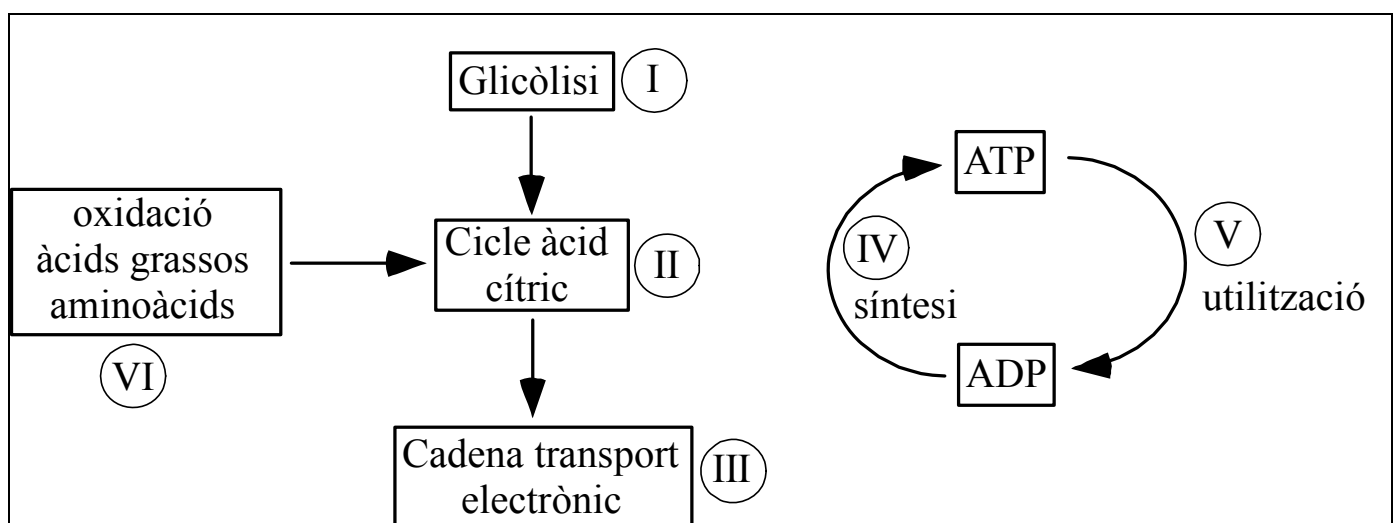
() Glicòlisi; () Gluconeogènesi; () Síntesi d'urea; () Síntesi d'àcids grassos; () Cicle del glioxilat; () Cicle de l'àcid cítric; () Ruta oxidativa dels fosfats de pentosa; () β -oxidació dels àcids grassos; () Fosforilació oxidativa; () Fotofosforilació; () Formació de cossos cetònics; () Síntesi i degradació del glicogen; () Cicle de Calvin; () Descarboxilació oxidativa del piruvat.

6.51.- De les transformacions bioquímiques següents indiqueu, sobre les línies, si generen:

(1) NADPH; (2) NADH; (3) ATP; i (4) no generen cap dels anteriors:

- (a) glucosa \rightarrow piruvat: _____;
 (b) piruvat \rightarrow CO₂: _____;
 (c) glucosa-6-fosfat \rightarrow ribosa-5-fosfat: _____;
 (d) glucosa \rightarrow etanol: _____;
 (e) NADH \rightarrow NAD⁺ (en la respiració mitocondrial): _____;
 (f) electrons de l'aigua \rightarrow ferredoxina: _____;
 (g) β -hidroxibutirat \rightarrow acetoacetat: _____;
 (h) palmitoil CoA \rightarrow 8 acetil CoA: _____;
 (i) glutamat \rightarrow α -oxoglutarat + NH₄⁺: _____;
 (j) piruvat \rightarrow glucosa _____.

