

Trabajos experimentales de fisicoquímica

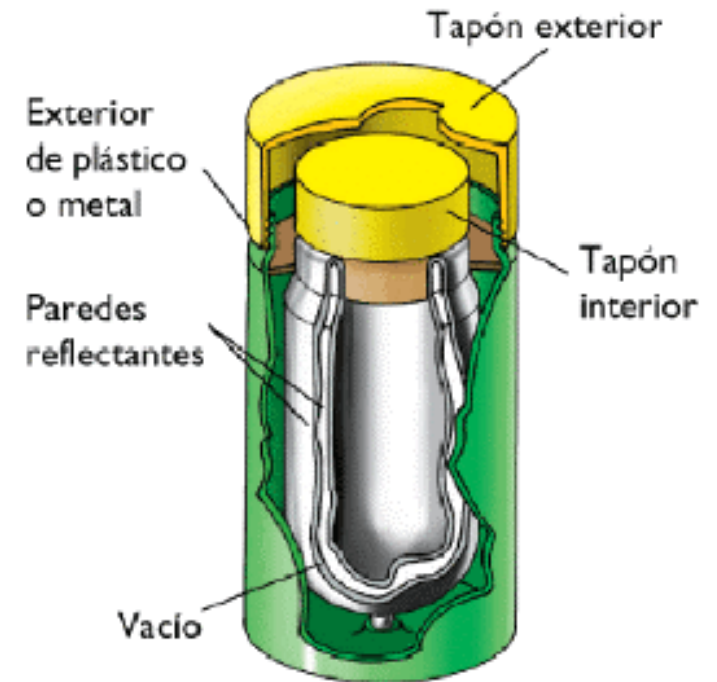
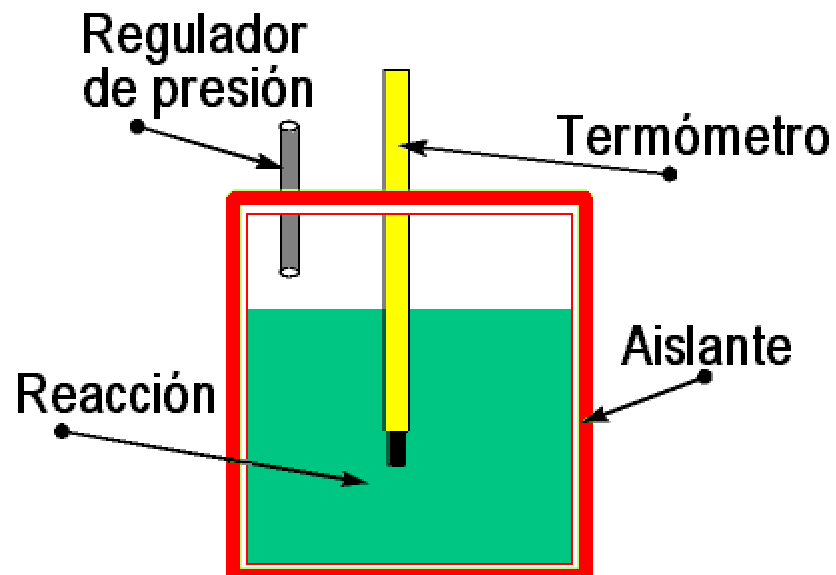
Aplicaciones de las técnicas

Lic. Noelia I. Burgardt

Calorimetría

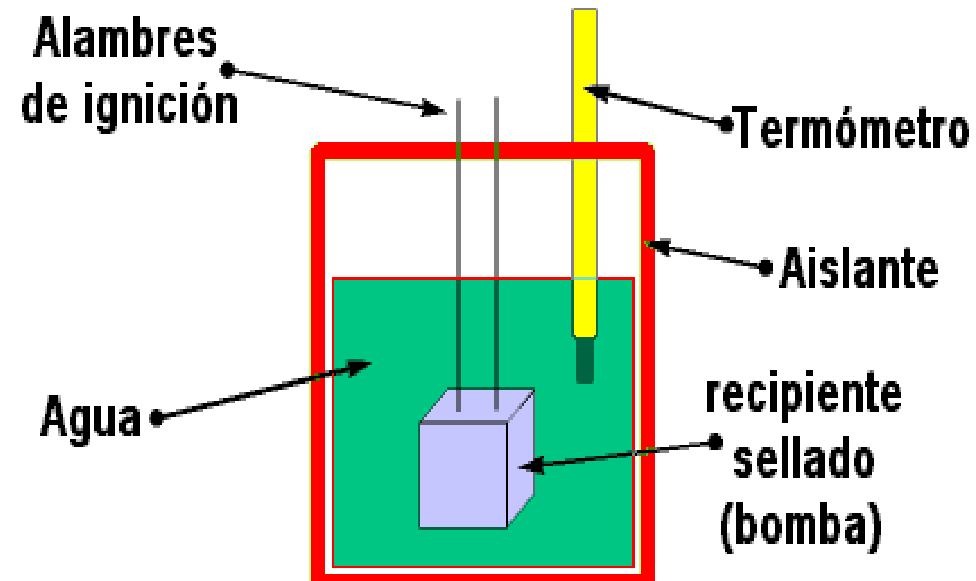
- Calorímetro a Presión constante.
- Calorímetro a Volúmen constante.
- Microcalorímetro diferencia de barrido (DSC).
- Microcalorímetro de titulación isotérmica (ITC).

Calorímetro a Presión constante



Calorímetro a Volúmen constante

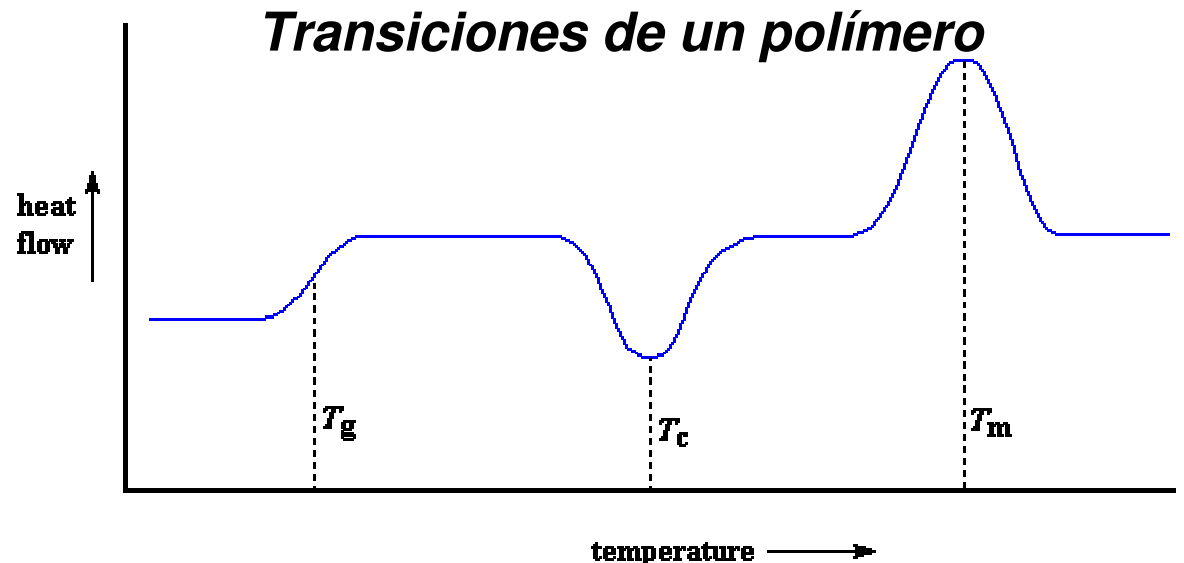
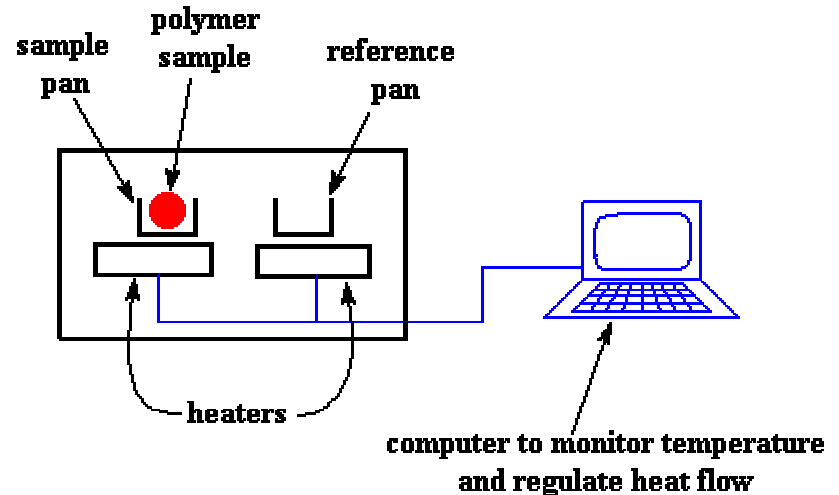
- Determinación del cambio de energía interna ($V=\text{cte}$, $q_V = \Delta U = \int C_V dT$).
- Determinación de reacciones de combustión (alambres de ignición).
- Si los productos de reacción son gases entonces $\Delta H = \Delta U + \Delta nRT$.
- La constante del calorímetro (U_{el}) se mide aumentando la temperatura con un calentador eléctrico ($U_{el} = VIt$).
- También se pueden medir reacciones de ΔU conocidos como referencia.



