

# Laboratorio Chimica Bioorganica

---

## Studio di meccanismi di reazione in Chimica Bioorganica

ppengo@units.it

St. 344

# Laboratorio Chimica Bioorganica

---

## *Idrolisi dell'aspirina*

(Tutti)

## *Studio della reazione di deacilazione di un intermedio acil-chimotripsina*

(Tutti)

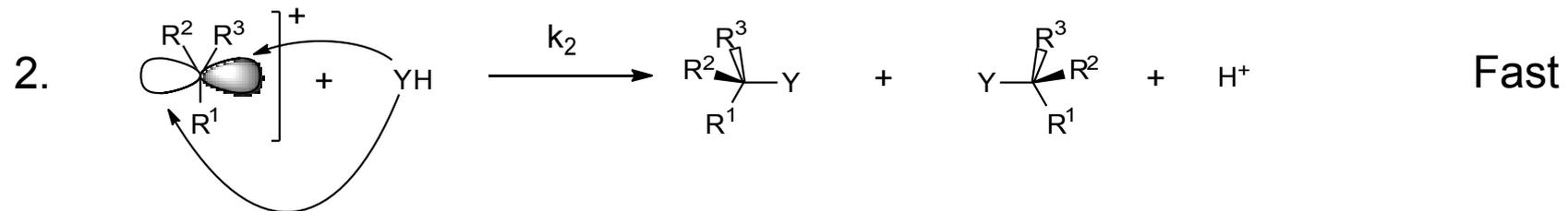
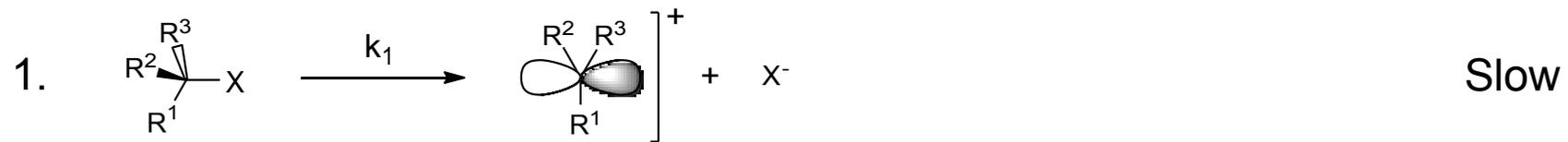
## *Determinazione della stechiometria e della costante di formazione del complesso proflavina-alfa chimotripsina*

(Tutti)

# Cos'è un meccanismo di reazione?

---

- Un meccanismo di reazione è una sequenza consecutiva di reazioni elementari



# Come studiare un meccanismo?

---

Monitorare la composizione della miscela di reazione (reagenti e prodotti) nel tempo facendo uso di metodi spettroscopici, cromatografici, potenziometrici etc

- Proporre una legge cinetica
- Proporre un meccanismo che giustifichi la legge cinetica
- Analizzare l'effetto del solvente (p.es. polarità) o la sostituzione isotopica per confermare il meccanismo proposto
- “Isolare”, intrappolare o monitorare la presenza di intermedi se ipotizzati nel meccanismo
- ...e molto altro...

# Come studiare un meccanismo?

---

*Monitorare nel tempo la formazione del prodotto o la scomparsa dei reagenti*

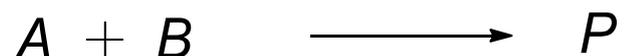
- Proporre una legge cinetica

Metodi Differenziali  
(convenienti)

Metodi Integrali  
(poco convenienti)

Velocità di formazione del prodotto

Velocità di scomparsa dei reagenti



$$velocità = \frac{d[P(t)]}{dt} = k_{obs} [A(t)]^\alpha [B(t)]^\beta$$

Il problema si riduce nella determinazione degli ordini di reazione  $\alpha$ ,  $\beta$

# Come studiare un meccanismo?

---

*Metodo delle velocità iniziali*



Nei primi istanti della reazione (fino a circa il 10%)

