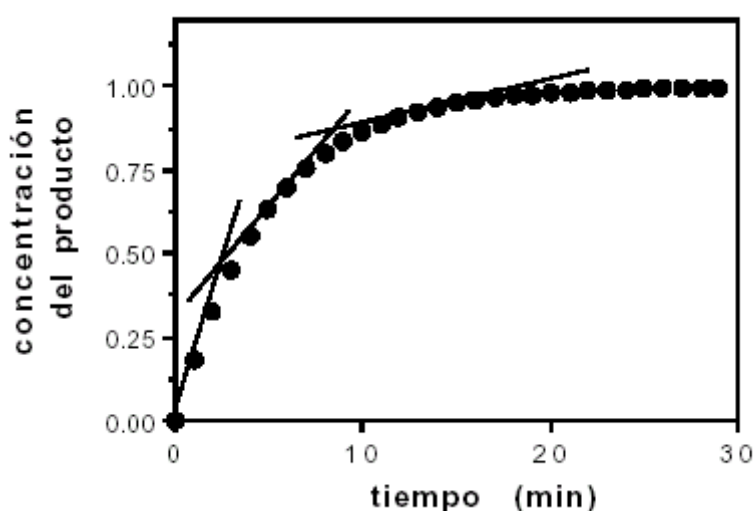


Los experimentos cinéticos estudian la velocidad a la que se producen las reacciones, es decir, el modo en el que la concentración de algunas especies moleculares varía en función del tiempo. En una gráfica en la que se representa la concentración frente al tiempo, la **velocidad de reacción** es la pendiente. En el experimento cinético que se muestra a continuación, la velocidad de reacción decrece a medida que la reacción avanza.

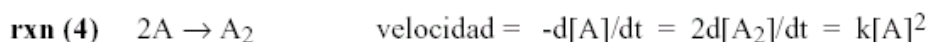
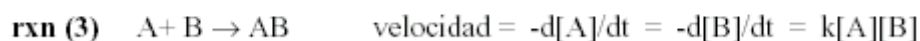
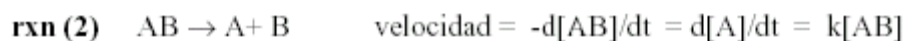
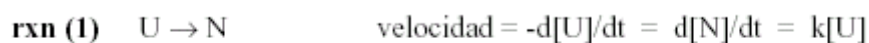


El modo exacto en el que las velocidades de reacción cambian en función del tiempo y cómo estas velocidades varían según las concentraciones de reactivos, depende del mecanismo de reacción. Los estudios cinéticos se pueden emplear, por tanto, para probar los mecanismos propuestos.

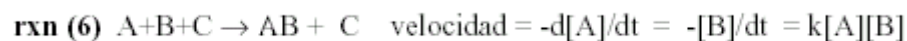
Las **ecuaciones de velocidad** o **leyes de velocidad** muestran cómo varía la concentración de una especie molecular con respecto al tiempo (**velocidad**) como función matemática de una **constante de velocidad** o **constante cinética**, representada por la letra k minúscula, y de las concentraciones de cada especie molecular que interviene en la reacción.

Los ejemplos que se muestran a continuación son ecuaciones de velocidad de reacciones que tienen lugar en una sola dirección (es decir, las que no son reversibles). En algunos de los casos mostrados se han ajustado las velocidades para mantener la coherencia con

la estequiometría de la reacción. De este modo, para $2A \rightarrow A_2$; la concentración del monómero varía el doble de rápido que la del dímero.



Obsérvese que en cada una de las reacciones mostradas anteriormente, los reactivos y los productos son especies moleculares diferentes. Esto quiere decir que todos los reactivos han participado en la reacción. Sin embargo, para la siguiente reacción esto no se cumple:



En este caso, la ecuación de velocidad es idéntica a la rxn (3), ya que la concentración de [C] no aparece en la expresión de velocidad, debido a que C no participa en la reacción.

Las velocidades se expresan en unidades de concentración/tiempo (por ejemplo, $M \bullet s^{-1}$, $\mu M \bullet \text{min}^{-1}$, $nM \bullet s^{-1}$, etc.). Las unidades de la constante de velocidad contienen siempre la inversa de un tiempo (seg^{-1} , min^{-1} , etc.) y, dependiendo de la reacción, pueden incluir también la inversa de una o más concentraciones. Por ejemplo, si a la derecha de la ecuación de velocidad está $k[A][B]$, entonces, la constante de velocidad deberá tener como unidades $M^{-1} \bullet \text{tiempo}^{-1}$, de modo que las unidades de la expresión global sean $M \bullet \text{tiempo}^{-1}$.

Orden de reacción: el orden cinético global de una reacción lo determina el número de concentraciones que figuran a la derecha de la expresión de velocidad. El orden de la reacción con respecto a una especie concreta depende de si dicha especie aparece una o más veces. Por ejemplo, si a la derecha de la ecuación de velocidad está $[A]^m[B]^n$, entonces el orden global de la reacción será $m+n$ y la reacción será de orden m con

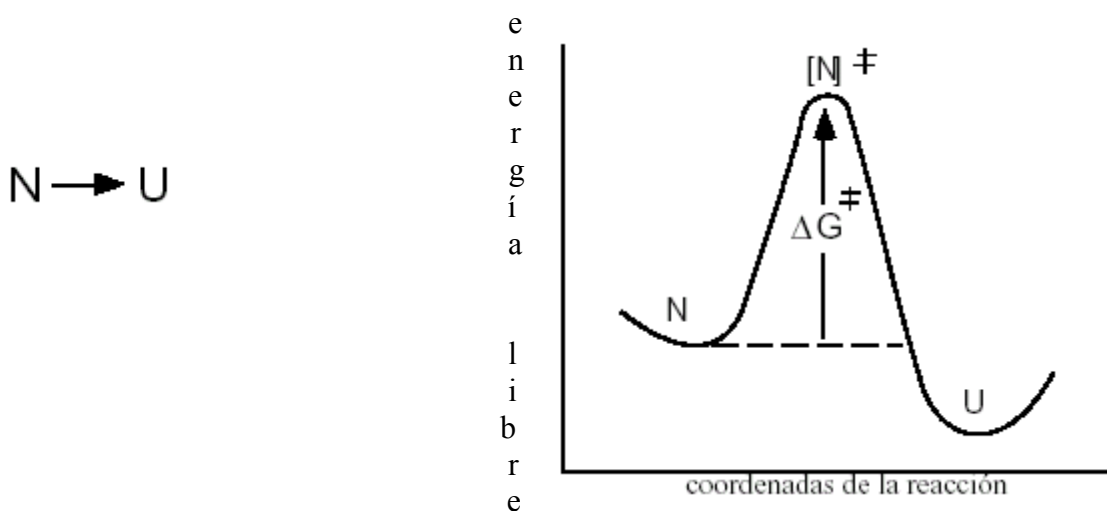
respecto a [A] y de orden n con respecto [B]. El orden cero significa que la velocidad de reacción no varía cuando cambia la concentración de una especie. No hay ninguna reacción bioquímica que tenga de orden global cero.