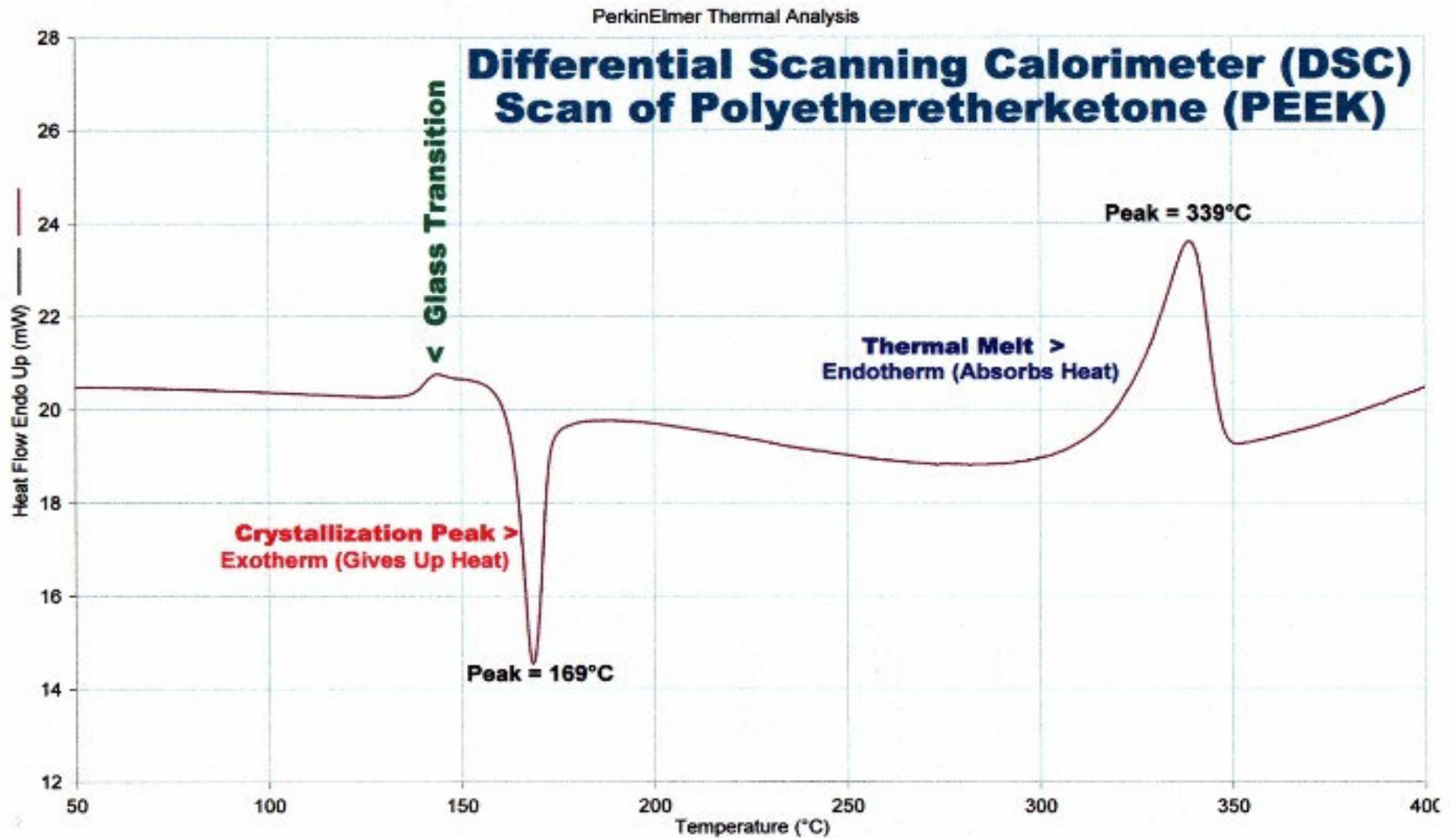
Calorimetría - DSC

Mediante DSC podemos medir los flujos de temperaturas y calor asociados con diversas transiciones:

- Transiciones de vidrio.
- Puntos de fusión y evaporación.
- Tiempo y temperatura de cristalización.
- Calor de Fusión y de Reacción.
- Calor específico y Capacidad calorífica.
- Estabilidad oxidativa.
- Cinéticas de reacción.
- Porcentaje de pureza.
- Estabilidad térmica.

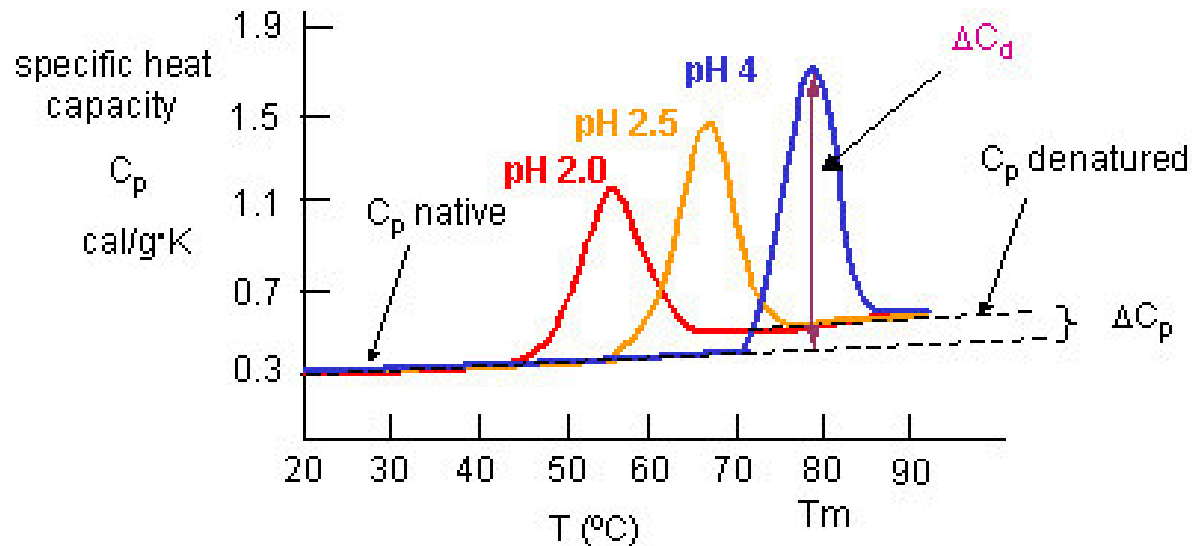


Calorimetría - DSC

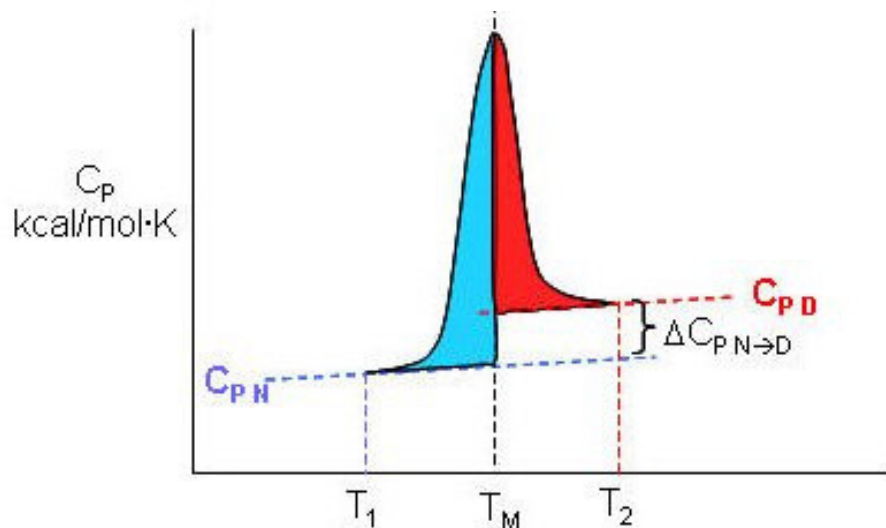


Calorimetría - DSC

Lysozyme Unfolding



Privalov and Khechinashvili. J. Mol. Biol. 86:665 (1974)