$$[A(t)] \simeq [A(0)]; \quad [B(t)] \simeq [B(0)]$$

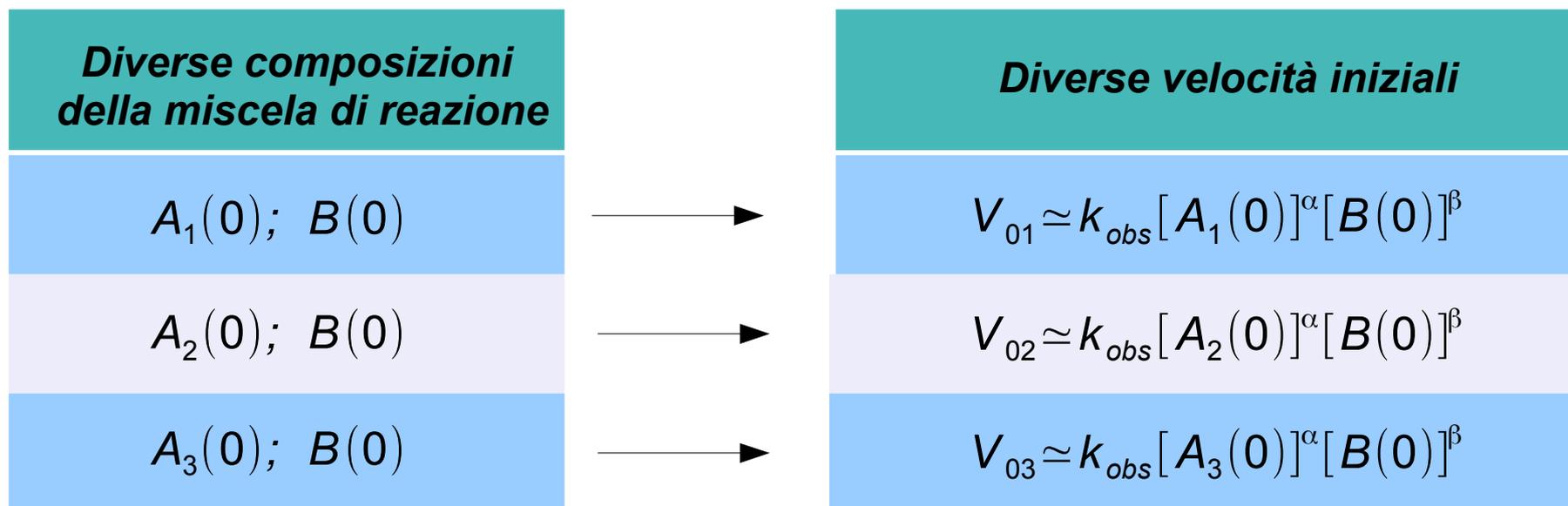
$$V_0 = \left( \frac{d[P(t)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = k_{obs} [A(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$$

# Come studiare un meccanismo?

---

*Come determinare gli ordini di reazione?*

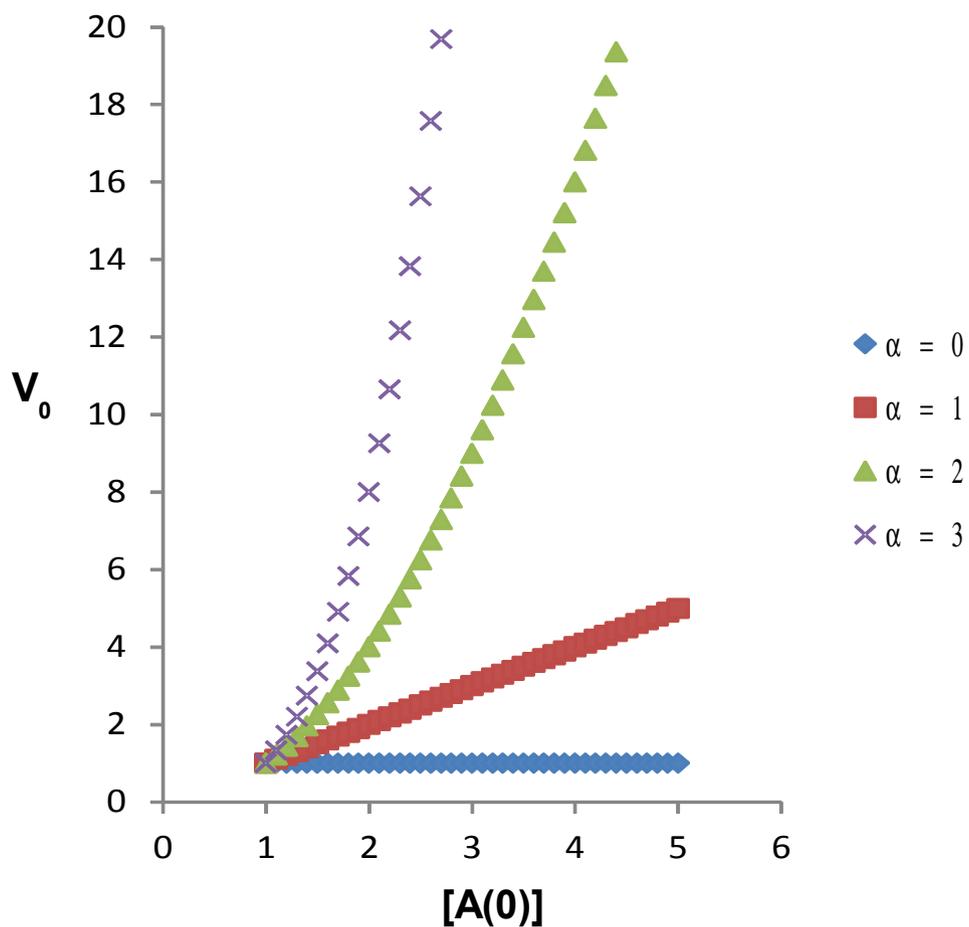
$$V_0 = \left( \frac{d[P(t)]}{dt} \right)_{\rightarrow 0} \simeq k_{obs} [A(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$$