En cuanto a las reacciones mostradas anteriormente, rxn (1) y rxn (2) son reacciones de primer orden, puesto que sólo aparece una concentración a la derecha de la ecuación de velocidad; rxn (3) es de orden global dos y de primer orden con respecto a [A] y a [B]; rxn (4) es segundo orden, tanto a nivel global, como con respecto a [A]; rxn (5) es de orden global tres, de segundo orden con respecto a [A] y de primer orden con respecto a [B]; por último, la reacción (6) es de orden global dos, de primer orden con respecto a [A] y a [B] y de orden cero con respecto a [C].

Unidades y magnitud de las constantes de velocidad: en los procesos de primer orden, incluidos los cambios conformacionales (rxn 1) y las reacciones de disociación (rxn 2), las unidades de la constante de velocidad son de tiempo⁻¹. En los procesos de asociación bimolecular o de segundo orden, como rxn (3) y rxn (4), las unidades de la constante de velocidad de segundo orden son M⁻¹ tiempo⁻¹.

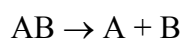
En las magnitudes de las constantes de velocidad de primer y segundo orden hay límites superiores. En los procesos de primer orden, las reacciones más rápidas no pueden exceder la velocidad de las vibraciones moleculares ni de las rotaciones de enlace; de este modo, las constantes de velocidad presentan un límite superior de aproximadamente 10¹² s⁻¹. Las reacciones de plegamiento de proteínas más rápidas que se conocen se producen con constantes de velocidad de 10⁶ s⁻¹. Los cambios conformacionales sencillos se pueden producir con constantes de velocidad de 10⁹ s⁻¹. En las reacciones de segundo orden, el límite superior de las constantes de velocidad lo determina la velocidad de difusión, aproximadamente 10⁹ M⁻¹ s⁻¹, puesto que dos moléculas no pueden reaccionar si no colisionan entre sí. Las constantes de velocidad carecen de límite inferior. Por lo general, para un conjunto dado de concentraciones, las constantes de velocidad más elevadas implican reacciones más rápidas y las constantes más bajas, reacciones lentas. Obsérvese, sin embargo, que una constante de velocidad elevada no asegura que la velocidad de la reacción sea también elevada. La reacción bimolecular $A + B \rightarrow AB$ puede tener una constante de velocidad limitada por difusión (10⁹ M⁻¹ s⁻¹), pero no tendrá lugar a ninguna velocidad si la concentración de [A] o de [B] es igual a cero.

Los **diagramas de coordenadas de la reacción**, como los que a continuación se muestran para la reacción de desnaturalización de una proteína, se emplean con frecuencia para ilustrar la idea de que en los procesos cinéticos existen barreras de energía. El punto más alto y menos estable en la representación de la energía libre se conoce como **estado de transición**. Incluso si una reacción es favorable desde el punto de vista energético (conduce a una energía libre inferior), es necesaria una cierta cantidad de energía libre de activación para que se produzca la reacción. En la reacción de desplegamiento de una proteína, ΔG_{u^\ddagger} es en su mayoría la energía necesaria para romper los enlaces no covalentes que mantienen unidas varias partes de la estructura. En los diagramas de coordenadas de reacción, las mayores barreras (valores más elevados de ΔG_{u^\ddagger}) corresponden a las reacciones más lentas y viceversa.

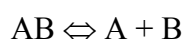


Expresiones de velocidad en sistemas dinámicos. Relación entre la constante de equilibrio y la cinética.

Hay relativamente pocas reacciones en biología que sean realmente irreversibles. Así, cuando escribimos una reacción del tipo:



puede ser poco razonable o incluso imposible ignorar la reacción inversa. Si tenemos en cuenta las dos reacciones, la de disociación y la de asociación:



la ley de velocidad de la combinación de ambas será:

$$d[AB]/dt = k_{\text{asoc}}[A][B] - k_{\text{dis}}[AB]$$

donde k_{asoc} y k_{dis} son las constantes de velocidad de las reacciones de asociación y disociación, respectivamente. La parte $k_{\text{asoc}} [A][B]$ es a la velocidad a la que se forma AB mediante la asociación de A + B; la parte $- k_{\text{dis}} [AB]$ es la velocidad a la que desaparece por disociación AB. Una vez que el sistema alcance el equilibrio, no habrá ningún cambio neto en las concentraciones de [AB], [A] y [B]. Así:

$$d[AB]/dt = k_{\text{asoc}}[A][B] - k_{\text{dis}}[AB] = 0 \quad \text{y} \quad [A][B]/[AB] = k_{\text{dis}}/k_{\text{asoc}} = K_d$$

Esto muestra la relación entre las constantes de velocidad y la constante de equilibrio en una reacción de disociación bimolecular. Para una reacción de plegamiento/desplegamiento de proteína unimolecular en equilibrio,

$$N \rightleftharpoons D \quad d[N]/dt = k_N[D] - k_D[N] = 0 \quad \text{y} \quad [D]/[N] = k_D/k_N = K_D$$

donde N es el estado nativo o plegado y D el desnaturalizado o desplegado.

Cómo medir la velocidad y determinar las constantes de velocidad: hay una serie de cuestiones importantes a la hora de diseñar experimentos para calcular las constantes de velocidad. En primer lugar, es necesario disponer de un método que distinga entre reactivos y productos. Esto podría incluir los métodos espectrales (absorción UV, fluorescencia, dicroísmo circular, RMN, resonancia del plasmón de superficie, etc.) o los métodos en los que los reactivos y los productos se separan e identifican por su movilidad mediante filtración por gel, HPLC, electroforesis, etc.

En segundo lugar, se debe diseñar el experimento de modo que predomine un único proceso (por ejemplo, asociación o disociación). Para un experimento de disociación, se podría empezar con unos complejos AB y diluirlos hasta una concentración lo suficientemente baja como para que, una vez disociados los complejos, la velocidad de formación (reasociación) del complejo se pueda despreciar. Por otra parte, para una reacción de asociación o formación, se podrían mezclar A y B en tiempo cero y se anotarían los tiempos en un régimen en el que no se espera una disociación importante

de los complejos AB (p. ej. mucho antes de que se forme AB) o en condiciones en las que la velocidad de disociación de AB se pueda despreciar. Para calcular la velocidad de un proceso molecular como el plegamiento de proteínas, se podría empezar con una proteína desnaturalizada a bajo PH o en un desnaturalizante como la urea y luego pasarla a una disolución tampón de PH 7, que favorece el plegamiento. A medida que cualquier reacción se aproxima al equilibrio, las velocidades de las reacciones en ambos sentidos, directo e inverso, son cada vez más similares. Por tanto, generalmente, para estudiar la cinética de las reacciones directa e inversa por separado hay que trabajar lo más lejos posible de las condiciones de equilibrio.

La última de las cuestiones es cómo analizar los datos cinéticos para determinar las constantes de velocidad. Los ejemplos que se pueden ver a continuación muestran algunos métodos sencillos para analizar la cinética de reacciones unimoleculares y bimoleculares.

Reacción (unimolecular) de primer orden

Ejemplos: cambio conformacional o reacción de disociación.