$$1. C_p = \frac{dH}{dT}$$

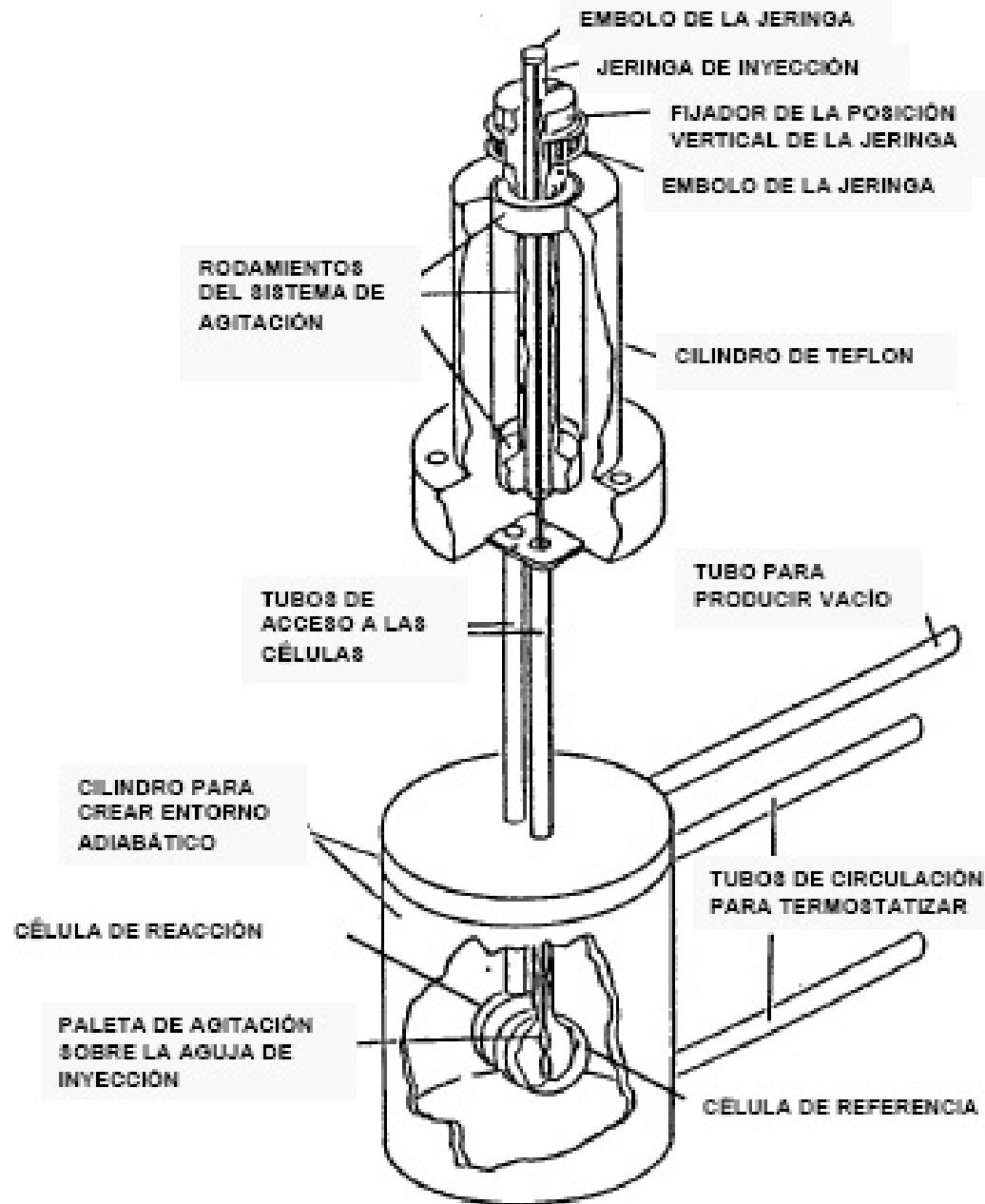
For the actual $N \rightleftharpoons D$ transition,

$$2. dH_d = C_d dT$$

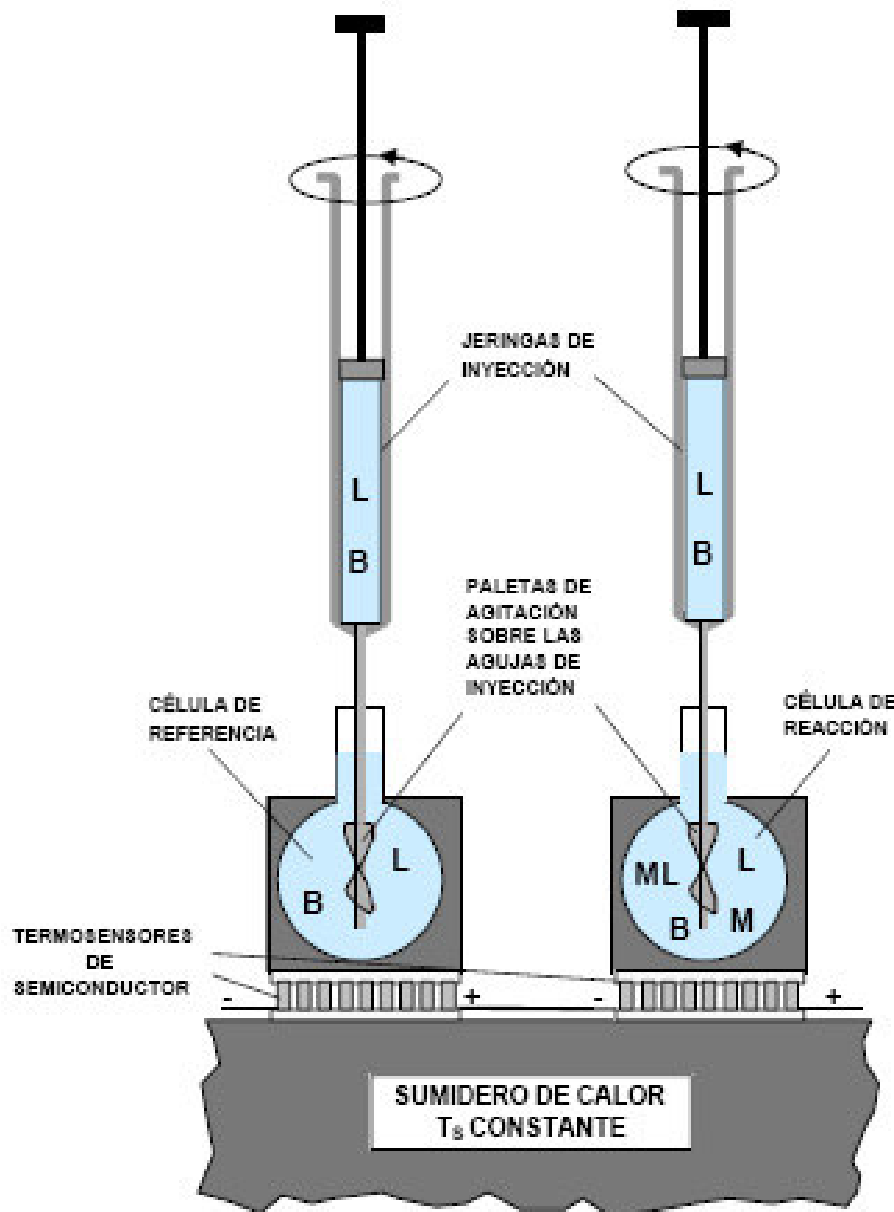
$$3. \int_{T_1}^{T_2} dH_d = \int_{T_1}^{T_2} C_d dT$$

$$4. \langle \Delta H_d \rangle = \int_{T_1}^{T_2} C_d dT$$

Calorimetría - ITC



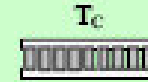
Calorimetría - ITC



Ley de Newton del enfriamiento:

$$\frac{dQ}{dt} = W(t) - \alpha \cdot \Delta T(t)$$

α : Coeficiente de intercambio de calor.



$$\Delta T(t) = T_c(t) - T_s(t)$$

$$E(t) = e \cdot \Delta T(t)$$

e : Coeficiente Seebeck

La fuerza electromotriz generada por la termopila es, aproximadamente, proporcional al flujo de calor o potencia térmica:

$$E(t) = \frac{e}{\alpha} \cdot W(t) = k \cdot W(t)$$

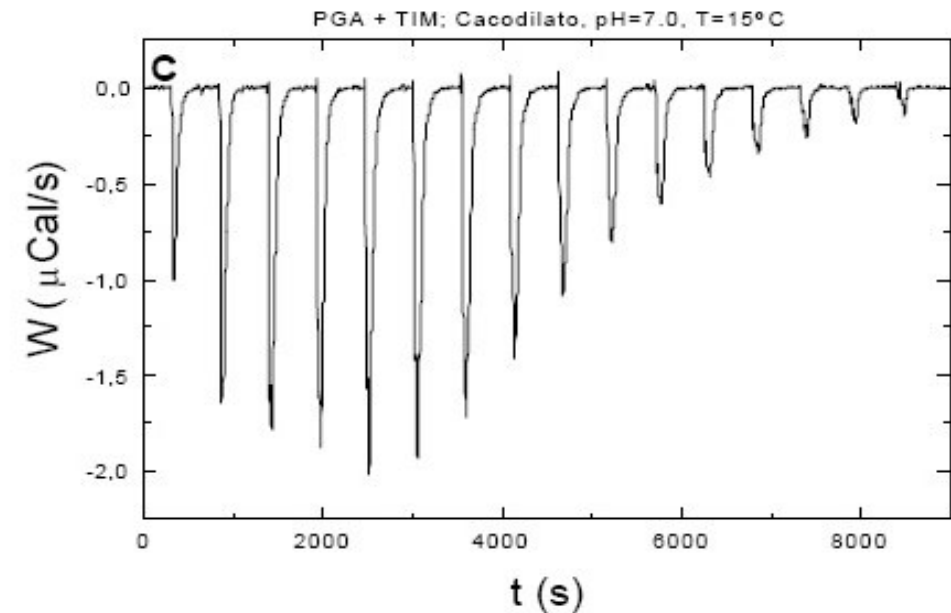
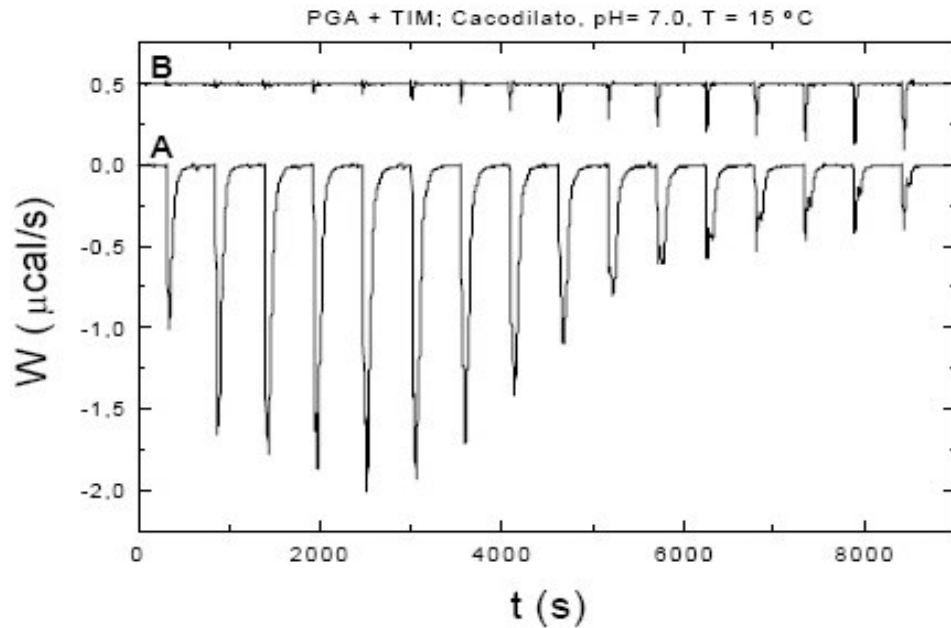
Calorimetría - ITC

