

CAPÍTULO 12

CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA

F. Luis González Flecha

Introducción

La unión reversible de un ligando a una proteína o ácido nucleico constituye, con la excepción de los procesos fotoquímicos, el modo universal de iniciación de los procesos biológicos que tienen lugar en los seres vivos (Gutfreund, 1995). El entendimiento de estos procesos de reconocimiento molecular es de fundamental importancia en la biología moderna. Su estudio consiste en determinar la estequiometría, la constante de equilibrio y la energética del proceso. La calorimetría de titulación isotérmica es la única técnica disponible capaz de evaluar a través de un solo experimento estos tres componentes sin ambigüedad.

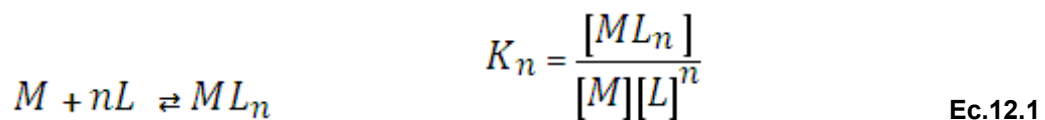
Casi cualquier reacción química o cambio físico producido en un sistema es acompañado por la liberación o absorción de calor. En este sentido los calorímetros pueden ser considerados como detectores universales y a la vez promiscuos, con las ventajas y desventajas que esto implica. A diferencia de los métodos ópticos, las medidas calorimétricas no requieren la incorporación de marcas específicas y se pueden realizar en sistemas opacos, turbios o heterogéneos (por ejemplo, células en suspensión), y bajo una amplia gama de condiciones biológicamente relevantes (temperatura, pH, fuerza iónica, etc.).

El primer calorímetro isotérmico fue construido por Lavoiser y Laplace en 1780 (memoria sobre el calor). Desde ese momento se ha desarrollado una amplia variedad de instrumentos, pero no fue hasta 1990 cuando aparecieron en el mercado calorímetros sencillos y con una sensibilidad muy alta, que permitieron estudiar reacciones bioquímicas de asociación. Este tipo de

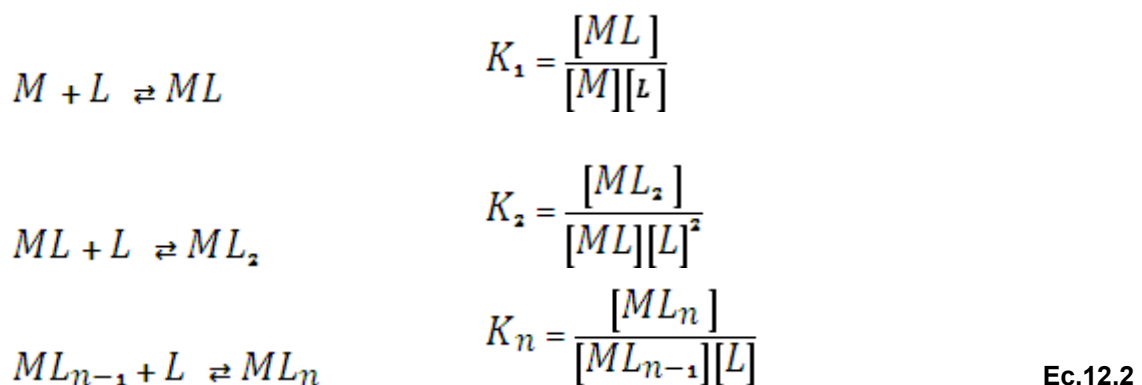
calorímetro, donde se añade un ligando paso a paso a una solución de macromoléculas a temperatura constante y bajo agitación continua, se conoce como calorimetría de titulación isotérmica o ITC por su sigla en inglés (*Isothermal Titration Calorimetry*).

12.1. Termodinámica de la Asociación entre Ligandos y Macromoléculas

Consideremos la interacción entre un ligando (L) y una macromolécula (M) que posee N sitios para el ligando. El proceso de adición de L a M puede considerarse consecuencia de un único equilibrio gobernado por una constante de asociación derivada de la ley de acción de masas:



Alternativamente el proceso de formación del complejo ML_n puede también considerarse consecuencia de "n" equilibrios sucesivos:



La formación secuencial de ML_i representada por las ecuaciones Ec. 12.2 es termodinámicamente equivalente a la reacción global de la ecuación Ec. 12.1 dado que para ambos procesos el estado inicial (M y L) y el final (ML_n) son los mismos. Esto se puede ver fácilmente al multiplicar las "n" constantes de asociación que aparecen en Ec. 12.2:

$$\prod_i K_i = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot K_4 \cdot \dots \cdot K_n$$

Ec. 12.3

Cada uno de los procesos descritos por las ecuaciones 12.1 y 12.2 puede ser alternativamente caracterizado empleando las funciones de estado derivadas del primer y segundo principio de la termodinámica, esto es indicando el cambio producido cuando se pasa del estado inicial (macromolécula y ligando libres en solución) al estado final (macromolécula en solución con i moléculas de ligando unido) en la energía interna (U), entalpía (H), entropía (S) y energía libre (G). A presión y temperatura constantes la descripción termodinámica completa se alcanza indicando las variaciones de entalpía ($H=U+pV$), entropía (S) y energía libre de Gibbs ($G=H-TS$).