Reacción: $A \rightarrow B$

Ley de velocidad: $-d[A]/dt = k[A]$

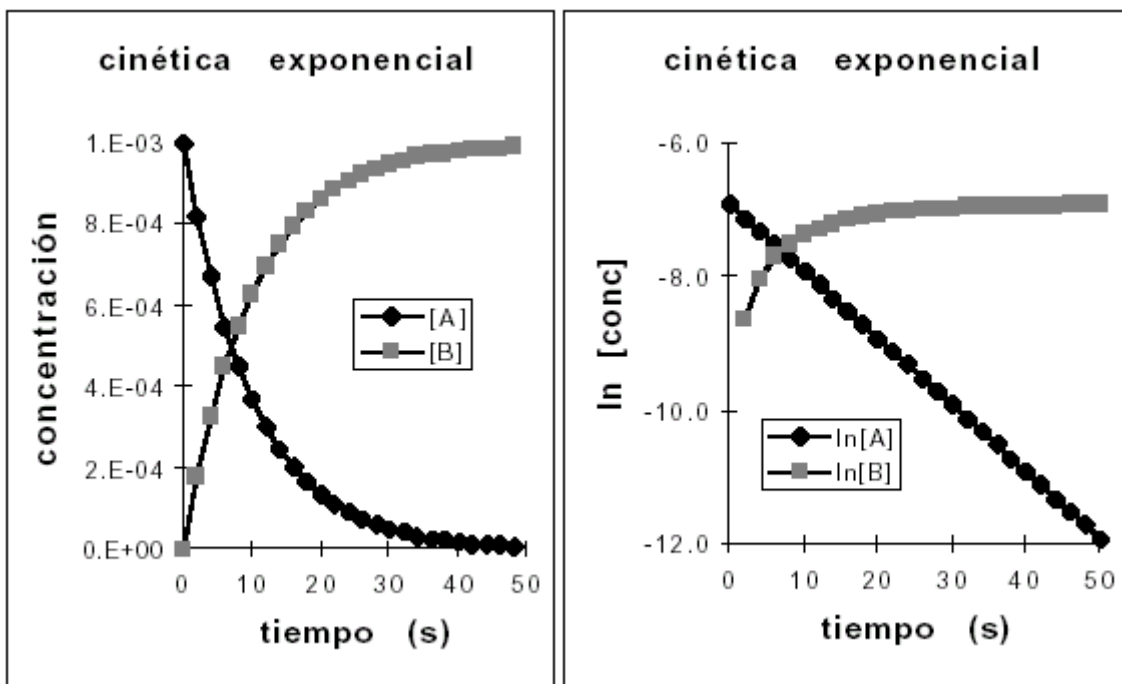
Solución integrada:

$$\int d[A]/[A] = -k \int dt$$
$$\ln [A] = -kt + \ln [A_0]$$
$$[A] = [A_0] e^{-kt}$$

En cualquier reacción de primer orden (del tipo $A \rightarrow B$), habrá una caída **exponencial** de la concentración del reactivo, como se puede ver en el cuadro izquierdo de la gráfica que se muestra a continuación, correspondiente a una reacción en la que $[A_0] = 10^{-3} \text{ M}$ y $k = 0,1 \text{ s}^{-1}$. Puesto que el producto se forma a medida que desaparece el reactivo, se debería producir un correspondiente incremento exponencial en la concentración del producto.

En cualquier reacción de primer orden, hay también una relación lineal entre el $\ln[\text{reactivo}]$ y el tiempo, como se puede ver en el cuadro derecho de la gráfica. La

pendiente de esta gráfica semilogarítmica es sencillamente $-k$. Obsérvese, no obstante, que la representación gráfica del $\ln[\text{producto}]$ frente al tiempo no es una recta.



Una buena aproximación lineal a los datos cinéticos experimentales representados gráficamente como el $\ln[\text{reactivo}]$ frente al tiempo demuestra que una reacción es de primer orden o pseudo-primer orden (ver a continuación).

El **tiempo de vida media** de una reacción ($t_{1/2}$) es el tiempo que tardan en convertirse en productos la mitad de los reactivos. En una reacción de primer orden, $t_{1/2}$ es una constante y se puede calcular a partir de la constante de velocidad, del siguiente modo:

$$t_{1/2} = -\ln(0.5)/k = 0.693/k$$

En el experimento mostrado anteriormente, el tiempo de vida medio es de 6,9 s. Esta relación de reciprocidad entre el tiempo de vida medio y la constante de velocidad resulta muy útil a la hora de hacer un cálculo aproximado del tiempo que tardará en producirse una reacción dada. Así, para $k = 0,01 \text{ s}^{-1}$, el tiempo de vida medio sería de unos 70 s. Para $k = 10 \text{ s}^{-1}$, el tiempo de vida medio sería de unos 0,07 s ó 70 milisegundos. El tiempo de vida medio en las reacciones de primer orden también es independiente de la concentración inicial. Si la primera mitad de las moléculas tarda en reaccionar 20 s, la mitad de las moléculas restantes tardará también 20 s en reaccionar, y

así sucesivamente. El hecho de que el tiempo de vida medio en una reacción unimolecular sea constante significa que, en cualquier tiempo de la reacción, una fracción constante de moléculas de reactivo tiene la energía suficiente para superar la barrera cinética y transformarse en moléculas de producto. Esto tiene sentido porque la energía de un conjunto de moléculas se reparte de forma aleatoria según una distribución de Boltzmann.

Reacción de segundo orden (dimerización)



Ley de velocidad: $-d[A]/dt = k[A]^2$

Solución integrada:

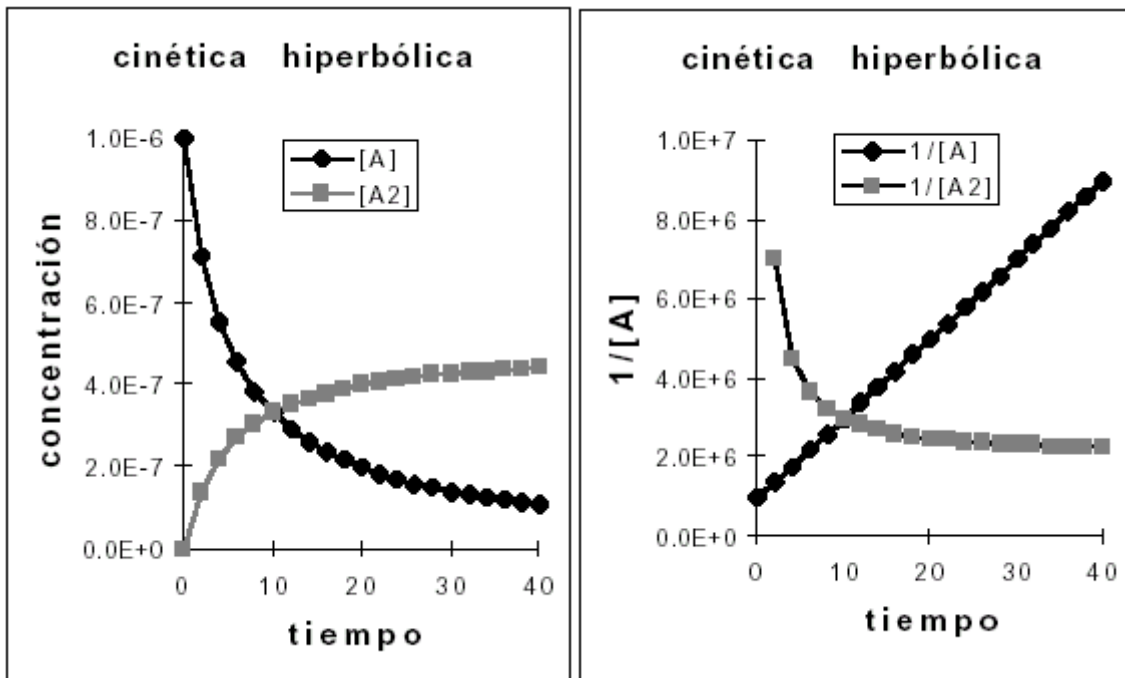
$$\int d[A]/[A]^2 = -k \int dt$$

$$1/[A] = k(t) + 1/[A_0]$$

$$[A] = A_0/(A_0kt + 1)$$

La ecuación anterior es **hiperbólica** y la cinética de dimerización de segundo orden recibe, a menudo, el nombre de cinética hiperbólica.