- Alta Sensibilidad ($0.1 \mu\text{J}$)
- Respuesta (Rápida 15 s)
- Volumen de Celda Pequeño (0.75 ml)
- Diseño de celda (Cilindrica, 24K Gold)
- Rango de Temperatura ($0 - 80^{\circ} \text{C}$)
- Estabilidad de Línea de Base ($\pm 0.02 \mu\text{Watt/hr}$)
- Bajo Nivel de Ruido ($\pm 0.004 \mu\text{Watt}$)

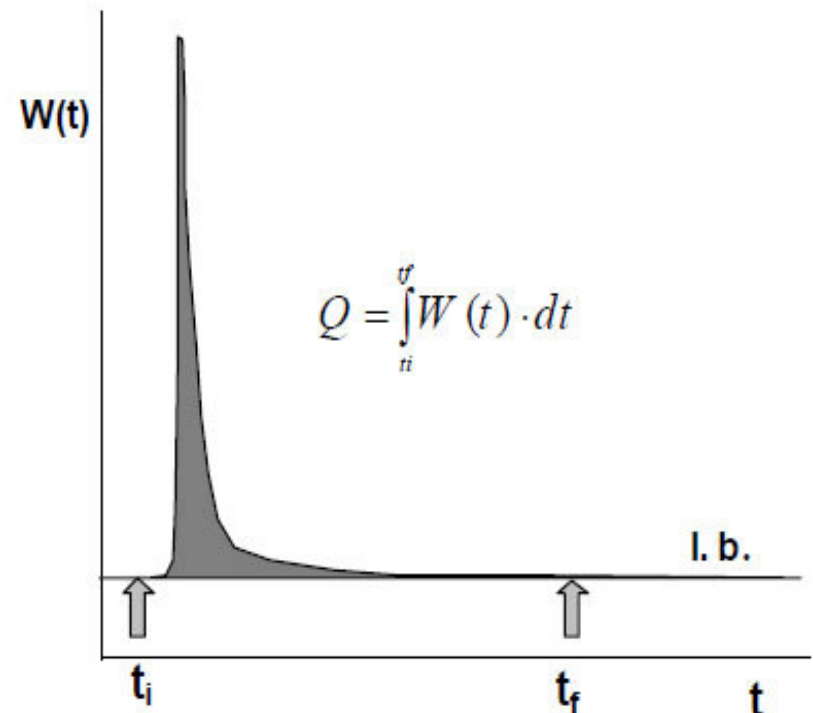
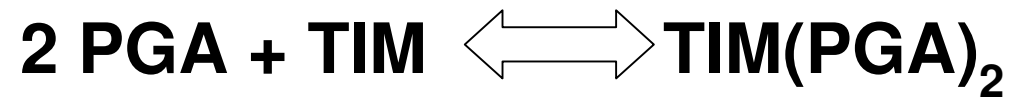
Calorimetría - ITC

- Interacción Enzima - Co-enzima
- Interacción Proteína - DNA
- Interacción de drogas con receptores
- Unión a superficies o interfaces
- Interacción enzima-sustrato
- Formación de vesículas lipídicas/liposomas

Calorimetría - ITC



Interacción entre la enzima
dimérmica TIM y el inhibidor
PGA



Calorimetría - ITC

Independent Set of Multiple Binding Sites

This is the most common model for a binding experiment. The analytical solution for the total heat is determined by the formula:

$$Q = V \cdot \Delta H \cdot \left[[L] + \frac{1 + [M] \cdot n \cdot K - \sqrt{(1 + [M] \cdot n \cdot K - [L] \cdot K)^2 + 4 \cdot K \cdot [L]}}{2 \cdot K} \right]$$

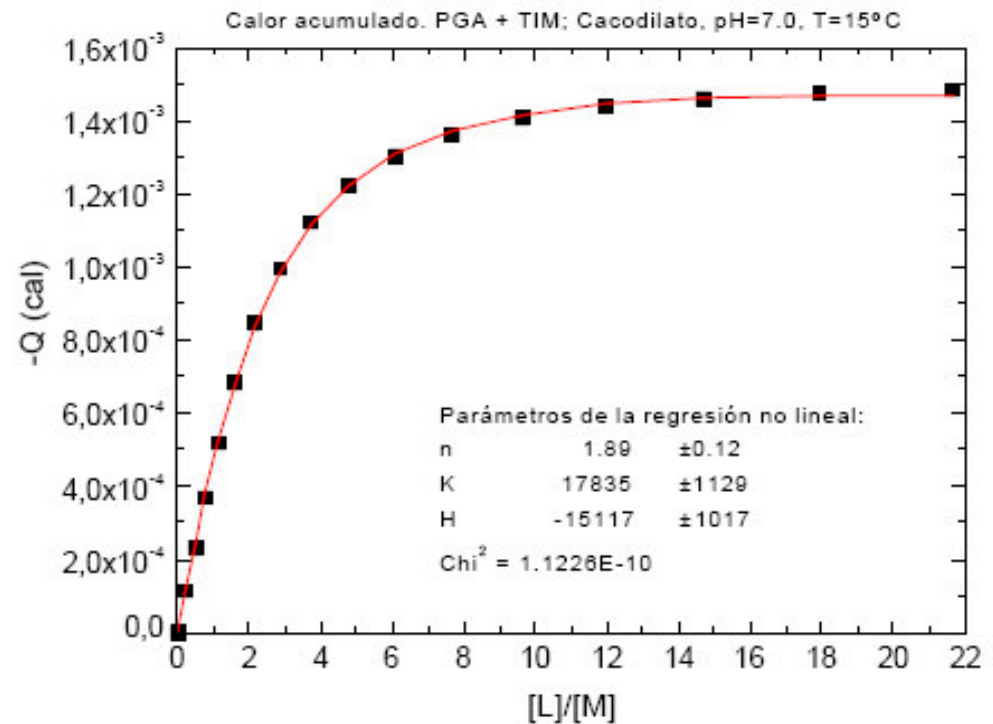
Where the variable parameters for the model are:

- ΔH - is the enthalpy of binding
- K - is the binding constant
- n - is the number of binding sites

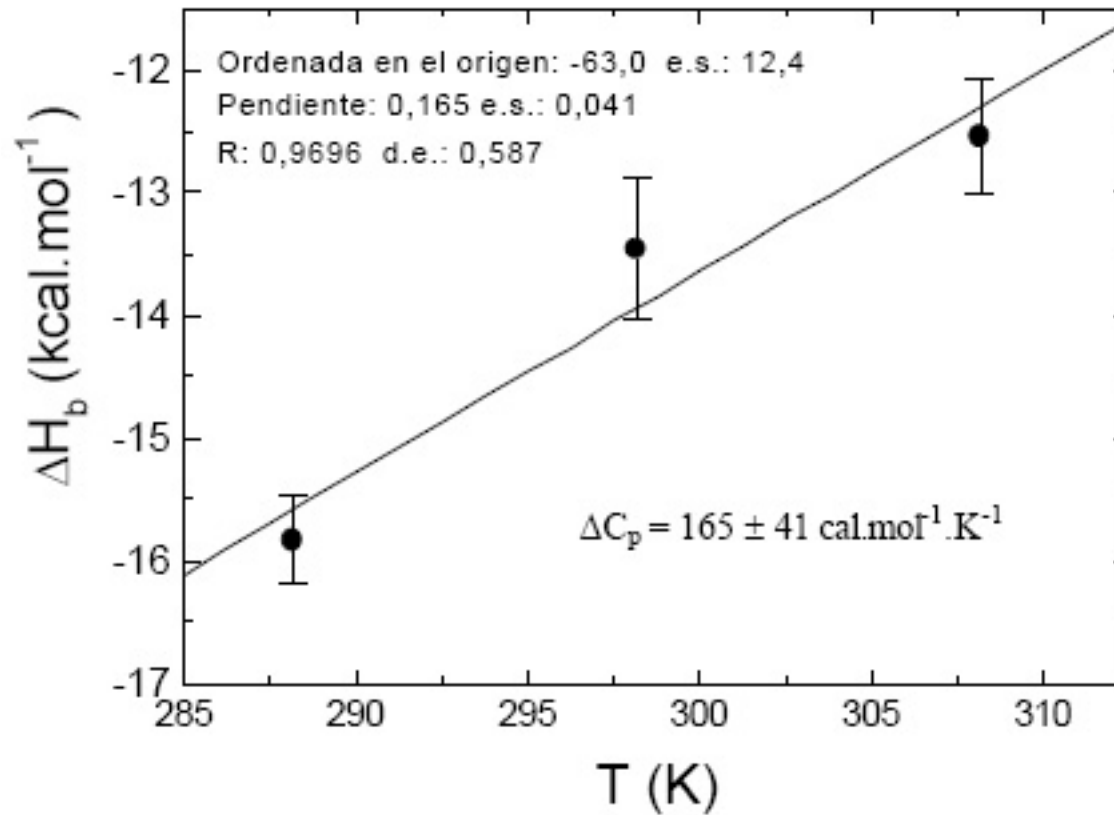
Other variables include:

- V - is the volume of the cell
- $[L]$ - is the total Ligand concentration
- $[M]$ - is the protein concentration

(For more information see Freire E.; Mayorga O.; Straume M. *Analytical Chemistry*, vol. 62, NO 18, 1990.)