De acuerdo al primer principio de la termodinámica la variación de entalpía se define como la cantidad de energía total intercambiada (tanto en forma de calor como de trabajo) entre el sistema y el medio ambiente durante el proceso considerado, más el cambio producido durante el mismo proceso en el producto de la presión por el volumen del sistema. En procesos que ocurren a presión y temperatura constantes y en ausencia de intercambios de trabajo distintos al de expansión ($W = -p\Delta V$) la variación de entalpía estará dada por:

$$\Delta H = \Delta U + \Delta(pV) = Q + W + p\Delta V = Q_p$$

Ec. 12.4

Esta relación implica que si el proceso en cuestión ocurre en estas condiciones, la variación de entalpía puede determinarse experimentalmente midiendo el calor intercambiado. Este es justamente el principio que permite lograr la caracterización termodinámica de un proceso a través de medidas calorimétricas.

Por otra parte la variación en la energía libre de Gibbs estará dada, a presión y temperatura constantes, por los potenciales químicos μ_i de los componentes presentes en los estados inicial y final del sistema. Por ejemplo para la reacción descrita por la ecuación 12.1 tendremos:

$$\Delta G = G_{final} - G_{inicial} = \mu_{ML_n} - \mu_M - n\mu_L$$

Ec. 12.5

A su vez, el potencial químico de un soluto en solución depende, también a presión y temperatura constantes, de la concentración de cada componente en el sistema.

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln [i] \quad \text{Ec. 12.6}$$

donde los μ_i° representan el potencial químicos del componente i en su estado de referencia (solución ideal a una concentración 1M).

Por lo tanto la variación de energía de Gibbs durante la asociación de n moléculas de un ligando a una macromolécula estará dada por:

$$\Delta G = (\mu_{ML_n}^\circ - \mu_M^\circ - n\mu_L^\circ) + RT \cdot (\ln[ML_n] - \ln[M] - n \ln[L]) = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[ML_n]}{[M] \cdot [L]^n} \quad \text{Ec. 12.7}$$

El proceso de asociación ocurrirá espontáneamente mientras el ΔG sea negativo. Una vez que el proceso llega al equilibrio la energía libre de Gibbs será igual para los reactivos y los productos, por lo tanto:

$$\Delta G = G_{final} - G_{inicial} = 0 = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[ML_n]_{eq}}{[M]_{eq} \cdot [L]_{eq}^n} \quad \therefore \Delta G^\circ = -RT \ln K_n \quad \text{Ec. 12.8}$$

Esta relación vale para cualquiera de los equilibrios planteados en las ecuaciones 12.1 y 12.2, e implica que si se determina experimentalmente la constante de equilibrio de una reacción, la diferencia de energía libre entre los productos y los reactivos, estando cada uno de ellos en su estado de referencia, quedará perfectamente definida.

Una vez que tenemos los cambios de entalpía (obtenidos calorimétricamente) y de energía libre en el estado de referencia (calculados a partir de la constante de equilibrio), se puede obtener el cambio de entropía asociado al proceso como:

$$\Delta S^\circ = \frac{1}{T} (\Delta G^\circ - \Delta H) \quad \text{Ec. 12.9}$$

Otra propiedad importante en la caracterización de reacciones de asociación es el grado de avance. Para la reacción de asociación reversible del ligando L a la macromolécula M que posee n sitios para dicho ligando, el grado de avance se suele caracterizar a través del número promedio de moles (o de moléculas) de L unidos a un mol (o molécula) de M (Tanford, 1961),

$$\bar{\nu} = \frac{[ML] + 2 \cdot [ML_2] + 3 \cdot [ML_3] + 4 \cdot [ML_4] + \dots + n \cdot [ML_n]}{[M] + [ML] + [ML_2] + [ML_3] + [ML_4] + \dots + [ML_n]} \quad \text{Ec. 12.10}$$

La expresión (12.10) puede tomar valores que van desde cero, cuando no hay L unido a M, hasta n cuando la saturación es total y todos los sitios están ocupados en todas las moléculas y la única forma de M que existe es ML_n .

Nótese que el numerador de la ecuación (12.10) es el número total de moles de L unidos a M por unidad de volumen, mientras que el denominador es el número total de moles de M por unidad de volumen, o sea la concentración total de M.

Usando la ecuación (12.1), la ecuación (12.10) se puede escribir como:

$$\bar{\nu} = \frac{\mathbf{K}_1 \cdot [M] \cdot [L] + 2 \cdot \mathbf{K}_2 \cdot [M] \cdot [L]^2 + 3 \cdot \mathbf{K}_3 \cdot [M] \cdot [L]^3 + \dots + n \cdot \mathbf{K}_n \cdot [M] \cdot [L]^n}{[M] + \mathbf{K}_1 \cdot [M] \cdot [L] + \mathbf{K}_2 \cdot [M] \cdot [L]^2 + \mathbf{K}_3 \cdot [M] \cdot [L]^3 + \dots + \mathbf{K}_n \cdot [M] \cdot [L]^n} \quad \text{Ec. 12.11}$$

Como [M] figura en todos los términos se la puede eliminar. Si además se reemplazan las constantes de asociación globales \mathbf{K}_i , por las secuenciales K_i de acuerdo a la ecuación 12.3

$$\bar{\nu} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \mathbf{K}_i \cdot [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \mathbf{K}_i \cdot [L]^i} = \frac{\sum_{i=1}^n i \cdot \prod_{j=1}^i K_j \cdot [L]^i}{1 + \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^i K_j \cdot [L]^i} \quad \text{Ec. 12.12}$$

La relación (12.12) es la ecuación fundamental en la teoría descriptiva del proceso de adición de ligandos a macromoléculas. Fue desarrollada en el año 1925 por G. S. Adair en Cambridge para explicar el proceso de saturación de la hemoglobina con el oxígeno.