Las gráficas que se muestran a continuación son de una reacción de dimerización en la que $[A_0] = 10^{-6} \text{ M}$ y $k = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A primera vista, la caída de $[A]$ con el tiempo (cuadro de la izquierda) que se produce en esta reacción de segundo orden parece similar a la de la reacción de primer orden descrita anteriormente, pero en realidad es diferente, como se puede observar por las ecuaciones que describen la variación de $[A]$ en el tiempo.

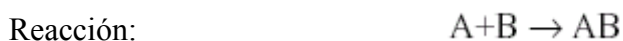


El modo más sencillo de determinar la constante de velocidad en este caso es realizar la representación gráfica de $1/[A]$ frente al tiempo y calcular la pendiente, que equivale a k . Obsérvese, no obstante, que la representación gráfica de $1/[A]$ frente al tiempo no es una recta. La expresión del tiempo de vida medio en este ejemplo de segundo orden es:

$$t_{1/2} = 1/(k[A_0])$$

Para los datos mostrados, el tiempo de vida medio es de 5 s. Sin embargo, cabe destacar que los tiempos de vida medios de las reacciones de segundo orden son muy diferentes a los de las reacciones de primer orden. En las reacciones de primer orden, $t_{1/2}$ es independiente de la concentración inicial de la reacción. En cambio, en este caso, la misma reacción realizada con distintas concentraciones iniciales tendría distintos tiempos de vida medios. Es más, si con una concentración inicial de A dada la mitad de las moléculas tarda en reaccionar 5 s, la mitad de las moléculas restantes tardará 10 s, etc. Esto tiene sentido porque las colisiones entre dos moléculas de A serán menos frecuentes a medida que disminuye la concentración de A.

Reacciones bimoleculares con distintos reactivos:



Ley de velocidad: $-d[A]/dt = -d[B]/dt = k[A][B]$

Solución integrada: COMPLICADA, SALVO EN CONDICIONES ESPECIALES.

Debido a que la solución general para este tipo de reacciones bimoleculares es complicada, para calcular la constante de velocidad de segundo orden se utilizan, generalmente, tres métodos especializados:

- (1) Mezclar A y B en tiempo cero y realizar un cálculo aproximado de la velocidad inicial de la reacción para distintas concentraciones de reactivos. Para $t=0$, $[A]=[A_0]$ y $[B]=[B_0]$; la constante de velocidad se puede calcular, por tanto, como:

$$k = (\text{velocidad inicial})/([A_0][B_0])$$

- (2) Disponer el experimento de modo que $[A_0] = [B_0]$. De este modo, la solución integrada es igual a la de la reacción de dimerización mostrada anteriormente y la constante de velocidad se puede obtener a partir de la representación gráfica de $1/[A]$ ó $1/[B]$ frente al tiempo.

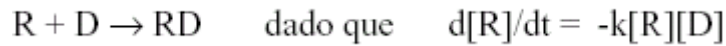
- (3) Disponer el experimento de modo que $[A_0] \gg [B_0]$ o viceversa. Si hay un gran exceso de A con relación a B, la concentración de [A] no presentará un cambio significativo durante la reacción y la constante de velocidad se puede escribir de la siguiente forma:

$$-d[B]/dt = k[A_0][B] = k_{\text{aparente}}[B] \quad \text{donde} \quad k_{\text{aparente}} = k[A_0]$$

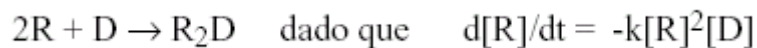
Obsérvese que esta expresión de velocidad tiene la misma forma y la misma solución integrada que una reacción de primer orden. De este modo, podríamos realizar la representación gráfica del $\ln[B]$ frente al tiempo y obtener una recta con una pendiente igual a $-k[A_0]$. Mediante la manipulación de las concentraciones iniciales, hemos convertido una reacción bimolecular en una **reacción de pseudo-primer orden**. Sin embargo, a diferencia de una reacción de primer orden, en este caso no obtendremos el mismo valor de k_{aparente} en experimentos realizados con distintas concentraciones iniciales de $[A_0]$.

Cómo probar los mecanismos de reacción: uno de los usos de la cinética en bioquímica es determinar qué modelo representa mejor una reacción de interés. Digamos, por ejemplo, que tenemos una proteína enlazante de ADN monomérica (R)

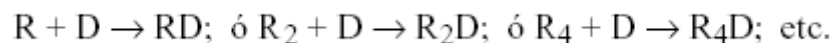
que se enlaza a un fragmento de ADN (D) de 20 bp, pero no sabemos si lo hace como monómero o como dímero. Si calculamos la velocidad inicial de la reacción de asociación (formación) y vemos que varía linealmente con [R], entonces el método más adecuado sería:



Por el contrario, si al calcular la velocidad inicial de la reacción de asociación vemos que varía proporcionalmente a $[R]^2$, entonces el modelo idóneo sería:



A menudo, los experimento cinéticos, por sí mismos, se pueden utilizar para descartar ciertos modelos, pero no pueden distinguir entre otros modelos que indican la misma dependencia de la concentración por parte de las velocidades. En el caso anterior, por ejemplo, especificábamos que la proteína enlazante de ADN libre era monomérica. ¿Qué pasaría si no conociéramos la estructura oligomérica de la proteína en estado libre? Ahora, un cambio lineal en la velocidad inicial de asociación con un incremento de la concentración inicial de proteína sería coherente con modelos de reacción del tipo:

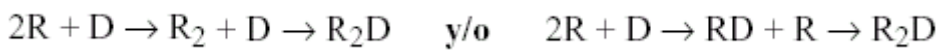


En este caso, para distinguir entre los distintos modelos de reacción sería necesario disponer de información adicional sobre la estructura oligomérica de las proteínas en estado libre y/o enlazado.