Calorimetría - ITC

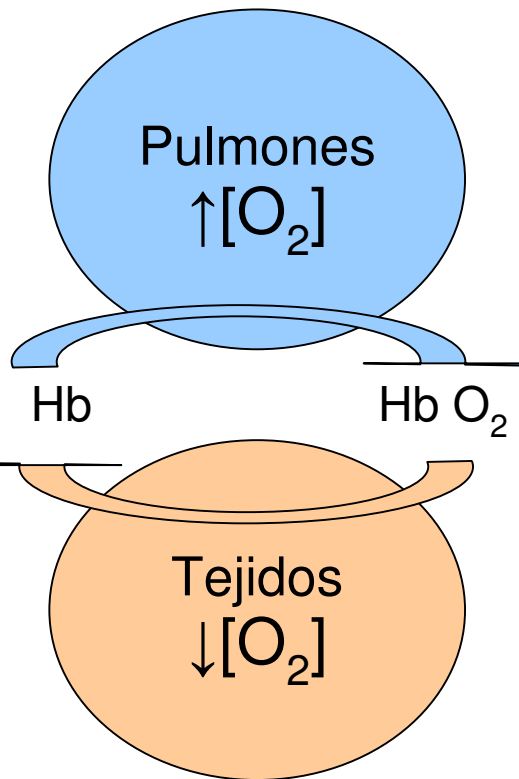


Constante de Equilibrio (K_{eq})

- Determinar la constante de equilibrio de una reacción química.
- Determinar el pKa de sales que pueden usarse como buffer.
- Determinar la constante de equilibrio de dimerización u oligomerización de proteínas.
- Determinar la constante de equilibrio de unión de ligandos a proteínas (afinidad).
- Determinar la constante de equilibrio de partición de proteínas u otras sustancias entre una solución y una membrana lipídica.

K_{eq} - Química de la sangre

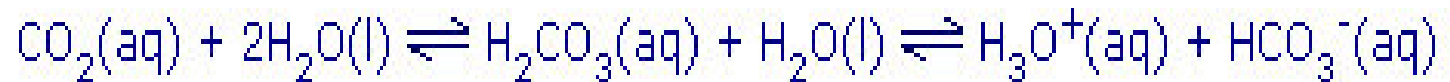
Transporte de oxígeno y dióxido de carbono



Hemoglobina (Hb)



Sistema bicarbonato



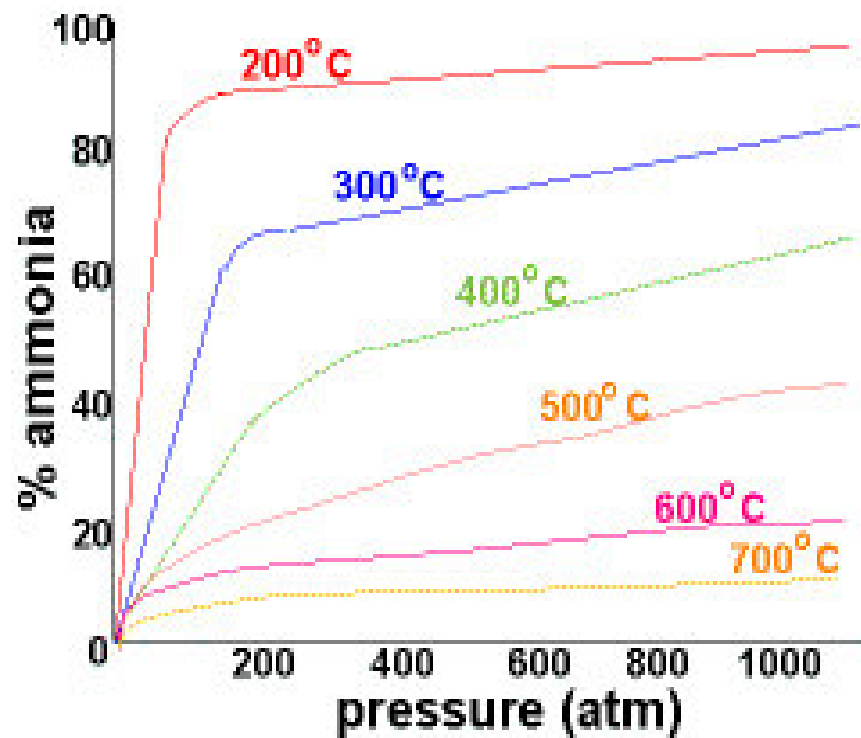
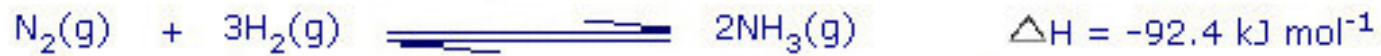
Monóxido de carbono



Constante de reacción
200 veces mayor que
para el oxígeno.

K_{eq} - Producción de amoníaco

Síntesis de amoníaco



Temperature (°C)	K_{eq}
25	6.4×10^2
200	4.4×10^{-1}
300	4.3×10^{-3}
400	1.6×10^{-4}
500	1.5×10^{-5}

$$\left(\frac{\partial \ln(K_a)}{\partial T} \right)_P = \frac{\Delta H_r^0}{RT^2}$$

Usos del Amoníaco

Fertilizantes

- sulfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- fosfato de amonio, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$
- nitrato de amonio, NH_4NO_3
- urea, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, también utilizada en la producción de barbitúricos (sedantes)

Síntesis Química

- ácido nítrico, HNO_3 , explosivos como TNT (2,4,6-trinitrotolueno), nitroglicerina (que también se usa como vasodilatador) y PETN (pentaeritritol nitrato).
- carbonato de sodio hidrogenado (bicarbonato de sodio), NaHCO_3
- carbonato de sodio, Na_2CO_3
- cianuro de hidrógeno, HCN
- hidrazina, N_2H_4 (usada en sistemas de propulsión)

Explosivos

- nitrato de amonio, NH_4NO_3

Fibras y Plásticos

- nylon $[(\text{CH}_2)_4\text{-CO-NH-}(\text{CH}_2)_6\text{-NH-CO}]_n$, y otras poliamidas

Refrigeración

- grandes plantas refrigeradas, aire-acondicionado, etc

Farmacéuticos

- fabricación de drogas como sulfonamida (inhibidor del crecimiento y la multiplicación de bacterias que requieren ácido p-aminobenzoico), para la biosíntesis de ácido fólico, y vitaminas como vitaminas B, nicotinamida y tiamina.

Papel

- sulfito de amonio hidrogenado, NH_4HSO_3 , permite que algunas maderas duras puedan ser utilizadas

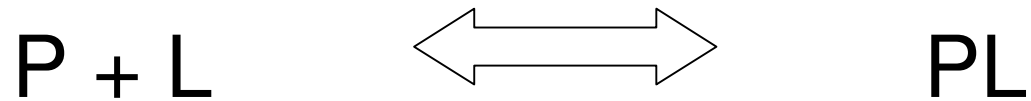
Minería y Metalúrgica

- usado en nitrado (bright annealing) steel,
- usado en extracción de zinc y níquel

Limpieza

- soluciones de amoníaco se usan como agente de limpieza

K_{eq} - Constante de unión



$$K_{unión} = [PL] / [P][L]$$

$$K_{disociación} = [P][L] / [PL]$$

¿Cómo determinamos [PL], [P] y [L]?