A partir de ella es posible obtener relaciones más específicas que corresponderán a los distintos tipos de unión que se pueden presentar cuando una macromolécula posee dos sitios o más para un ligando (Tanford, 1961; Wyman, 1990; Cantor, 1980).

a. Sitios idénticos e independientes. En este caso todos los sitios estarán caracterizados por una única constante de asociación microscópica o intrínseca (k_0) que dará una idea de la afinidad del ligando por un sitio. Además la afinidad del ligando por un sitio es independiente de si los otros sitios están ocupados o no. En este caso la ecuación 12.12 toma la forma:

$$\bar{v} = \frac{n \cdot k_0 \cdot [L]}{1 + k_0 \cdot [L]} \quad \text{Ec. 12.13}$$

b. Sitios distintos e independientes. En este caso la macromolécula tendría sitios que podemos agrupar en conjuntos caracterizados cada uno de ellos por una constante de asociación microscópica o intrínseca (k_{oi}). También en este caso la afinidad del ligando por un sitio es independiente de si los otros sitios están ocupados o no. La ecuación 12.12 se podrá escribir como:

$$\bar{v} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot k_{oi} \cdot [L]}{1 + k_{oi} \cdot [L]} \quad \text{Ec. 12.14}$$

c. Sitios idénticos con interacciones. Este caso es similar al primero, pero ahora la ocupación de un sitio modificará la afinidad del ligando por los sitios que permanecen vacíos. Si lo hace aumentando la afinidad se hablará de cooperatividad positiva, mientras que si la afinidad de los sitios que permanecen vacíos disminuye diremos que hay cooperatividad negativa o antagonismo. El modelo semi-empírico más empleado para describir la ocupación de sitios en estos sistemas es la ecuación propuesta por A.V. Hill en 1925:

$$\bar{v} = \frac{n \cdot k_0 \cdot [L]^{n_H}}{1 + k_0 \cdot [L]^{n_H}} \quad \text{Ec. 12.15}$$

donde el exponente n_H es el denominado coeficiente de Hill que tomará valores mayores que 1 para la cooperatividad positiva y entre 0 y 1 para cooperatividad negativa.

Todos estos modelos están formulados en términos de $[L]$, la concentración de ligando libre. Dado que las variables experimentales sujetas a control son la concentraciones totales de ligando y macromolécula ($[L]_T$ y $[M]_T$), debemos considerar además las ecuación de conservación correspondiente:

$$[L]_T = [L] + [M]_T \cdot \bar{\nu}$$

Ec. 12.16

12.2. Aspectos Experimentales

Instrumentación

El principal desarrollo tecnológico que llevó a la construcción de los calorímetros de titulación modernos, que posibilitan medir efectos térmicos tan pequeños como $0,4 \mu\text{J}$ permitiendo la determinación de constantes de unión de 10^8 - 10^9 M^{-1} , es el empleo de dos celdas “gemelas” introducido por Stanley Gill en 1980. Los efectos térmicos que se producen en cada una de las celdas se detectan a través de un par de sensores formados por elementos Peltier que generan una fuerza electromotriz proporcional a la diferencia de temperaturas. Por otra parte la evaluación del calor intercambiado se realiza mediante un procedimiento de compensación de potencia con elementos Peltier adicionales (Freire, 1990).

Una de las celdas del calorímetro contendrá la muestra a titular mientras que la otra se llenará con buffer o agua. El ligando se adicionará a la celda que contiene la muestra mediante una jeringa que también sirve como agitador. Ambas celdas se equilibran cuidadosamente a la temperatura de trabajo antes de comenzar el experimento. En esta etapa se aplica una potencia eléctrica constante a la celda de referencia y, mediante un sistema de retroalimentación, se compensa cualquier diferencia de temperatura entre las dos celdas. El

sistema de retroalimentación continua, a una potencia de referencia constante, asegura una respuesta rápida del equipo frente a cualquier cambio térmico producido en la celda que contiene la muestra. A su vez ambas celdas están rodeadas de una cámara térmica o escudo "adiabático" ajustado a la misma temperatura.

La adición del ligando se hace en pequeñas alícuotas, de manera lenta, y con intervalos prefijados entre una inyección y la siguiente. Para esto se utiliza un sistema automatizado que consiste en una jeringa de alta precisión que se acopla a la celda de la muestra. La aguja de la jeringa gira alrededor de su eje (típicamente a unas 400 rpm), y ya que su extremo se encuentra aplanado y torcido formando una hélice, se produce una agitación uniforme en la celda. La agitación genera un trabajo de fricción en la solución, que tiende a elevar su temperatura. Si bien este trabajo será compensado mediante energía eléctrica suministrada a la celda de referencia, el mismo debe ser pequeño para permitir mediciones precisas. La liberación o absorción de calor asociado con cada inyección se compensa mediante una potencia suministrada a la celda de la muestra o de referencia para mantener constante la temperatura. La potencia aplicada es directamente proporcional al flujo de calor, dQ / dt , asociado con la inyección y sirve como señal de salida. Los datos aparecerán entonces como una potencia constante antes de la inyección (que representa la potencia suministrada para mantener el sistema en equilibrio térmico con agitación uniforme), un cambio en la potencia al producirse la inyección del ligando y un regreso a la línea de base cuando todo el calor producido en la inyección se disipa hacia el blindaje adiabático. Esto se repite una y otra vez, hasta que se satura la macromolécula con el ligando. En estas condiciones la inyección de nuevas alícuotas de ligando producirán un cambio térmico residual que corresponderá al calor de dilución, el que deberá ser mucho menor que el calor de asociación para garantizar la calidad del experimento.