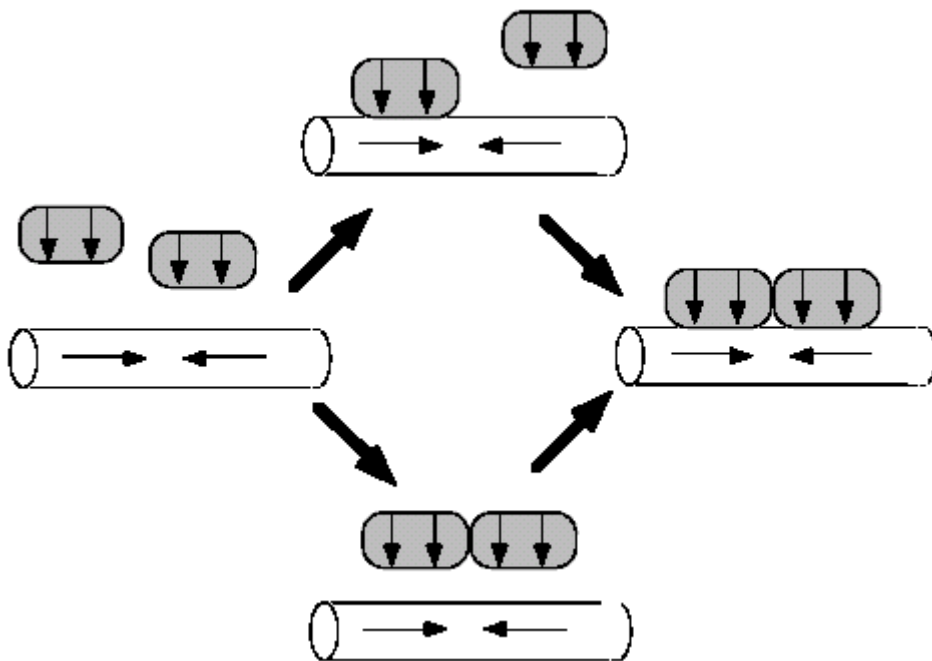
*POSIBLE PUNTO DE CONFUSIÓN: todas las reacciones de tipo $2R + D \rightarrow R_2D$, $2R_2 + D \rightarrow R_4D$ y $2R_4 + D \rightarrow R_8D$, indican la misma dependencia cuadrática de la concentración de proteína por parte de la velocidad de reacción, debido a que, en todos los casos, se combinan en los complejos dos moléculas de proteína libres. Del mismo modo, $R + D \rightarrow RD$, $R_2 + D \rightarrow R_2D$ y $R_4 + D \rightarrow R_4D$, indican todas la misma dependencia lineal de la concentración de proteína por parte de la velocidad de asociación, puesto que no se produce ningún cambio en la estructura oligomérica de la proteína al pasar de la especie libre a la enlazada. **Por tanto, la clave de la cinética no***

radica en si un oligómero está enlazado, sino en si se produce o no un cambio en la estructura oligomérica durante la reacción de enlace.

Reacciones en varias etapas: a menudo, las reacciones no se producen en una única etapa, sino que presentan uno o más intermedios. Examinemos la reacción $2R + D \rightarrow R_2D$ mencionada anteriormente. Es poco probable que tres moléculas (2 de proteínas y 1 de ADN) colisionen en disolución en el mismo instante para formar el complejo termodinámico. Hay dos formas distintas en las que se podría producir la formación del complejo R_2D mediante reacciones bimoleculares sucesivas:

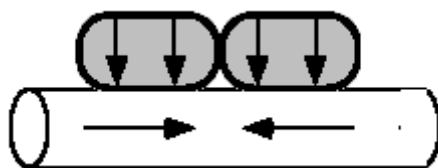


ambas formas se muestran de modo esquemático en el diagrama siguiente:

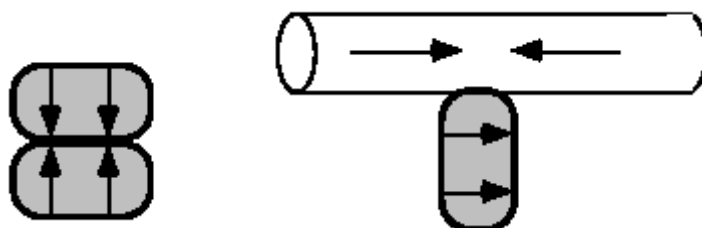


Estos mecanismos no son necesariamente excluyentes entre sí pero, si sólo uno de ellos representara el verdadero camino de formación, ¿qué tipo de experimentos podrían ayudar a decidir entre ambos modelos? Uno podría ser la identificación de los intermedios predichos. ¿Forma la proteína un dímero en ausencia de ADN a concentraciones suficientemente elevadas? ¿Será visible en un experimento de electroforesis en gel una especie que presente el comportamiento electroforético esperado para RD? La detección de las especies R_2 o RD por sí misma, no prueba que

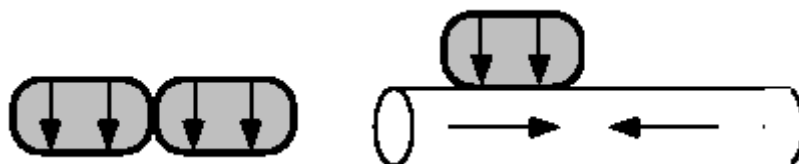
estas especies participen como **intermedios en el camino** de la reacción. Por ejemplo, hemos dibujado el dímero de enlace de ADN del siguiente modo:



pero puede que las especies intermedias R_2 y RD presenten las siguientes estructuras:



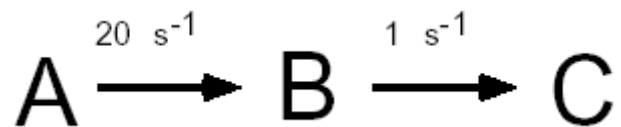
Estas especies podrían formar parte de la reacción, pero **no intervenir en el camino** y no ser, en realidad, relevantes para la reacción de enlace. Si se averiguara que las especies R_2 y RD presentan estructuras más razonables, como por ejemplo:



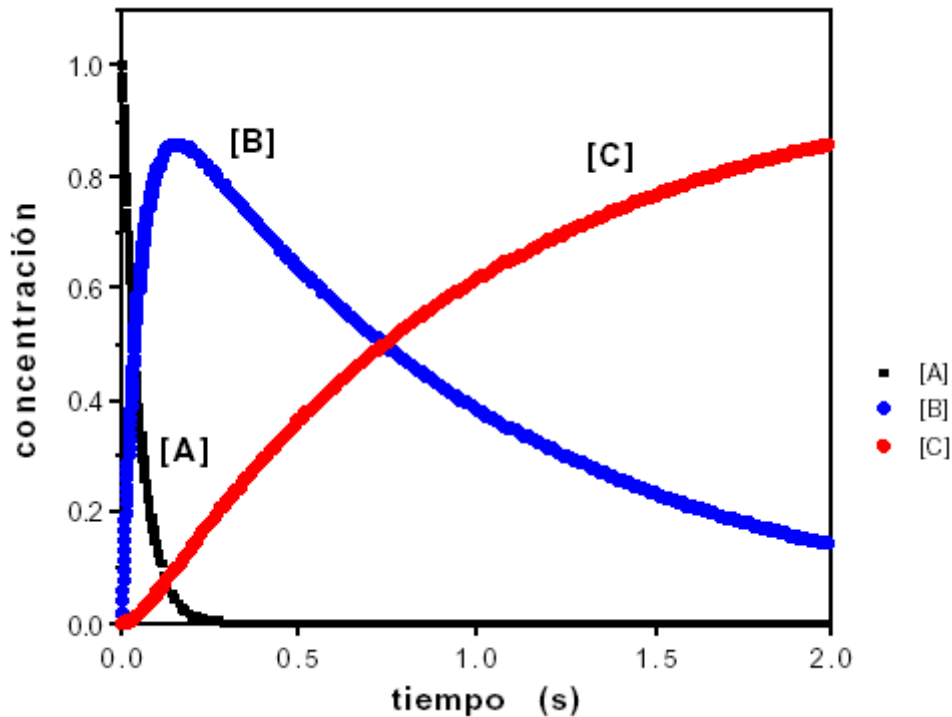
habría más posibilidades de que fuesen intermedios de la reacción de enlace, pero tampoco sería una garantía. La **regla de importancia cinética** dice que para que una especie sea un auténtico intermedio de una reacción se debe formar y desaparecer como mínimo a una velocidad similar a la del producto final. Por tanto, si se detecta alguna de estas especies (R_2 o RD) en la reacción, pero se observa que su velocidad de formación es inferior a la de R_2D , esto las descartaría como intermedios significativos del camino principal de reacción. Del mismo modo, si R_2 fuera un auténtico intermediario, la adición de D a R_2 purificado debería dar lugar a la formación de R_2D a una velocidad como mínimo similar a la de su formación a partir de $2R$ y D .