6.52.- Del diagrama següent:

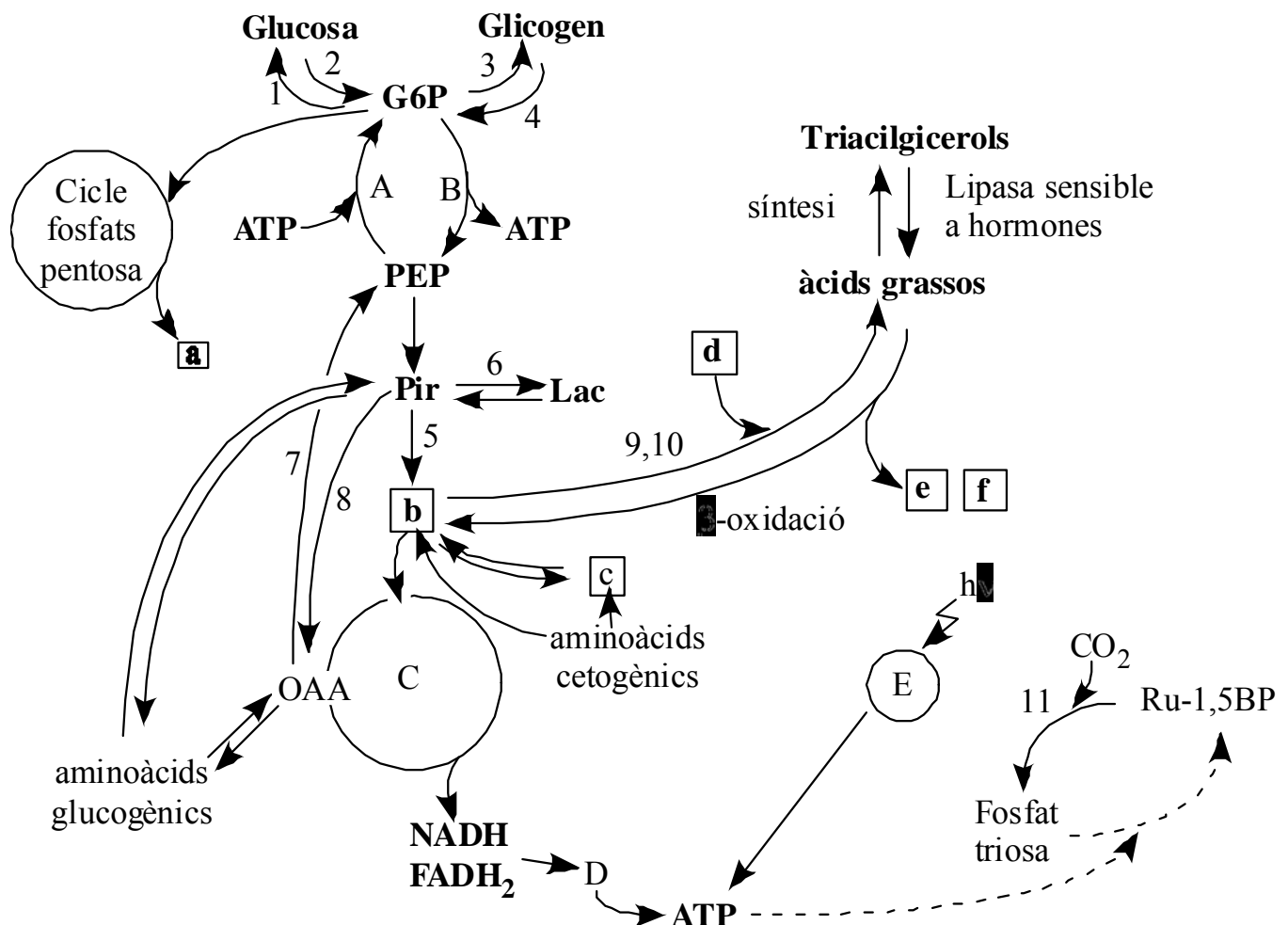


- (a) Indiqueu la localització subcel·lular d'I, II i III.
 (b) Especifiqueu les unions que s'han d'afegir entre IV i la resta del diagrama.
 (c) Quan no hi ha oxigen, en quin procés s'acumula lactat? Per què?