La Figura 12.1 muestra la salida de un típico experimento de titulación que alcanza la saturación.

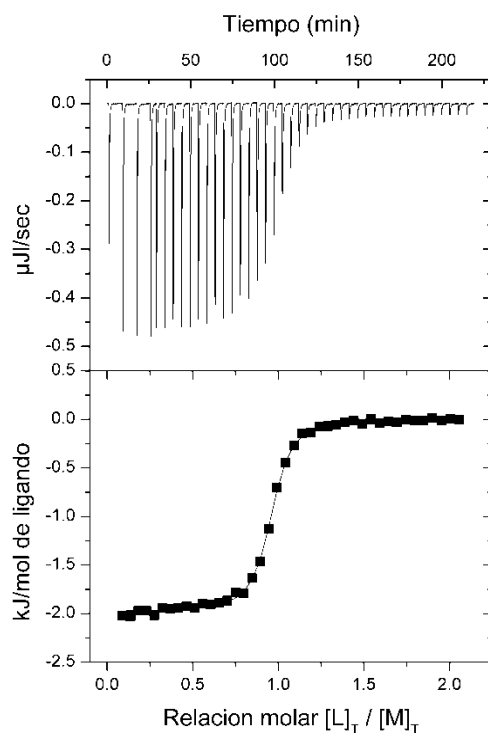


Figura 12.1. Curva de titulación calorimétrica. El panel superior muestra la señal de una titulación calorimétrica típica. La panel inferior muestra la representación gráfica del calor intercambiado en cada inyección por mol de ligando inyectado en función de la relación molar ligando / macromolécula en la celda. La línea continua representa el ajuste de las ecuaciones 12.18 12.13 y 12.16 a los datos del experimento.

Diseño experimental

Como se observa en la Figura 12.1 la curva de titulación calorimétrica posee tres partes (Freire, 2011): (i) En la primera, correspondiente a las inyecciones iniciales, casi todo el ligando inyectado se une a la macromolécula produciendo picos de aproximadamente igual área, (ii) alrededor del punto de equivalencia la fracción del ligando inyectado que se une a la macromolécula es cada vez menor y como consecuencia el área barrida por los picos se hace menor a medida que se agrega mas ligando y (iii) en las inyecciones finales la macromolécula se encuentra saturada de ligando observándose pequeños picos de área constante que representan el calor de dilución del ligando en el buffer. La última parte será entonces equivalente a un experimento donde se

inyecte ligando sobre el buffer. Este experimento control debe realizarse siempre y se debe optimizar la preparación de la muestra para que el calor intercambiado en este experimento sea sustancialmente menor que el correspondiente a la titulación de la macromolécula con el ligando. Por ejemplo si la macromolécula requiere aditivos especiales que aseguren su solubilidad o estabilidad, estos componentes deben también estar presentes y en la misma concentración en la solución del ligando. De hecho la solución de la macromolécula y la de ligando deben prepararse con exactamente el mismo buffer, empleando para ello procedimientos de diálisis o columnas de exclusión. Las muestras deberán además filtrarse si se sospecha la formación de agregados y las concentraciones deberán ser medidas en las soluciones finales que se colocarán en el calorímetro. También es muy importante controlar el pH de las soluciones y si existe una diferencia de más de 0,05 unidades entre ambas deberá realizarse el ajuste correspondiente para quedar dentro de este límite. Por otra parte deberán evitarse componentes en las soluciones que, por sus respuestas térmicas frente a los procesos que ocurran durante el experimento calorimétrico, puedan llegar a distorsionar las curvas calorimétricas. Por ejemplo, si la muestra requiere la presencia de reductores se evitará el uso de ditiotreitól que sufre una lenta oxidación aun en bajas concentraciones (0,5 mM) produciendo una distorsión en la línea de base, y se lo reemplazará por ejemplo por β -mercaptoetanol.

La concentración de la macromolécula en la celda es también un factor importante al momento de diseñar un experimento de ITC. Para entenderlo necesitamos analizar previamente de qué factores depende la cantidad de calor intercambiado durante cada inyección de ligando. Si suponemos que no existen otros procesos que generen o absorban calor tendremos que para una inyección,

$$Q_i = \Delta H_L \cdot \Delta(\text{moles de ligando unido}) \quad \text{Ec. 12.17}$$

donde ΔH_L es la variación de entalpía expresada por mol de ligando unido. Considerando la ecuación 12.10 y que la celda que contiene la muestra posee un volumen V, tendremos:

$$Q_i = \Delta H_L \cdot V \cdot (\bar{v}_i - \bar{v}_{i-1}) [M]_T \quad \text{Ec. 12.18}$$

Y el calor acumulado después de N inyecciones:

$$Q = \sum Q_i = \Delta H_L \cdot V \cdot [M]_T \cdot \bar{v} \quad \text{Ec. 12.19}$$

en estas ecuaciones \bar{v} se reemplazará por las expresiones 12.13 a 12.15 de acuerdo al modelo de interacción que se esté considerando.