K_{eq} - Constante de disociación

$$K_D = [P][L]/[PL]$$

$$[P] = [P]_T - [PL] \text{ y } [L] = [L]_T - [PL]$$

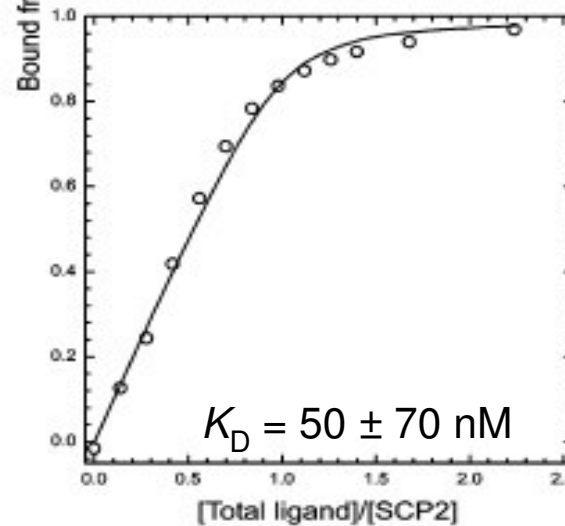
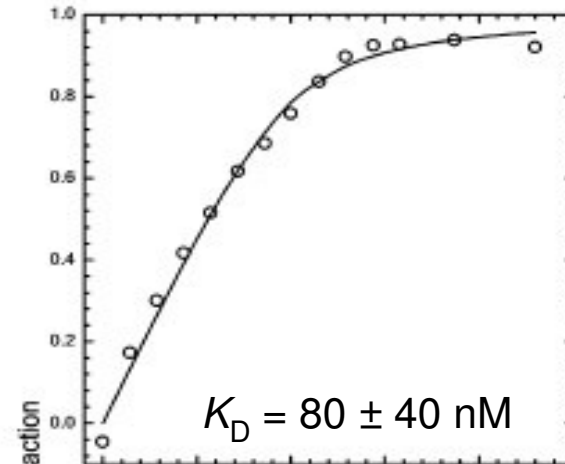
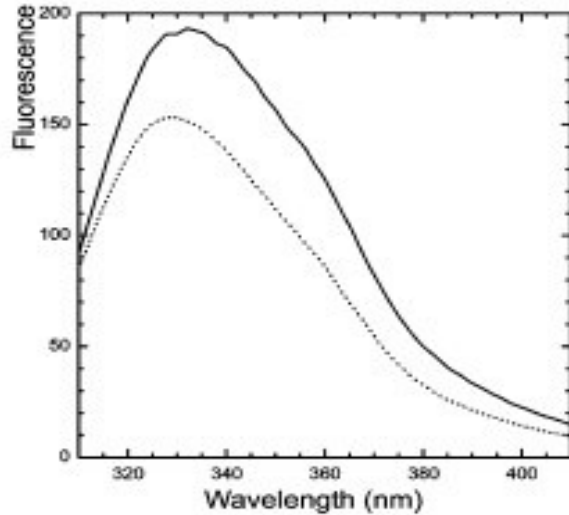
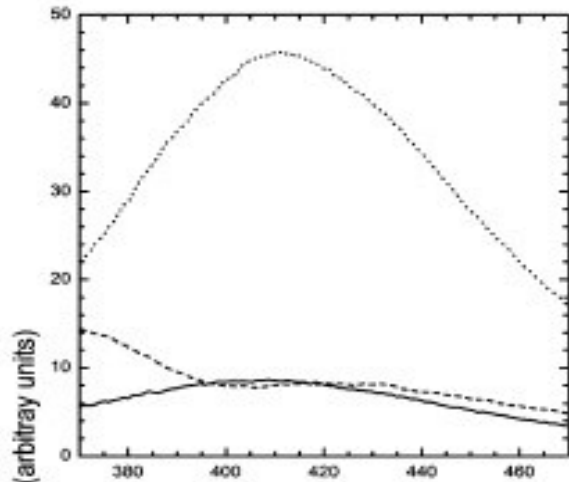
$$[PL] = \frac{([P_0] + [L_0] + K_D) - \sqrt{([P_0] + [L_0] + K_D)^2 - 4[P_0][L_0]}}{2}$$

Si el complejo PL tiene una señal característica (absorbancia, fluorescencia, etc), podemos relacionar esa señal (Y) con la concentración de PL.

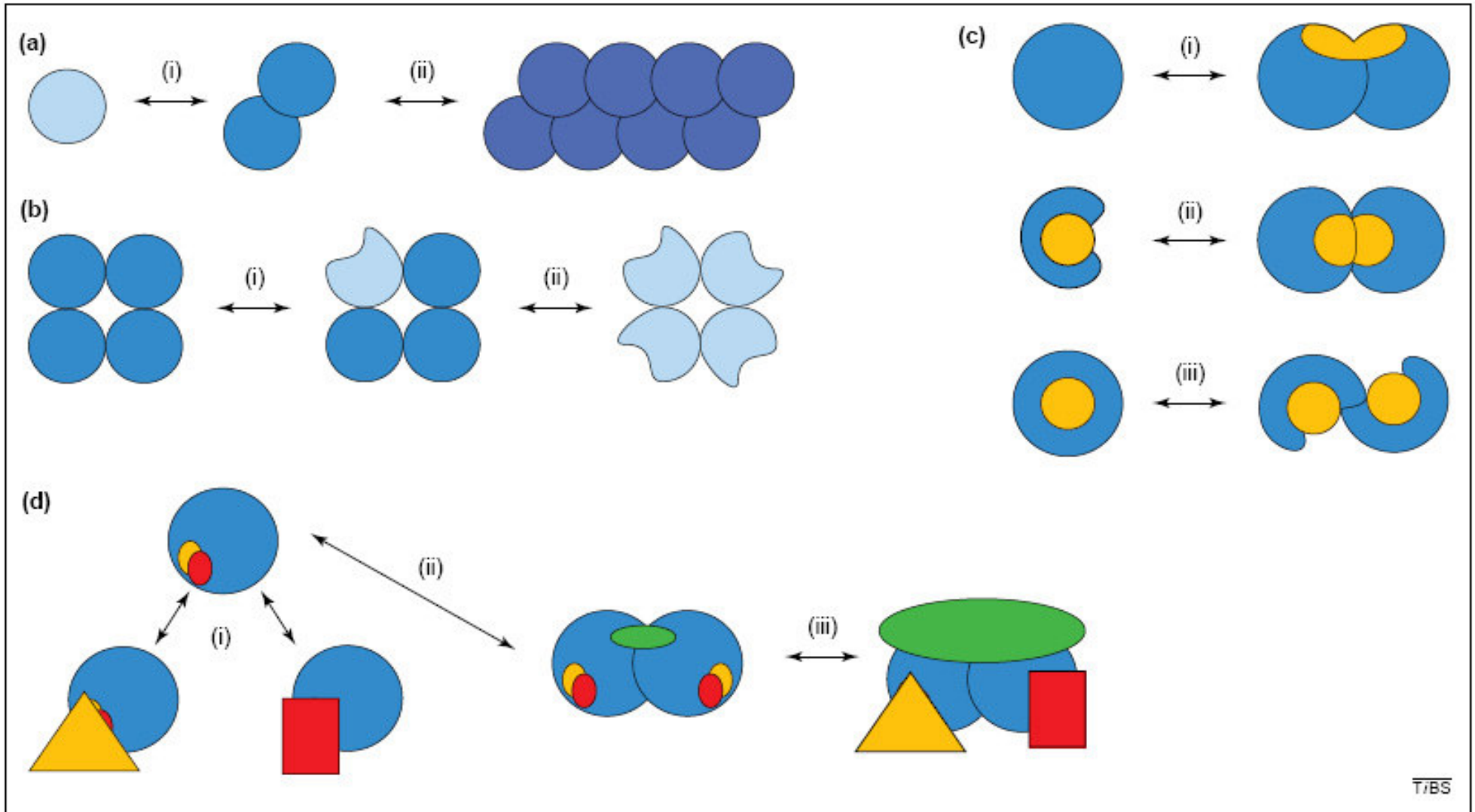
$$Y = Y_{PL} [PL]$$

Con estas ecuaciones se puede hacer un ajuste no lineal sobre los datos experimentales y obtener la constante.