Etapas limitantes de la velocidad: en las reacciones de más de una etapa, es frecuente que una etapa o reacción elemental se produzca más lentamente que el resto, limitando la velocidad del proceso global. Es decir, la velocidad de la reacción global la determina la velocidad de su etapa más lenta. En estos casos, aumentar la velocidad de las otras reacciones elementales tendría un efecto inapreciable en la velocidad global de la reacción. En los sistemas biológicos, las etapas limitantes de la velocidad son generalmente las que siguen la regla.

En el ejemplo unimolecular que se muestra a continuación, la constante de velocidad de la etapa $B \rightarrow C$ es muy inferior a la de la etapa $A \rightarrow B$. De este modo, $B \rightarrow C$ es la reacción elemental más lenta y, por tanto, la que determina la velocidad.



Cuando escribimos reacciones como ésta, sin las reacciones en sentido inverso, damos por supuesto que las constantes de velocidad de dichas reacciones inversas son bajas con respecto a las de las reacciones directas. En este modelo, ¿qué pasará si iniciamos la reacción con A en estado puro? A se convertirá rápidamente en B, pero puesto que B se convierte en C a menor velocidad, la concentración de B aumentará, como se muestra a continuación, mientras C irá apareciendo con una cinética mucho más lenta.

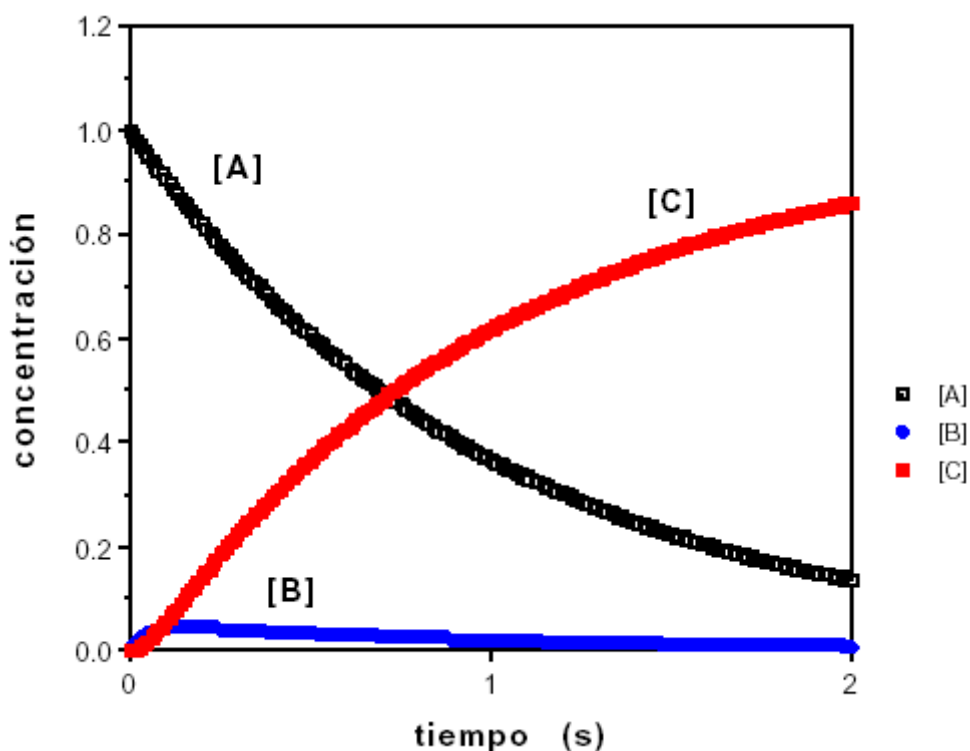


En este caso, B cumple claramente la ley de importancia cinética, puesto que se forma y desaparece más rápido de lo que aparece C. Obsérvese también que la formación de C se produce con un tiempo de vida medio $\approx 0,7$ s. y una velocidad de aproximadamente 1 s^{-1} , que es igual a la constante de velocidad de la reacción elemental más lenta.

A continuación, examinemos la misma reacción, pero con las constantes de velocidad intercambiadas.

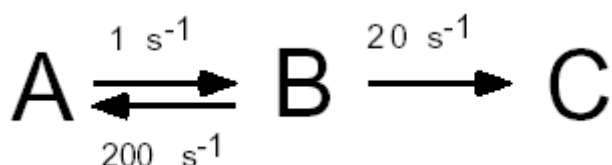


En esta ocasión la etapa $A \rightarrow B$ es limitante de la velocidad. Una vez que se forma B, se convierte rápidamente en C y, como se muestra a continuación, apenas llega a acumularse una pequeña cantidad del intermediario B. Por lo general, los intermediarios sólo alcanzan cantidades significativas cuando preceden a una etapa lenta o a una que sea determinante de la velocidad de la reacción global.



En esta reacción, al principio B también se forma más rápido que C (cumpliéndose la regla de importancia cinética), pero puede resultar difícil demostrar esto experimentalmente para pequeñas cantidades de B y C, sin el empleo de análisis muy sensitivos. Una vez más, obsérvese que la formación de C se produce con un tiempo de vida medio de $\approx 0,7$ s. y una velocidad de aproximadamente 1 s^{-1} , que es igual a la constante de velocidad de la reacción elemental más lenta.

Preequilibrios limitantes de la velocidad: hasta ahora, hemos estudiado en gran medida reacciones que tienen lugar en una sola dirección, pero una clase típica de reacciones cinéticas incluye situaciones como la siguiente:



En este caso, una vez que se forma una molécula de B, puede reaccionar en sentido inverso y volver a transformarse en A o bien seguir adelante para formar C. Teniendo en cuenta las constantes de velocidad mostradas, debería quedar claro que la mayor parte de B reaccionará en sentido inverso para volver a formar A, ya que la constante de

velocidad de esta etapa es 10 veces mayor que la constante de velocidad de la etapa para la conversión B→C. Así, en este modelo, se debería tardar 10 veces más en formar la misma cantidad de C que en el modelo en el que B→A no estaba permitida.

En estos sistemas, A y B se equilibran eficazmente:

$$K_{ab} = [A]/[B] = (200 \text{ s}^{-1})/(1 \text{ s}^{-1}) = 200$$

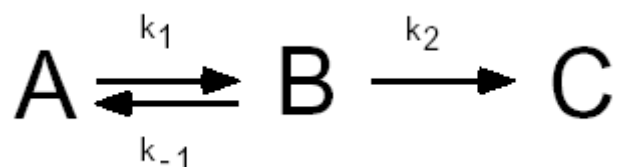
por lo que nunca habrá demasiado B en relación con A. La velocidad a la que se forma C es de sólo $20 \text{ s}^{-1}[B]$.