La Figura 12.2 muestra los resultados simulados de 3 experimentos calorimétricos realizados a diferentes concentraciones de una macromolécula para la interacción con un ligando, para el que posee un único sitio, con una constante de asociación $K = 10^6 \text{ M}^{-1}$ y un $\Delta H = -3 \text{ kJ/mol}$.

Como podemos observar la curva de titulación se ve profundamente afectada por la concentración de macromolécula. El panel central (B) muestra una curva de titulación típica en la cual se diferencian claramente las 3 regiones definidas al inicio de esta sección. A partir de un experimento de este tipo es posible determinar la estequiometría, la variación de entalpía y la constante de asociación ajustando las ecuaciones 12.18, 12.15 y 12.16 al conjunto de datos experimentales mediante procedimientos de regresión no lineal. A bajas concentraciones (panel A), las tres partes de la curva se desdibujan ya que sólo una muy pequeña fracción del ligando inyectado se une a la macromolécula aun en las primeras inyecciones, y no es posible llegar a la zona de saturación. A partir de un experimento de este tipo sólo se podría estimar la entalpía y la constante de asociación si se conoce la estequiometría a través de experimentos independientes. La situación vuelve a cambiar para el caso del experimento realizado a una elevada concentración de proteína (panel C). En este último caso todo el ligando que se inyecta se une a la macromolécula hasta el punto en que se alcanza la saturación y a partir de ese momento todo el ligando inyectado permanecerá como ligando libre. Dado que muy pocas inyecciones dejarán al sistema en la zona intermedia de transición, no podrá evaluarse en este caso la constante de asociación que gobierna al equilibrio. Eso sí, se obtendrá una muy buena determinación de la estequiometría y del ΔH .

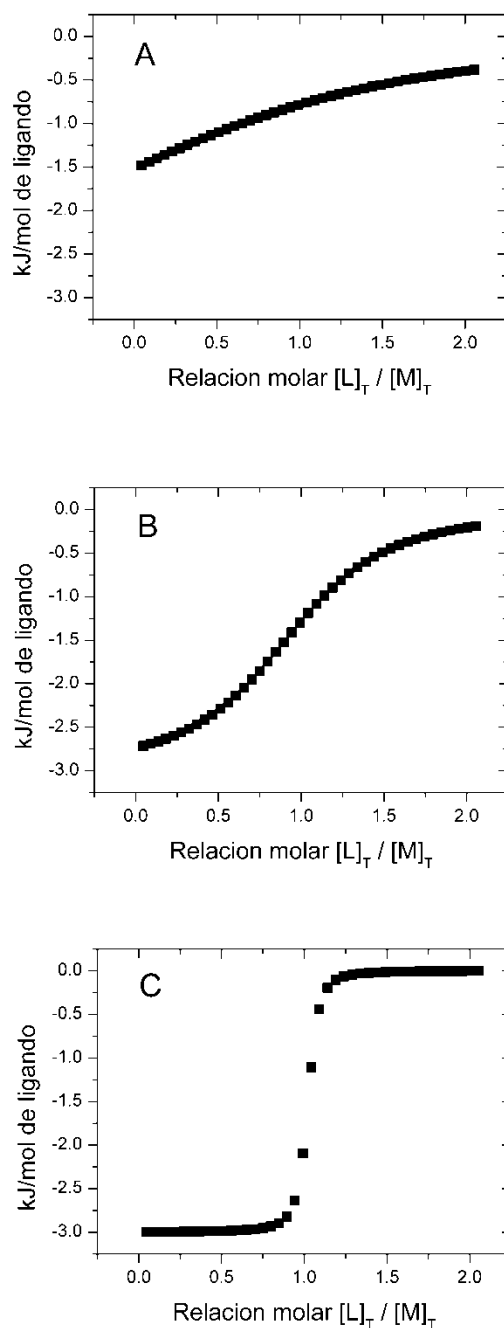


Figura 12.2. Simulación de un experimento de ITC para la titulación de una macromolécula ($[M]_T = 1 \mu\text{M}$ (A), $10 \mu\text{M}$ (B) y 1 mM (C)) con un ligando que se une a un único sitio. Los valores de c correspondientes son 1, 10 y 1000, respectivamente. Los valores de K y ΔH se mantuvieron constantes en 10^6 M^{-1} y un -3 kJ/mol , respectivamente.