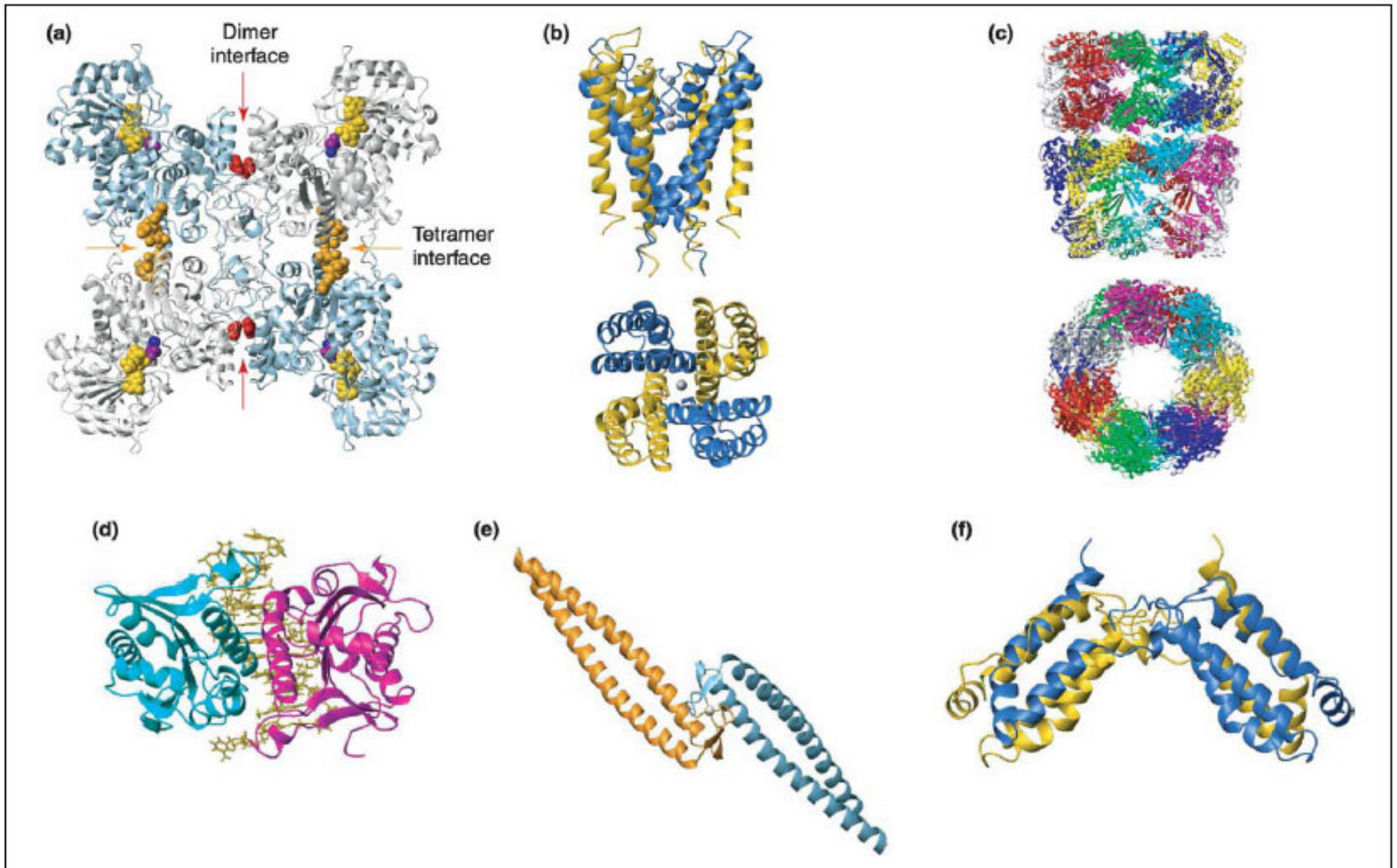
K_{eq} - Constante de disociación



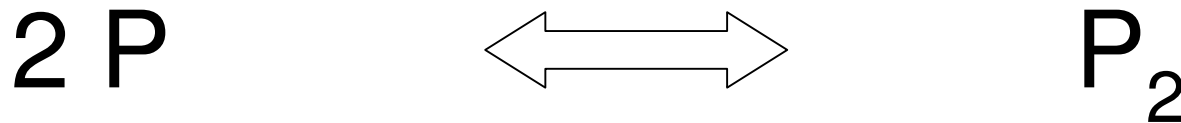
K_{eq} - Interacción entre proteínas



K_{eq} - Interacción entre proteínas



K_{eq} - Constante de dimerización

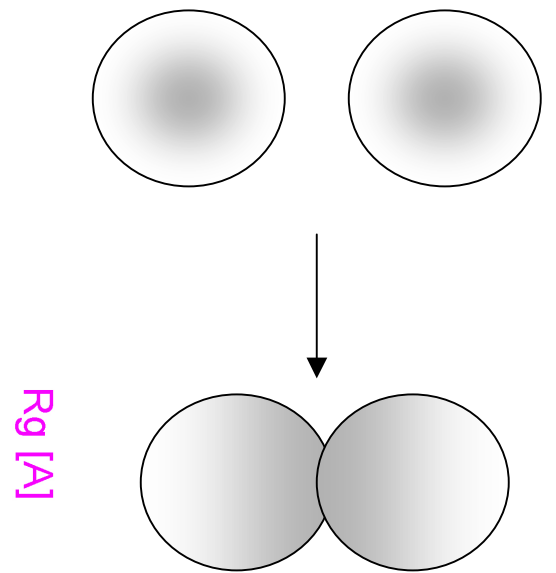
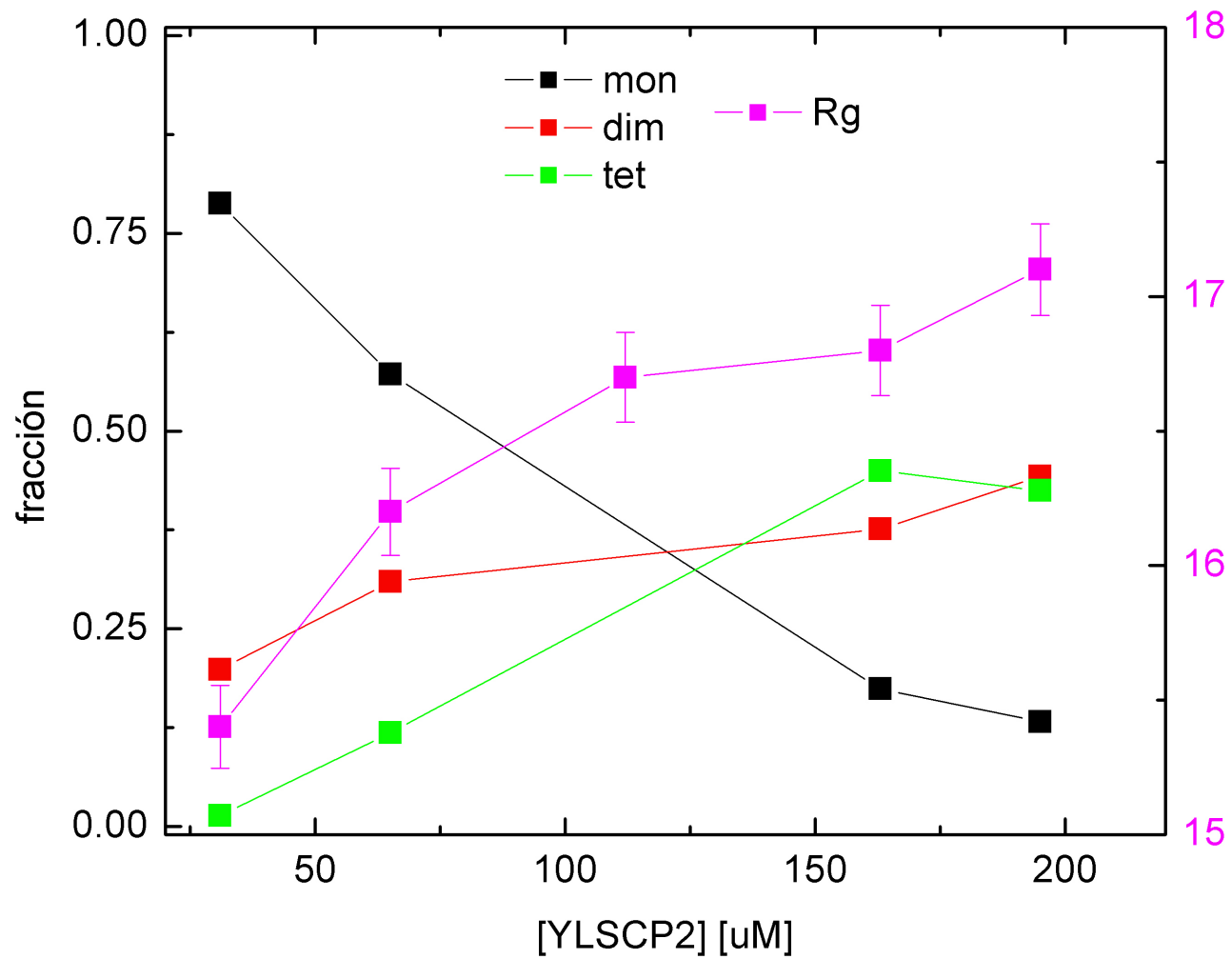


$$K_{dim} = [P_2] / [P]^2$$

Algunas técnicas para medir el tamaño o PM de una proteína:

- Electroforesis.
- Cromatografía de exclusión molecular.
- Espectrometría de masa.
- Dispersión de luz o de rayos X.

K_{eq} - Constante de dimerización



Cinética

- Determinar la velocidad de una reacción química y proponer un mecanismo de reacción.
- Estudiar el efecto de la temperatura, pH, catalizadores y presión sobre la velocidad de una reacción .
- Determinar la actividad de una enzima midiendo velocidades iniciales de reacción.
- Estudiar el efecto de la temperatura, pH, cofactores, concentración de sustrato, inhibidores, etc, sobre la actividad enzimática .