# Come studiare un meccanismo?

<b>Composizioni</b>	<b><math>V_0</math></b>
$A_1(0); B(0) \rightarrow$	$V_{01}$
$A_2(0); B(0) \rightarrow$	$V_{02}$
$A_3(0); B(0) \rightarrow$	$V_{03}$

$$V_0 = \left( \frac{d[P(t)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \simeq k_{obs} [A(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$$



La natura del grafico dà informazione sull'ordine  $\alpha$

# Come studiare un meccanismo?

---

Stessa procedura per B e se  $\alpha = 1$  e  $\beta = 0$

Otterremmo semplicemente che  $\frac{d[P(t)]}{dt} = k_{obs}[A(t)]$

Cioè la reazione è del primo ordine in A

Un esempio tipico...



# Come studiare un meccanismo?

*Metodi Integrali*  *Richiedono di conoscere la legge cinetica (!)*

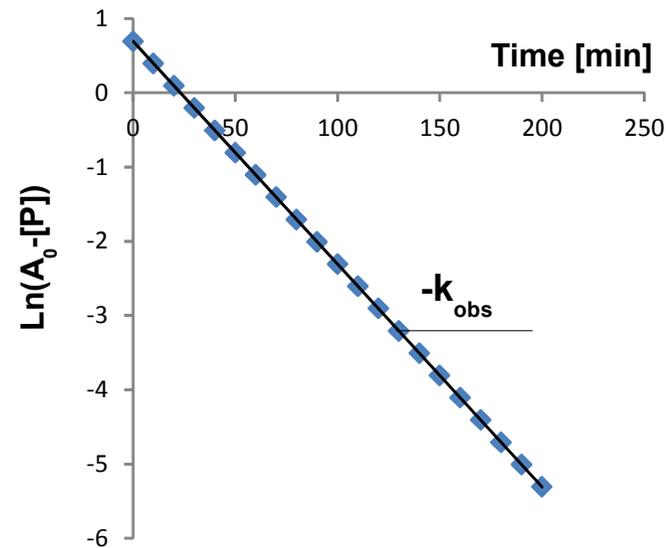
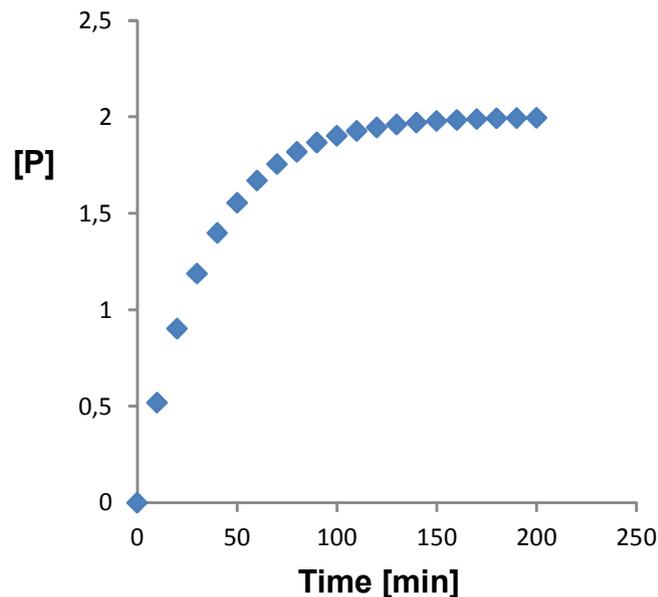
*Differenziale*