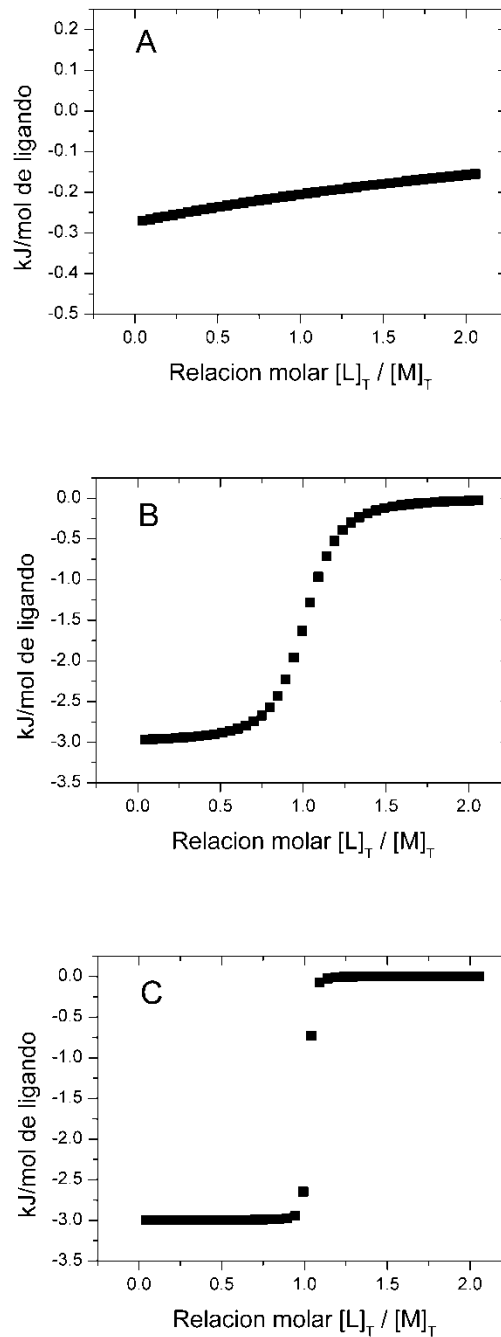


Figura 12.3. Simulación de un experimento de ITC para la titulación de una macromolécula con tres ligandos que se une a un único sitio con constantes de asociación $10^4 M^{-1}$ (A), $10^7 M^{-1}$ (B) y $10^9 M^{-1}$ (C).. Los valores de $[M]_T$ y ΔH se mantuvieron constantes en $10 \mu M$ y -3 kJ/mol , respectivamente.

Un comportamiento similar se observa si simulamos una serie de titulaciones calorimétricas realizadas a igual concentración de macromolécula pero titulando con ligandos que presentan distinta afinidad (Figura 12.3). Puede

observarse que a medida que disminuye la afinidad (panel A) se pierde la forma de la curva de manera equivalente a lo que ocurría a bajas concentraciones. Por el contrario los ligandos que presentan mayor afinidad (panel C) dan curvas sin información experimental en la zona de transición similares a las que teníamos para altas concentraciones de macromolécula. Resulta entonces claro que la concentración de macromolécula es la variable que nos permitirá llevar la curva de titulación a la forma óptima para realizar los experimentos calorimétricos. En este sentido resulta útil definir una cantidad “c” como:

$$c = n \cdot k \cdot [M]_T$$

Ec. 12.20

El valor de c sirve como una guía para el diseño del experimento. Como se puede observar en la figura las curvas de titulación calorimétrica mejor definidas corresponden a valores de c comprendidos entre 10 y 100.

Sin embargo una buena selección del valor de c no asegura que las concentraciones que dan la mejor curva también vayan a generar suficiente calor como para que se pueda medir con precisión por el calorímetro, y no sean tan altas como para salir del rango de detección. También puede ocurrir que la macromolécula no sea soluble a las concentraciones necesarias para realizar el experimento óptimo. En estos casos se deberá encontrar empíricamente la solución de compromiso que permita realizar el mejor experimento posible.

12.3. Características Termodinámicas de la Interacción entre Ligandos y Macromoléculas.

Marcas termodinámicas

Como ya mencionamos un experimento de ITC bien diseñado permitirá conocer la estequiometría, la o las constantes termodinámicas que gobiernan

los equilibrios y también las contribuciones energéticas que determinan la fuerza impulsora de la interacción.

Las constantes termodinámicas dan cuenta de la energía libre de Gibbs de interacción caracterizando lo que se conoce como afinidad del ligando por la macromolécula en cuestión. Sin embargo su valor por sí solo no da cuenta de la naturaleza de las interacciones, de hecho dos ligandos que interaccionan de manera completamente distinta con la macromolécula pueden presentar la misma afinidad. Los experimentos de ITC permiten la disección de la afinidad en sus contribuciones entálpicas y entrópicas. La entalpía y la entropía de unión reflejan diferentes interacciones interatómicas que subyacen a la reacción de unión, y por lo tanto proporcionan información adicional a la contenida en el cambio global en Energía de Gibbs de la unión. Este conjunto de información, (ΔG , ΔH y $T\Delta S$) constituye lo que se denomina marca termodinámica básica que caracteriza al proceso de interacción (Freire, 2011; Ladbury, 2004).

La calorimetría de titulación es la única técnica experimental que permite determinar en forma directa el cambio de entalpía asociado a la interacción. Para poder determinar el ΔH mediante una técnica espectroscópica, es necesario calcular la constante de equilibrio a distintas temperaturas y aplicar entonces el formalismo de Van't Hoff (Tanford, 1961; Weber, 1990) para la dependencia de los cambios en la energía libre de Gibbs con la temperatura. Sin embargo este procedimiento frecuentemente no permite estimar el ΔH con una exactitud razonable dado que la dependencia con la temperatura de muchas reacciones de interés bioquímico es pequeña y los intervalos de temperatura que se pueden explorar también son pequeños.

Las interacciones no-covalentes entre moléculas biológicas incluyen enlaces de hidrógeno, de van der Waals, interacciones polares y electrostáticas etc. La formación de enlaces se asocia con una disminución en la entalpía, lo que resulta favorable para la unión. Por otra parte las moléculas que están libres en solución pueden establecer enlaces con las moléculas de agua, y es posible que estos enlaces se tengan que romper para permitir la interacción ligando macromolécula, con lo cual aumentará la entalpía lo que es desfavorable para

la unión. En consecuencia el cambio entálpico será favorable para el proceso de unión si hay una formación neta de enlaces de hidrógeno u otras fuerzas atractivas.