Cinética - Actividad enzimática

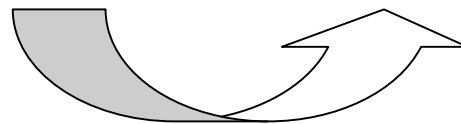
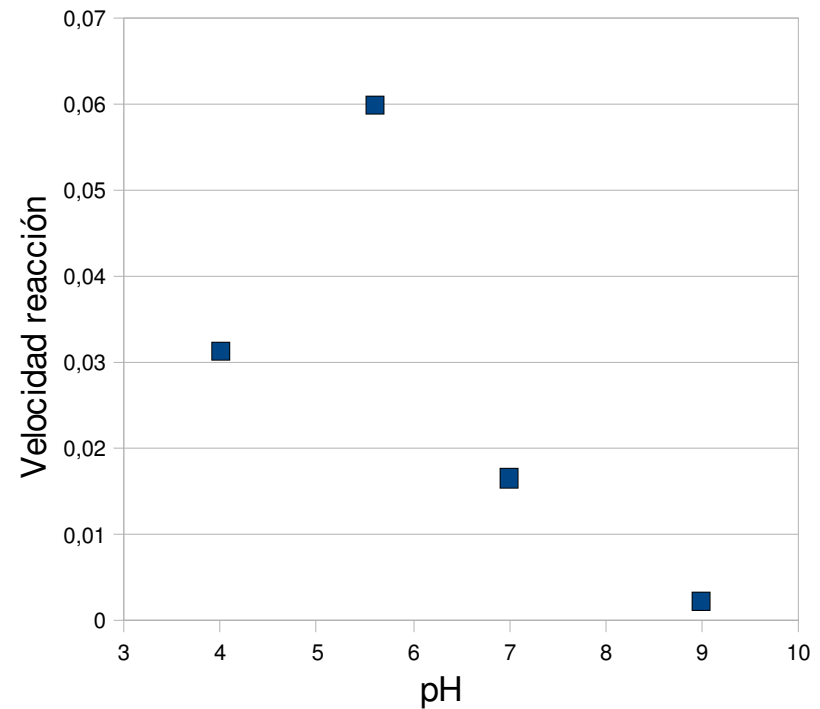
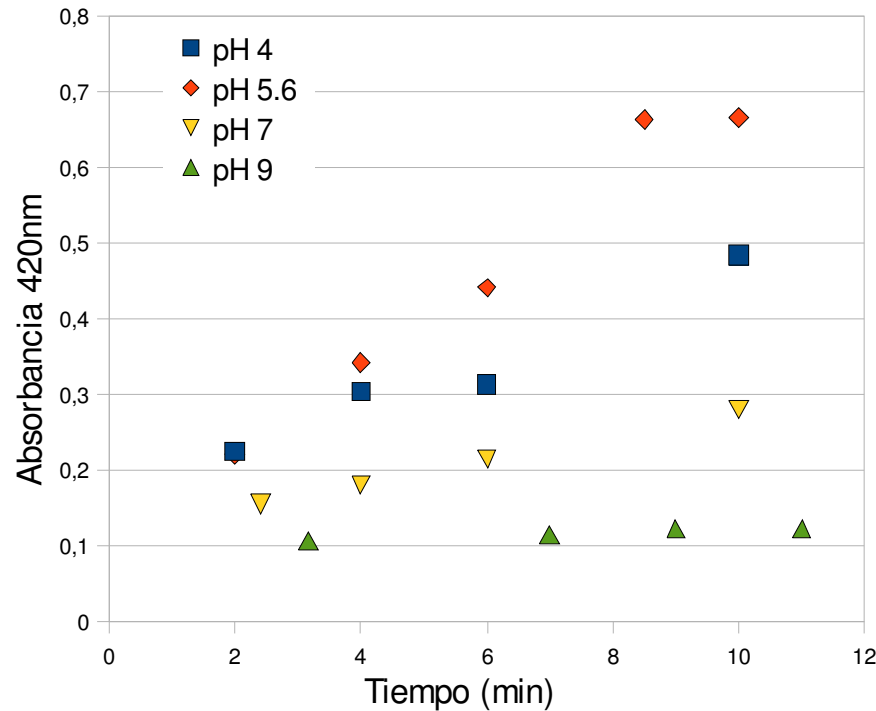


Si el reactivo o el producto tienen una propiedad fisicoquímica específica, la velocidad de reacción se puede medir en base a esa propiedad.

Ejemplo:



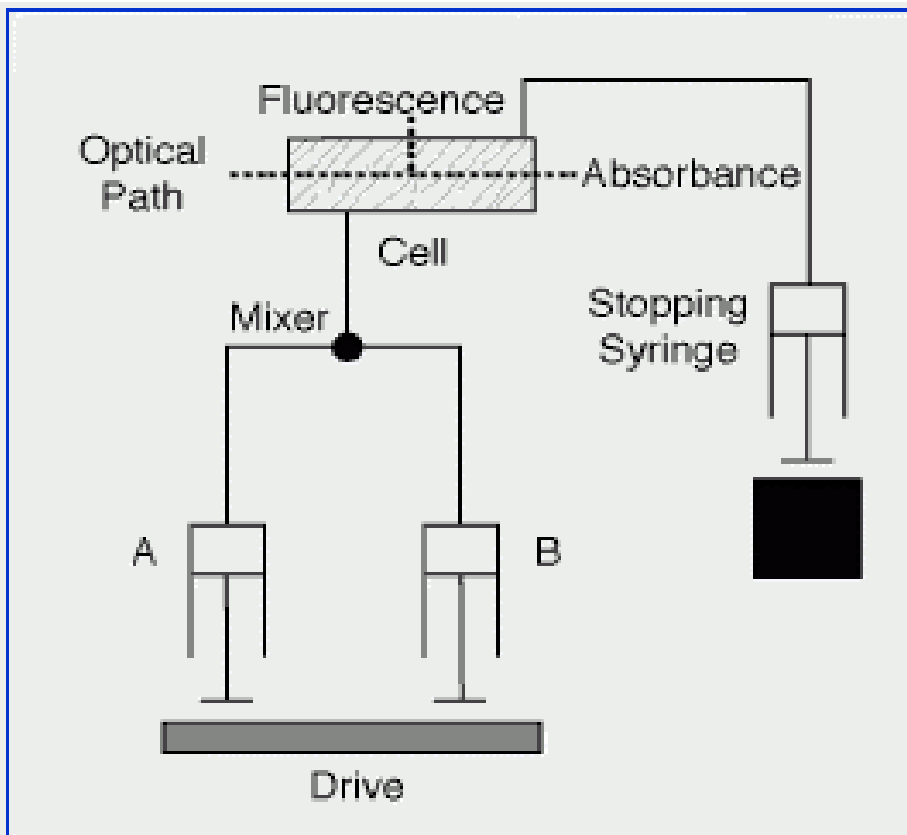
Cinética - Actividad enzimática



Ajuste de regresión lineal: Pendiente = velocidad (abs/min)

$$A = \epsilon l c \quad \rightarrow \quad \text{velocidad (} [S] / \text{min)}$$

Cinética - Reacciones rápidas

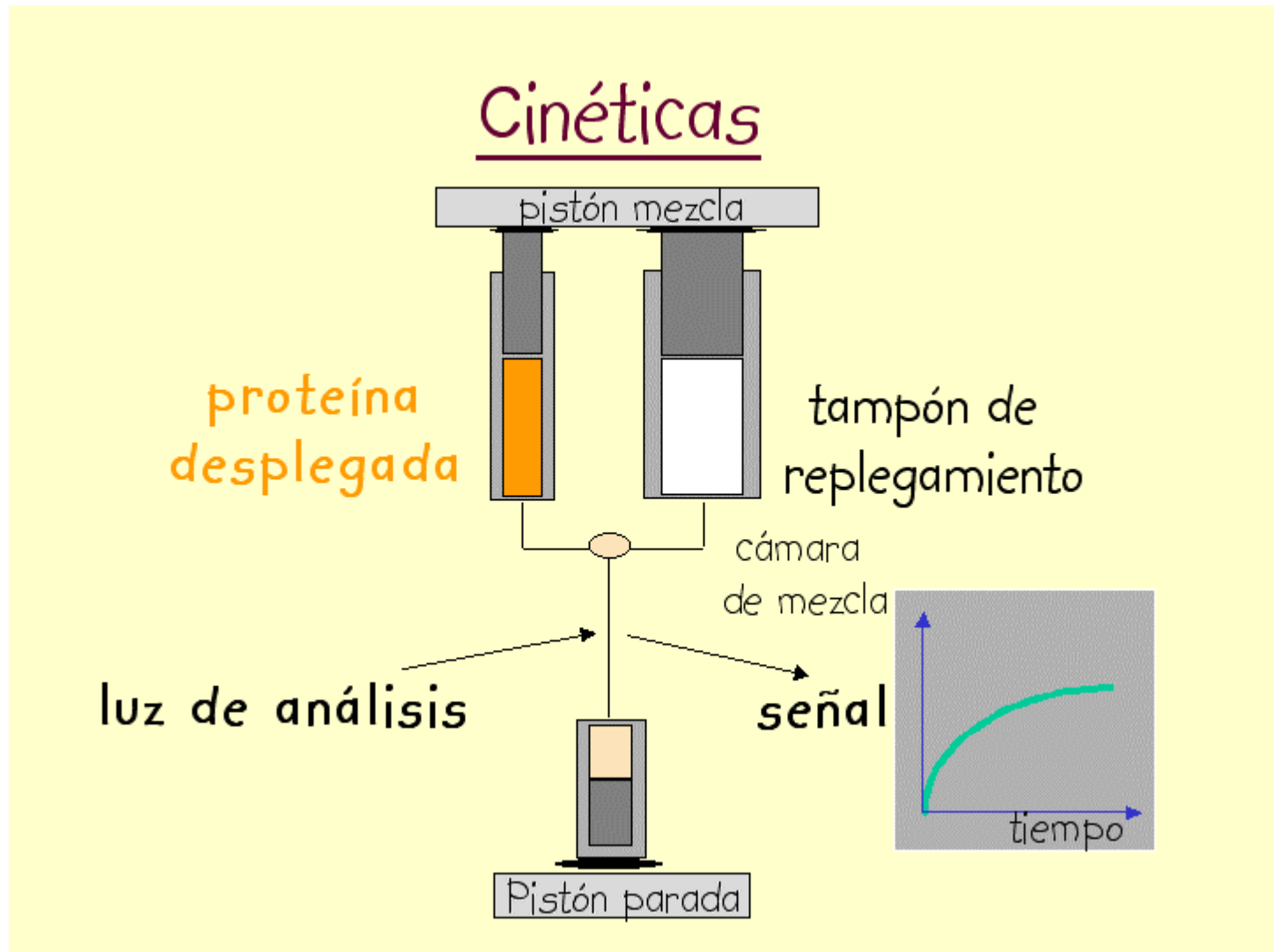


Single Mixing Stopped-Flow

El reactivo o el producto (no ambos) deben presentar una señal fácilmente medible.

Las proteínas tienen grupos aromáticos que absorben luz a 280nm y emiten fluorescencia.

Cinética - Plegado de Proteínas



Cinética - Plegado de Proteínas