*Integrale*

$$\frac{d[P(t)]}{dt} = k_{obs}[A(t)]$$

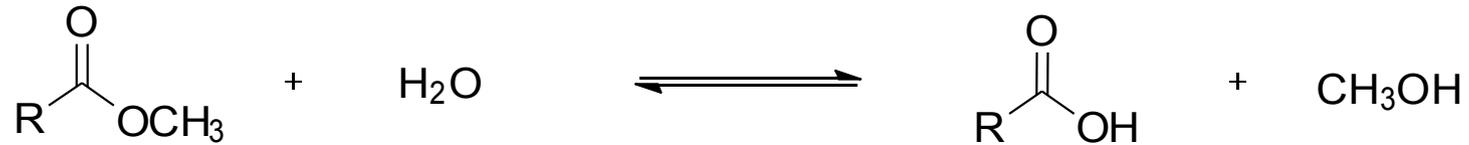


$$P(t) = A_0[1 - e^{(-k_{obs}t)}]$$



# Idrolisi degli esteri

---



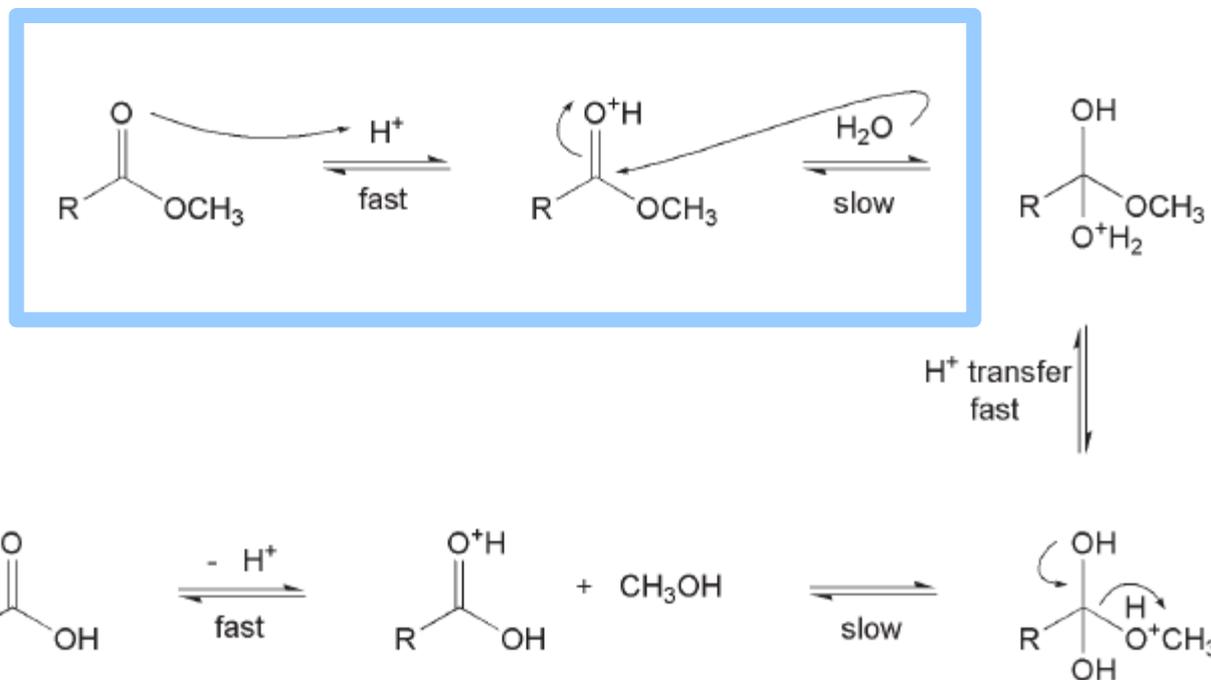
A pH costante (tamponato) la velocità di scomparsa dell'estere è descritta da una cinetica dello *pseudo primo ordine*

$$\text{velocità} = \frac{-d[\text{Estere}]}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{Estere}]$$

Tre processi principali concorrono all'idrolisi degli esteri:

- l'idrolisi spontanea
- l'idrolisi acido-catalizzata (**specifica** e/o **acido generale**)
- l'idrolisi base-catalizzata (**specifica** e/o **base generale**)