Si se sustituye por [B], da:

$$d[C]/dt = (20 \text{ s}^{-1})/(200) [A] = 0.1 \text{ s}^{-1} [A]$$

De este modo, el tiempo de vida medio para la formación de C ahora es de unos 7 s, mientras que antes, cuando la conversión B→A no estaba permitida, era tan sólo de 0,7 s. Este es el mismo resultado que obtuvimos anteriormente al examinar las velocidades a las que B se repartiría entre A y C. Obsérvese que, en este caso, la reacción global es más lenta que cualquiera de las elementales.

El caso mencionado anteriormente es un ejemplo específico de la reacción general:



En las reacciones de este tipo, si $k_{-1} \gg k_2$ (B forma A mucho más rápido de lo que forma C), habrá un preequilibrio limitante de la velocidad y la velocidad global de formación de C dependerá de las tres constantes de velocidad.

$$d[C]/dt = (k_1 k_2)/(k_{-1}) [A] \quad \text{ecuación 3.1}$$

Por el contrario, si suponemos que $k_2 \gg k_{-1}$ (B forma C mucho más rápido de lo que forma A), podemos ignorar tranquilamente la reacción inversa B→A y la única pregunta sería si k_1 o k_2 son determinantes de la velocidad.

Aproximación al punto de estabilidad: la cinética de las reacciones de este tipo se puede analizar también escribiendo la expresión global para la velocidad de cambio de B y estableciendo ésta igual a 0. Al hacer esto, estamos dando por supuesto que la concentración de B alcanza rápidamente un valor de estabilización constante, en el que no se aprecia ningún cambio durante la reacción.

$$d[B]/dt = k_1[A] - k_{-1}[B] - k_2[B] = k_1[A] - (k_{-1} + k_2)[B] = 0$$

$$(k_{-1} + k_2)[B] = k_1[A]$$

$$[B] = (k_1)/(k_{-1} + k_2) [A]$$

Al sustituir [B] por el valor anterior en $d[C]/dt = k_2[B]$, se obtiene:

$$d[C]/dt = (k_1 k_2)/(k_{-1} + k_2) [A]$$

Ahora, si $k_{-1} \gg k_2$:

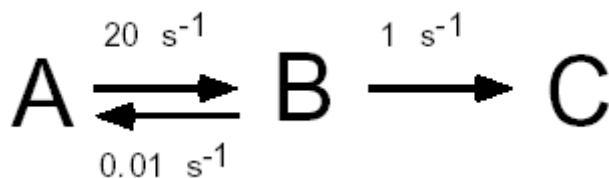
$$d[C]/dt \approx (k_1 k_2)/(k_{-1}) [A] \quad \text{similar a la ecuación 3.1}$$

Por el contrario, si $k_2 \gg k_{-1}$:

$$d[C]/dt \approx (k_1 k_2)/(k_2) [A] = k_1[A] \quad \text{ecuación 3.2}$$

La ecuación 3.2 equivale a decir que la etapa de k_1 es limitante de la velocidad de la reacción global.

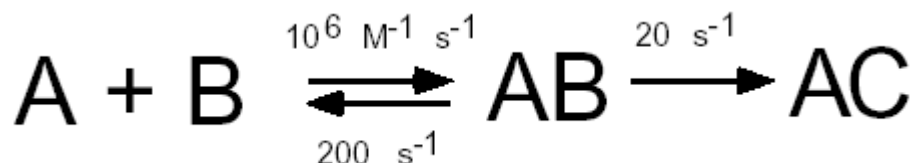
La aproximación al punto de estabilidad no será aplicable a un intermediario cuando éste se forma a una velocidad mucho mayor de la que desaparece. Por ejemplo, para las constantes de velocidad que se muestran a continuación:



B se forma mucho más rápido de lo que desaparece, por lo que la concentración de B aumentará, en lugar de estabilizarse (obsérvese que la cinética, en este caso, debería ser muy similar a la representada anteriormente en la gráfica de la página 15). La mayor parte de B reaccionará para formar C, en lugar de reaccionar en sentido inverso

para volver a formar A; de este modo, la reacción global debería presentar una constante de velocidad de aproximadamente 1 s^{-1} . En este caso, aunque $k_2 \gg k_{-1}$, al utilizar la ecuación 3.2 (que sólo es válida si $d[B]/dt \approx 0$) se obtendría un resultado incorrecto, ya que la suposición de estabilidad no se cumple.

Estas ideas generales sobre preequilibrios rápidos y la aproximación al punto de estabilidad se pueden aplicar también a reacciones en las que la primera etapa es bimolecular. Por ejemplo:



Con las anteriores constantes de velocidad, AB se disociará en A+B a una velocidad 10 veces mayor que la que emplea en isomerizarse en AC. Si comparamos esto con una reacción en la que la velocidad de disociación de AB sea despreciable, la velocidad de formación de AC se reducirá en un factor de 10 aproximadamente. Una vez más, podríamos realizar la aproximación al punto de estabilidad para [AB] y derivar la siguiente expresión:

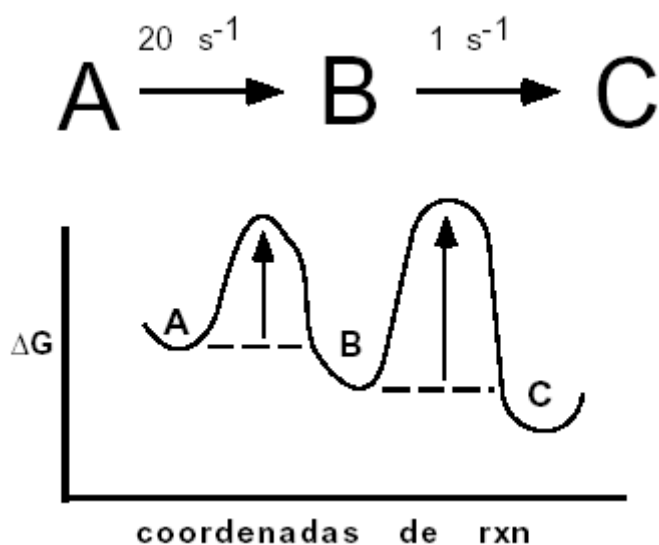
$$d[AC]/dt = (k_1 k_2)/(k_{-1} + k_2) [A][B] \approx (k_1 k_2)/(k_{-1}) [A][B] \quad \text{dado que } k_2 \gg k_{-1}$$

Veremos expresiones como ésta más adelante, cuando estudiemos determinados tipos de reacciones catalizadas por enzimas. Una vez más, cabría esperar que la presunción del punto de estabilidad fallara en el caso general, en el que la velocidad de formación de AB es mucho mayor que su velocidad de disociación. Esto dependerá tanto de las constantes de velocidad como de las concentraciones de A y B.

Qué sucede cuando los intermediarios no se pueden detectar directamente: en algunas ocasiones, los intermediarios de una reacción no se pueden separar en especies moleculares distintas o reconocer directamente. En estos casos, la existencia de intermediarios se deduce, a menudo, por una fase de retardo (*lag phase*) en la cinética, una fase despegue o aceleración (*burst phase*) o por otros tipos de comportamientos multifase (por ejemplo, para cuadrar los datos observados en una reacción unimolecular son necesarias dos fases exponenciales).