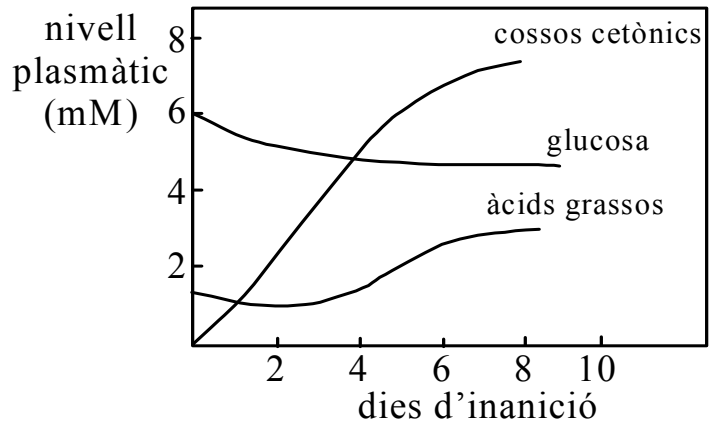
- (d) En quin(s) procés(s) es requereix FAD?
- (e) Quin efecte produiria sobre IV, l'addició de:
- malonat (inhibidor de succinat-deshidrogenasa)
 - 2,4-dinitrofenol
- (f) Dels enzims següents: 1. Fosfofructoquinasa-1; 2. Piruvat-deshidrogenasa i 3. ATP-sintasa.
- En quin procés (d'I a VI) participen?
 - Especifiquen la reacció que catalitzen.
 - Indiqueu llur localització subcel·lular.
 - Quines conseqüències metabòliques provocaria llur carència?
- (g) Assenyaleu-ne dos processos metabòlics relacionats amb V tot indicant-ne la localització tissular i subcel·lular.
- (h) Indiqueu quin procés, que no apareix en l'esquema, està també relacionat amb IV. On es localitza?

6.53.- De l'esquema del metabolisme intermediari que es presenta, anomenen:

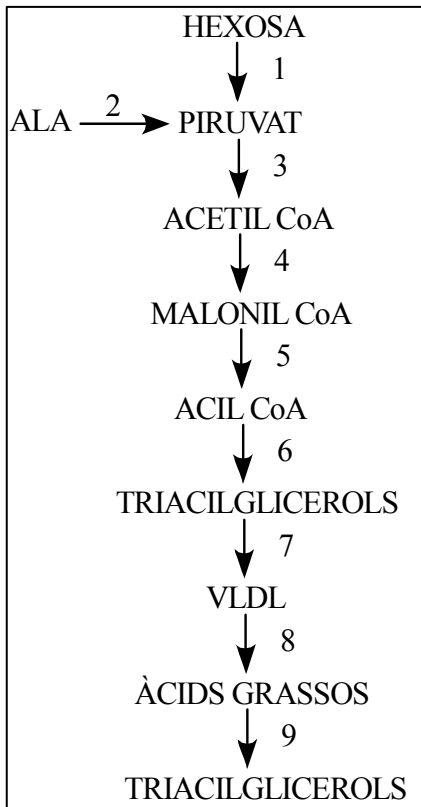
- (a) Els enzims als quals es refereixen des de l'1 a l'11.
- (b) Les rutes o processos metabòlics que hi participen (A-E).
- (c) Els intermediaris o productes finals que es formen (a-f).



6.54.- Després d'un dejuni prolongat s'observa que els nivells plasmàtics d'àcids grassos i cossos cetònics augmenten, mentre que el nivell de glucosa plasmàtica disminueix, com es veu en la figura. Interpreteu el significat metabòlic d'aquestes observacions.



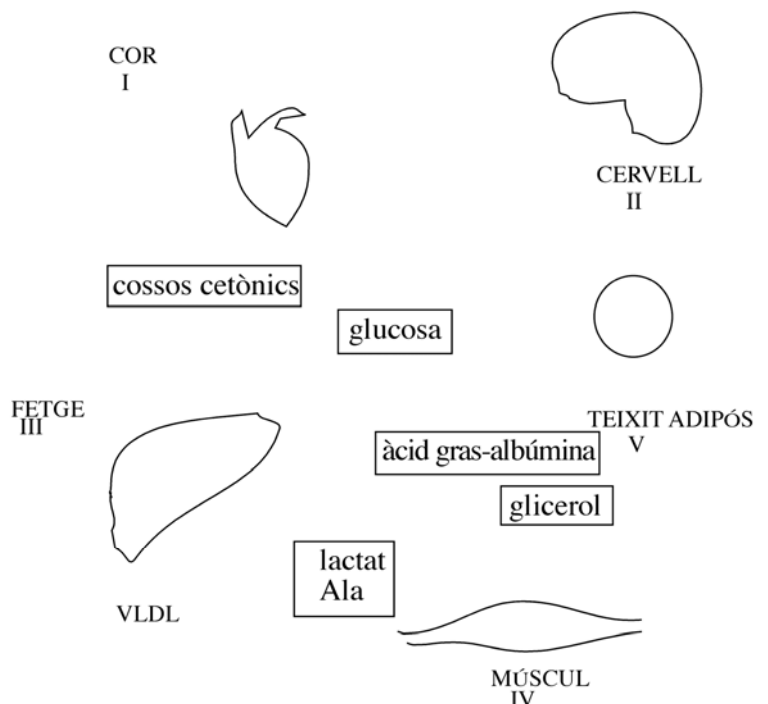
6.55.- De l'esquema mostrat indiqueu:



- Un títol per al procés global.
- El nom de les etapes o processos que hi participen, mostrats amb el números 1-9.
- La seua localització tissular i subcel·lular.
- Els enzims reguladors dels processos 1, 3 i 4.
- Quines etapes requereixen NAD^+ i/o NADP^+ .
- Quins processos consumeixen ATP.
- Completeu les etapes que considereu de més significat per tal d'entendre el procés global.

6.56.- Es tracta d'establir les interrelacions entre els principals òrgans que metabolitzen combustibles:

- Assenyalau amb fletxes els metabòlits que són importats i exportats per cada òrgan.
- Indiqueu les principals rutes del metabolisme energètic que estan implicades amb els metabòlits que es consideren en la figura, i la participació dels diferents òrgans en aquestes rutes.



6.57.- Expliqueu i/o comenteu les frases següents:

- (a) Un cultiu bacterià anaerobi que fermenta glucosa no produeix CO₂.
- (b) Si per enginyeria genètica s'arribara a produir un enzim que poguera utilitzar indistintament NAD⁺ o NADP⁺ en reaccions redox, la degradació d'hidrats de carboni es veuria afectada.
- (c) Si amb la dieta es prenen aminoàcids en excés, llurs àtoms de carboni són transformats en hidrats de carboni i en greixos.
- (d) El cicle de Calvin està regulat, d'alguna manera, per la llum.

6.58.- Expliqueu i/o comenteu les frases següents:

- (a) Quan es prenen amb la dieta aminoàcids en excés, els seus àtoms de carboni són convertits en hidrats de carboni i/o greixos.
- (b) Mutants d'*E. coli* deficients en F-1,6-BPasa no poden créixer amb glicerol o succinat i mostren un requeriment absolut per hexoses.
- (c) Després d'un dejuni prolongat, els nivells en sang d'àcids grassos i de cossos cetònics augmenten mentre que els de glucosa disminueixen.

6.59.- Expliqueu i/o comenteu les frases següents:

- (a) L'anòxia, falta d'oxigen, és el principal perill per a la supervivència del cervell. S'ha observat que després de tan sols un minut d'anòxia, les velocitats de glicòlisi i de formació de lactat augmenten de 5 a 8 vegades.
- (b) Si algun amic vostre es queixa d'estar acumulant greix i de tenir 5 kg de sobrepès, el podeu consolar dient-li que si en lloc de greix haguera acumulat les mateixes calories en forma d'hidrats de carboni, el seu sobrepès seria bastant més gran.
- (c) El catabolisme dels àcids grassos és un procés que requereix necessàriament oxigen. En canvi, els hidrats de carboni, en moltes cèl·lules poden metabolitzar-se en absència d'oxigen.

6.60.- La Taula mostra l'activitat d'alguns enzims de músculs pectorals (de vol) de coloma i de gallina.

Quin és el combustible metabòlic principal per a la producció de ATP en el teixit muscular de cadascuna de les aus? Justifiqueu les respostes.

Activitat (μmol substrat per min i per g de teixit)		
Enzim	Coloma	Gallina
Hexoquinasa	3,0	2,3
Glicogen-fosforilasa	18,0	120,0
Fosfofructoquinasa-1	24,0	143,0
Citrat-sintasa	100,0	15,0
Lactat-deshidrogenasa	5,0	30,0
Triacilglicerol-lipasa	70,0	10,0

6.61.- *Chlamydomonas reinhardtii* és un alga unicel·lular eucariòtica que pot créixer en la foscor si s'utilitza l'acetat com a única font d'energia i de carboni. A partir d'aquesta molècula, l'alga obté tota l'energia que necessita i sintetitza tots els components carbonats cel·lulars. Com és possible? Feu un esquema que mostre les rutes metabòliques que participen en la formació d'hidrats de carboni, àcids grassos i aminoàcids, i energia (ATP) a partir de l'acetat. Indiqueu el nom de les rutes que hi participen.