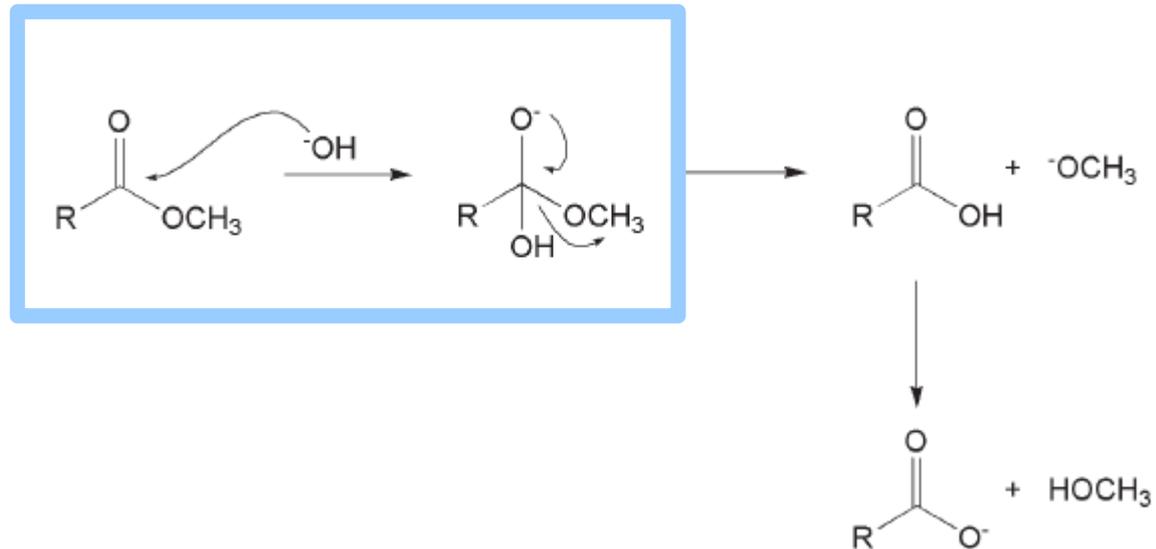
# Idrolisi degli esteri - catalisi acida specifica



$$velocità = \frac{-d[Estere]}{dt} = k_H[H^+][Estere]$$

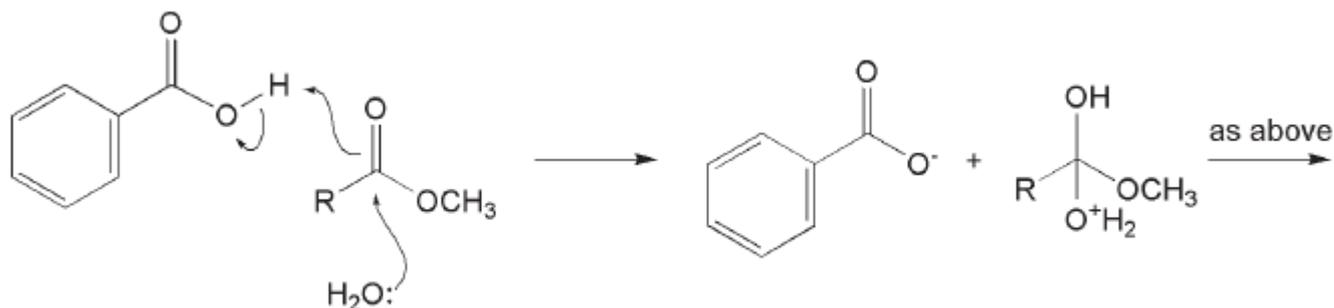
# Idrolisi degli esteri - catalisi basica specifica

---



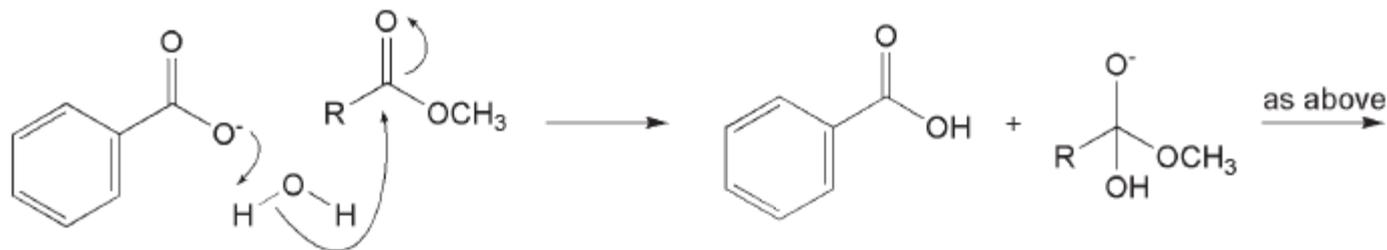
$$\text{velocità} = \frac{-d[\text{Esteri}]}{dt} = k_{OH}[\text{OH}^-][\text{Esteri}]$$