Sin embargo, aunque la cinética de una reacción unimolecular se puede determinar bien con una única fase exponencial, el hecho de no detectar intermediarios no es prueba de que no existan. Al contrario, significa que en caso de existir, desaparecen a una velocidad considerablemente mayor de la que se forman. Esto, a su vez, quiere decir que por lo general son inestables, tanto con respecto a los reactivos como a los productos de la reacción. Por ejemplo, durante algunas reacciones de plegamiento de proteínas las únicas especies saturadas detectables son las proteínas totalmente desnaturalizadas o las nativas. En un caso como éste, parece poco probable que una cadena polipéptica desordenada pudiera formar la proteína nativa directamente, en una única etapa, ya que esto supondría que varios cientos de ángulos de enlace nativos se establecieran simultáneamente de forma correcta. Este, probablemente, sea uno de los casos en los que, aunque los intermediarios del plegamiento existen, son inestables y, por tanto, no se acumulan durante el desarrollo de la reacción.

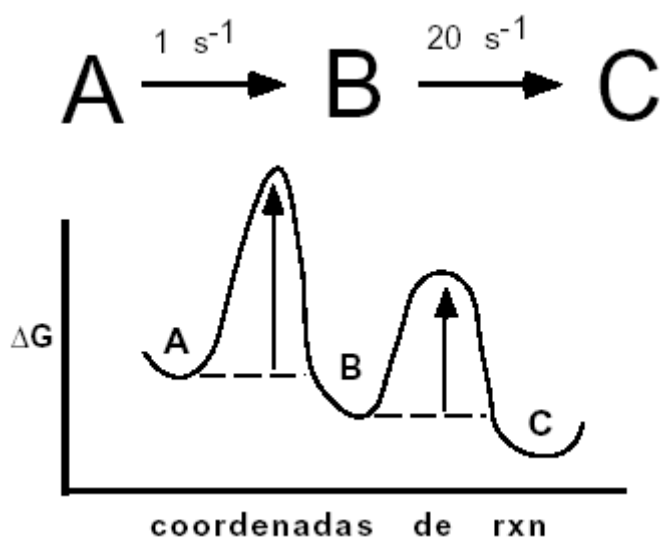
Diagramas de coordenadas de reacción para reacciones con intermediarios: como se ha mencionado anteriormente, cuando escribimos una reacción de más de una etapa que tiene lugar en una sola dirección, lo que estamos haciendo es simplemente ignorar las reacciones inversas, algo que está justificado siempre que las constantes de velocidad de estas reacciones sean mucho más pequeñas que las de las reacciones directas. El diagrama de coordenadas de reacción para una situación de este tipo podría parecerse al siguiente:



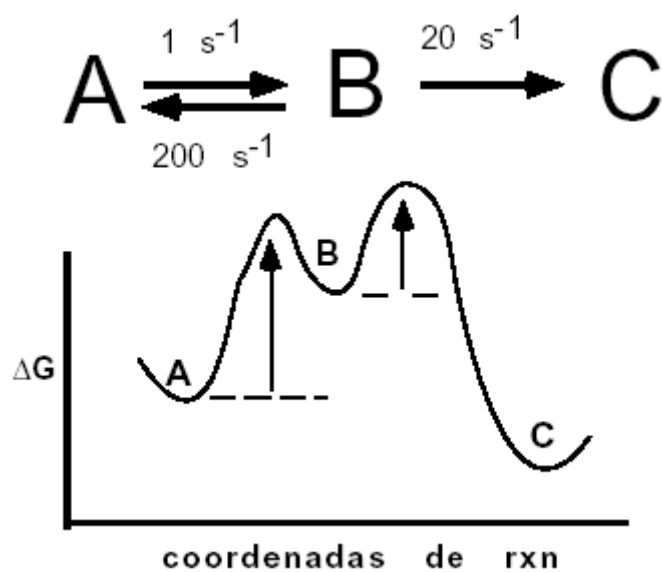
Obsérvese que la energía libre de A es mayor que la de B, la cual, a su vez, es mayor que la de C. La reacción se desarrolla en descenso. Por otra parte, la mayor barrera se

encuentra entre B y C, lo que indica que ésta es también la etapa más lenta. Por último, B se encuentra en el fondo de un profundo valle, de lo que podemos deducir que se acumula.

En el siguiente diagrama de coordenadas de reacción, la primera barrera ha pasado a ser la más alta, lo que corresponde a la etapa más lenta de la reacción; y B se encuentra ahora en un valle mucho menos profundo que antes, por lo que se acumulará también menos como intermediario.



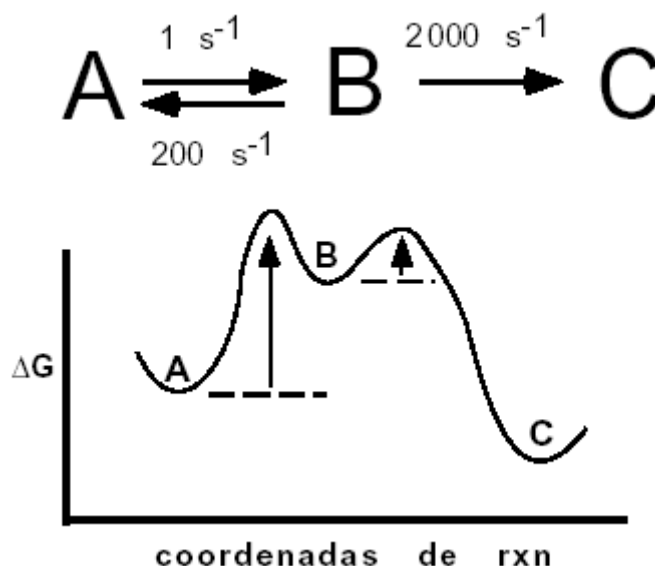
Si ahora examinamos de forma explícita una rápida reacción inversa $B \rightarrow A$, obtendríamos un diagrama de coordenadas de reacción similar a éste:



La primera barrera sigue siendo el proceso elemental más lento, porque la distancia entre A y el punto máximo de la primera barrera supone la mayor variación de energía

libre. Sin embargo, B ahora es menos estable (tiene una energía libre mayor) que A. Una vez que se alcanza B, la reacción inversa hacia A es más favorable desde el punto de vista cinético que la directa hacia C, debido a que la barrera en sentido inverso es menor que la que presenta en sentido directo. En ciertos casos, como es éste, en los que existe una velocidad determinante del equilibrio, el punto más elevado en la representación gráfica todas las energías libres a nivel global (en este caso, el punto máximo de la barrera entre B y C) no representa el proceso elemental más lento, pero sí constituye la etapa determinante de la velocidad de la reacción global.

Examinemos, por ejemplo, qué sucedería a continuación si hacemos que la constante de velocidad de la conversión B→C sea 100 veces más rápida.



De este modo, una vez que una molécula se convierte en B, continuará para formar C en la mayoría de los casos; la barrera entre A y B vuelve a ser otra vez limitante de la velocidad y, al aumentar la velocidad del proceso B→C, la totalidad de la reacción tendrá lugar más rápido, debido a que ya no hay un preequilibrio determinante de la velocidad. Este es uno de los casos en los que regular una etapa cinética que no es el proceso elemental más lento puede tener importantes consecuencias cinéticas sobre la velocidad de la reacción global A→C.