De manera contraria un aumento en la entropía contribuirá favorablemente a la reacción de unión. La entropía en un sistema de moléculas interaccionando está constituida por diferentes componentes (Freire, 2011). Por un lado, la reducción en el número de conformaciones del ligando (si es que tiene más de una) y de la macromolécula como consecuencia de la unión producirá una disminución en la denominada entropía conformacional y contribuirá desfavorablemente al ΔG° de interacción. Por otra parte los cambios en la interacción del ligando y la macromolécula con el agua que se produzcan durante el proceso de unión determinará lo que se denomina entropía de solvatación. Las moléculas de agua que interactúan con el ligando o la macromolécula poseen una movilidad restringida respecto del agua solvente, de modo que si durante la unión del ligando a la macromolécula se liberan moléculas de agua de solvatación se producirá un aumento de entropía que favorecerá la unión. Los ligandos no-polares restringen en gran medida la movilidad de las moléculas de agua de solvatación generando regiones de agua altamente estructurada.

La Figura 12.4 muestra la marca termodinámica correspondiente a la unión de tres ligandos que tienen afinidades similares, pero modos de interacción completamente diferentes.

El caso A es típico de una reacción en la que la formación neta de enlaces entre el ligando y la macromolécula se refleja en una gran disminución en la entalpía, que supera a una disminución de entropía (el cambio en la entropía conformacional supera al de solvatación). Se dice que en este caso la unión está impulsada entálpicamente. El caso B corresponde a una reacción en la que la principal contribución a la energía libre de unión proviene del aumento de la entropía de solvatación asociada a la liberación de moléculas de agua estructurada (efecto hidrofóbico). El término entalpía es desfavorable y se debería a la supresión de las interacciones entre las moléculas de agua. En este caso se habla de reacción impulsada entrópicamente. Finalmente el caso

C corresponde a una reacción donde tanto el componente entálpico como el entrópico favorecen la unión y contribuyen al ΔG° aproximadamente en la misma magnitud.

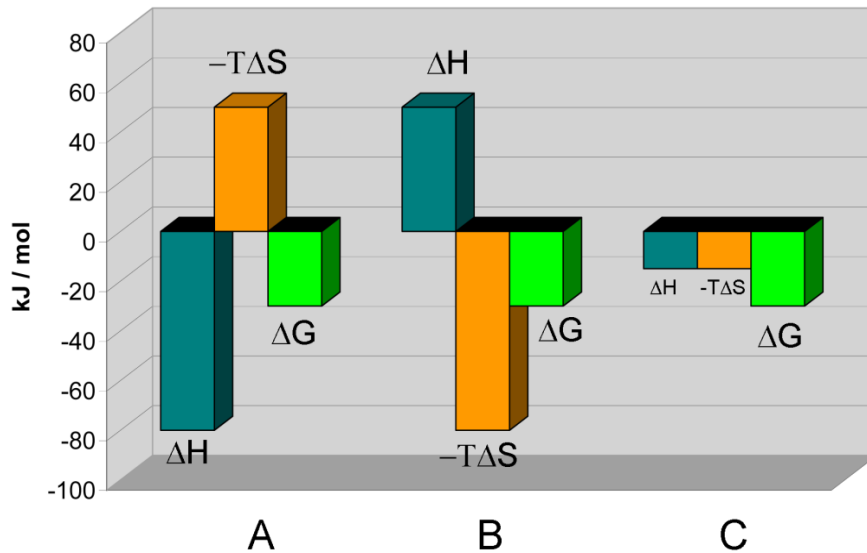


Figura 12.4 Marcas termodinámicas en la interacción entre ligandos y macromoléculas. A. La unión del ligando es impulsada entálpicamente compensando la disminución de entropía conformacional. B: La unión es endotérmica y en consecuencia es impulsada entrópicamente. C: El ligando se asocia con un cambio de entalpía favorable y cambios de entropía también favorables y que contribuyen casi por igual al cambio de la energía libre de Gibbs.

Cambios en la capacidad calorífica

Si se realizan titulaciones calorimétricas de un mismo proceso a diferentes temperaturas es posible obtener una caracterización termodinámica completa del proceso de unión de un ligando a una macromolécula. Como mencionamos en la sección anterior el efecto de la temperatura sobre el ΔG es generalmente pequeño, mientras que tanto la entalpía como la entropía muestran cambios mucho más marcados. Es por esta razón que nuevamente los calorímetros de titulación presentan ventajas sustanciales en relación con los métodos

espectroscópicos a los efectos de evaluar procesos de interacción intermoleculares.

La capacidad calorífica de un sistema se define como la cantidad de calor que necesita absorber un sistema para aumentar su temperatura en 1 °C. Si la determinación se realiza a presión constante, la cantidad de calor intercambiada será igual a la variación de entalpía (ΔH) de este proceso, y si los estados inicial y final del sistema tienen una respuesta térmica distinta ante el intercambio de calor, podremos definir un cambio en la capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) de manera tal que:

$$\Delta H_T = \Delta H_{T_{ref}} + \Delta C_p \cdot (T - T_{ref}) \quad \text{Ec. 12.21}$$

La diferencia entre la capacidad calorífica del ligando unido a una macromolécula y la correspondiente a ambas especies libres en solución, está determinada por el cambio en el área expuesta al solvente durante el proceso de unión (Freire, 2011). Las moléculas de agua altamente ordenada que rodean a una molécula hidrofóbica en solución tienen una elevada capacidad calorífica. En consecuencia, si estas moléculas se liberan al producirse la unión ocurrirá una disminución drástica en la capacidad calorífica del sistema. De hecho, un ΔC_p muy negativo es una de las características distintivas de una unión hidrofóbica y en principio se puede utilizar para distinguir este tipo de unión de otros que son también impulsados entrópicamente.