# Idrolisi degli esteri - catalisi acida generale



$$velocità = \frac{-d[\text{Esteri}]}{dt} = k_{AH}[\text{AH}][\text{Esteri}]$$

# Idrolisi degli esteri - catalisi basica generale



$$velocità = \frac{-d[\text{Esteri}]}{dt} = k_B[\text{B}][\text{Esteri}]$$

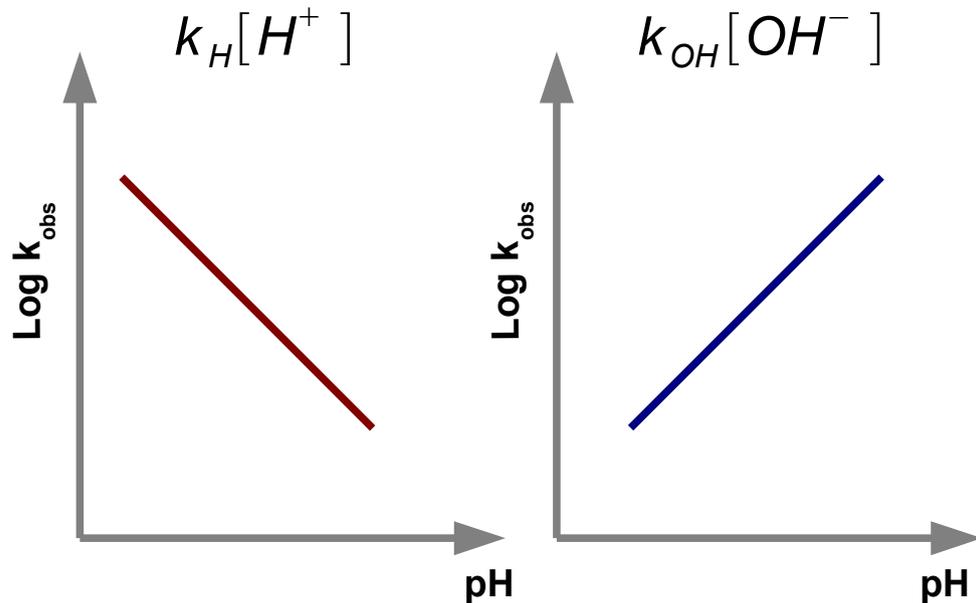
# Idrolisi degli esteri – visione generale

---

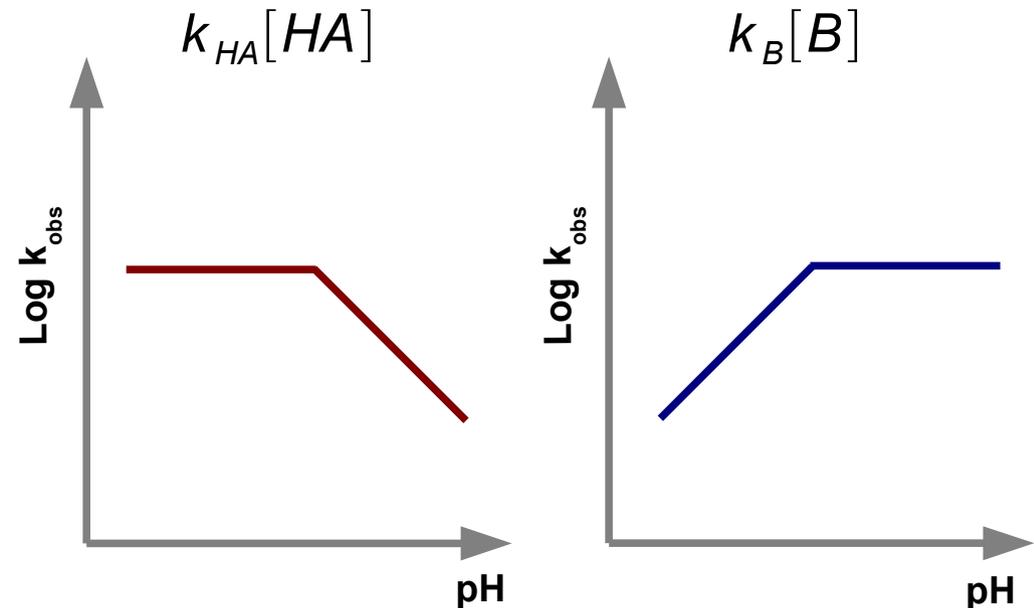
I processi possono avvenire contemporaneamente, quindi  $k_{obs}$  comprende diversi contributi

Un processo prevarrà sugli altri in funzione del pH

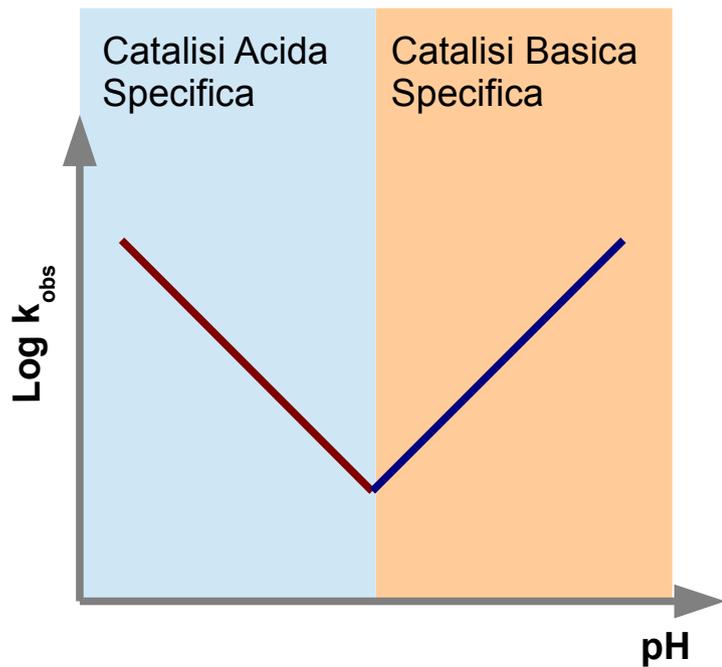
## Catalisi Specifica



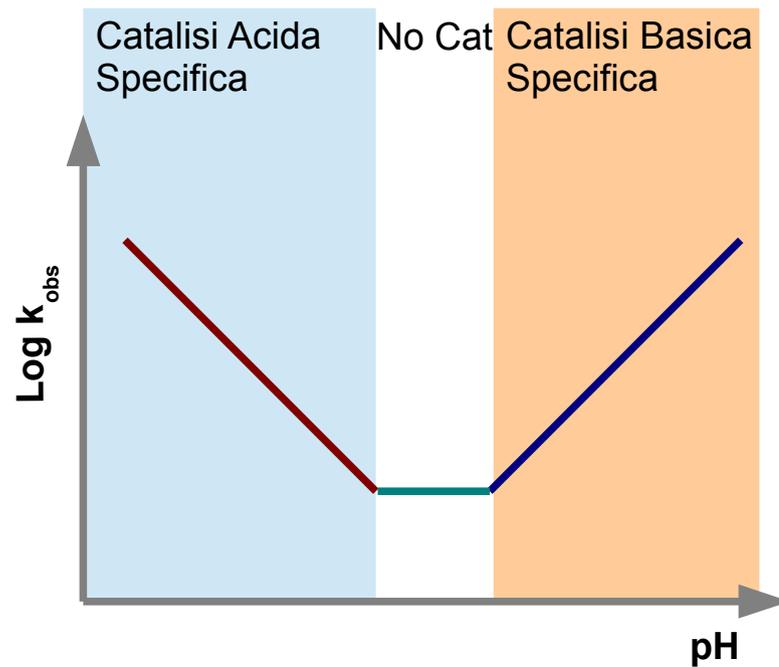
## Catalisi Generale



# Profilo reattività-pH per un estere tipico

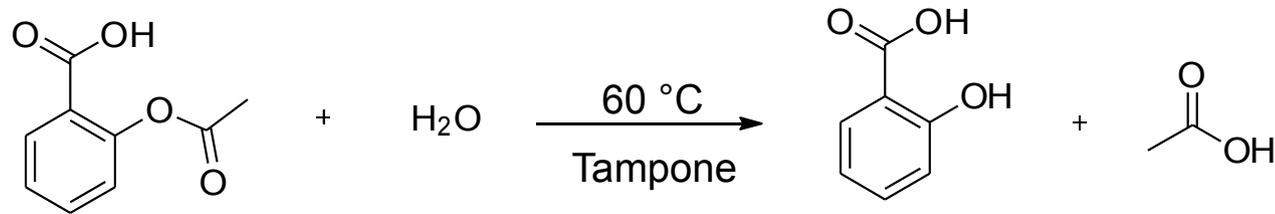