La Figura 12.5 muestra la variación de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ función de la temperatura para dos reacciones de asociación con la misma marca termodinámica a temperatura ambiente y diferentes valores de ΔC_p . Se puede observar en ambos casos que los cambios en ΔC_p afectan marcadamente la dependencia con la temperatura de ΔH y $T\Delta S$, mientras que los cambios en ΔG son considerablemente menores. En el caso mostrado en el panel B podemos observar que la reacción va cambiando su marca termodinámica medida que cambia la temperatura. A bajas temperaturas la reacción es impulsada entrópicamente, pero alrededor de los 60 °C ambos componentes (el entálpico y el entrópico) contribuirán favorablemente al ΔG de unión. Finalmente, a temperaturas elevadas, la reacción pasa a ser impulsada entálpicamente.

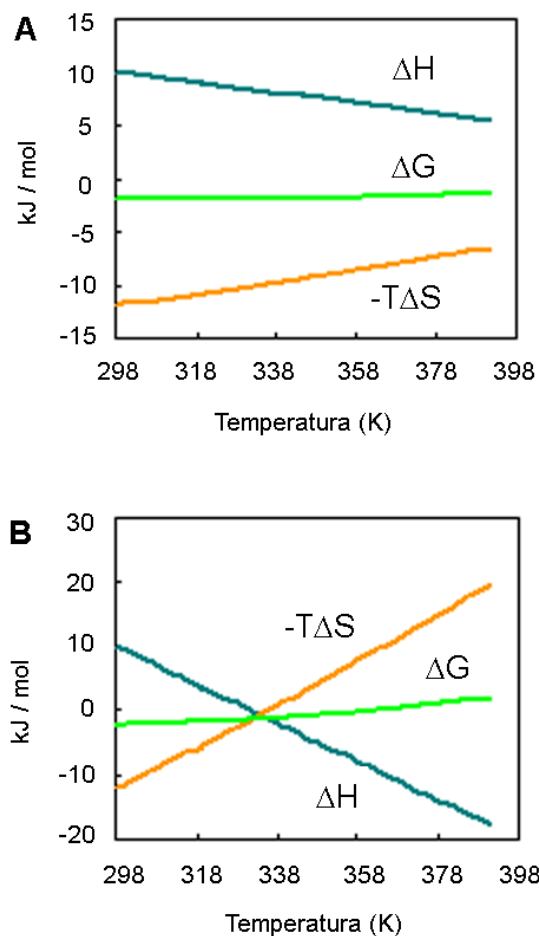


Figura 12.5. Dependencia con la temperatura de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ para dos reacciones de asociación con la misma marca termodinámica a temperatura ambiente y diferentes valores de ΔC_p . Los valores de ΔG , ΔH y $T\Delta S$ son -2, 10 y -12 kJ/mol respectivamente, mientras que los valores de ΔC_p son -50 J/K mol (A) y -300 J/K mol (B).

Conclusión

La calorimetría de titulación isotérmica o ITC constituye una tecnología sencilla y no destructiva que permite la determinación simultánea de la estequiometría, la afinidad y las contribuciones energéticas (cambios en la entalpía y la entropía) correspondientes a la interacción de un ligando con una macromolécula. Las diferencias en las contribuciones entrópicas y entálpicas

determinan diferentes modos de unión, lo que hace posible distinguir y caracterizar ligandos que se unen con afinidades similares. Si la macromolécula en estudio posee más de un sitio para el ligando, la titulación calorimétrica permite determinar si la unión del primer ligando facilita la unión de ligandos posteriores. A través de experimentos de ITC realizados bajo diferentes condiciones es posible disponer de una descripción general de cómo un ligando interacciona con el sitio de unión. Todo esto hace de la calorimetría de titulación isotérmica una técnica de gran alcance, y que en la actualidad tiene un papel central en los campos de la biología estructural, la bioquímica y en el desarrollo de nuevos medicamentos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2010-1876) y de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020100100048)

Bibliografía

Cantor CR, Schimmel PR. Biophysical Chemistry, Freeman, New York, 1980.

Freire E, Mayorga O, Straume M. Isothermal Titration Calorimetry, *Anal Chem* 62 950-959, 1990.

Freire E, Kawasaki Y, Velazquez Campoy A, Schon A. Characterisation of Ligand Binding by Calorimetry, *RSC Biomolecular Sciences*, 275-299, 2011.

Gutfreund H. Kinetics for Life Sciences. Receptors, transmitters and catalysts. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.

Ladbury JE, Doyle ML. Biocalorimetry 2, Wiley, New York, 2004.

Tanford C. Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley, New York, 1961.

Weber G. Protein Interactions, Chapman, New York, 1992.

Wyman J, Gill SJ Binding and Linkage. Functional Chemistry of Biological Macromolecules.
University Science Books, Mill Valley, CA, 1990.