La reazione non catalizzata è sempre trascurabile

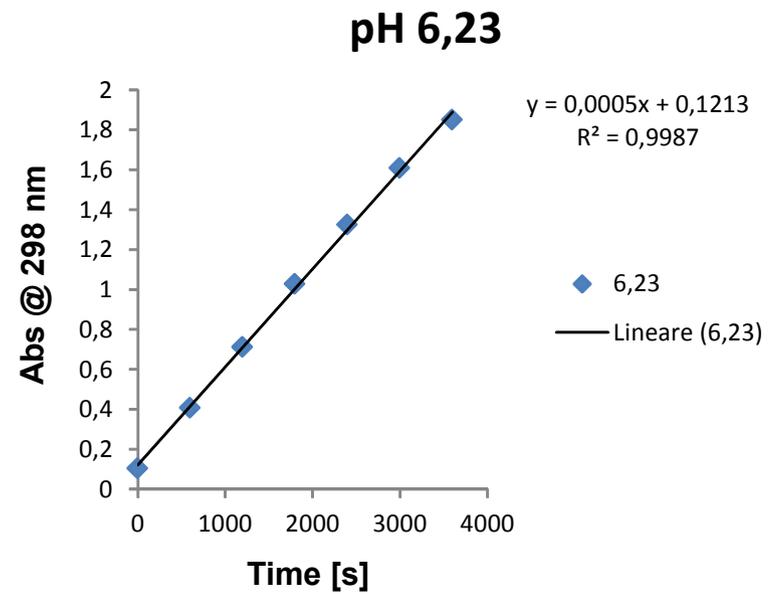


La reazione non catalizzata è osservabile in un intervallo ristretto di pH

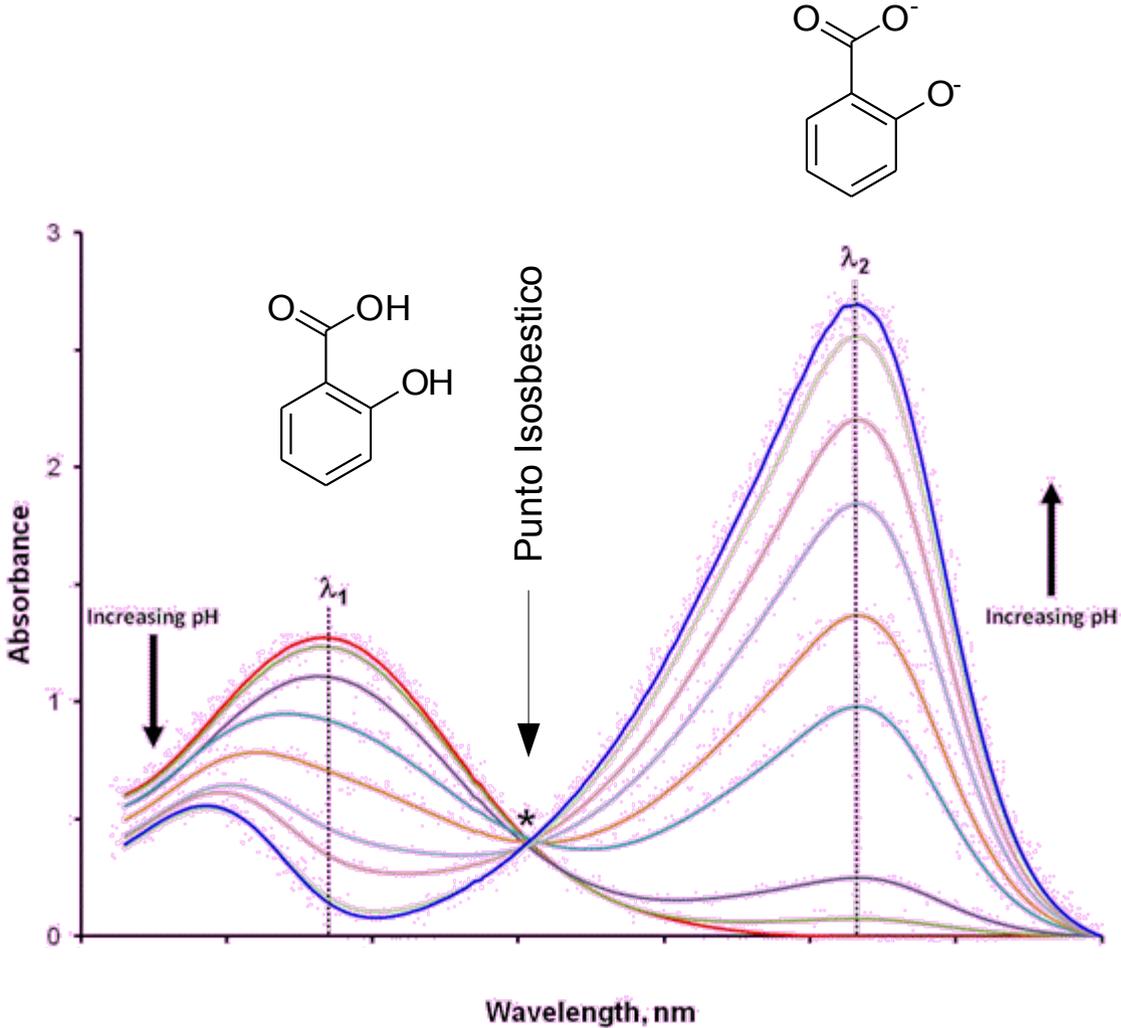
# Idrolisi dell'Aspirina



pH	Time [min]	N° prelievi
1	10	10
2	15	10
3	15	10
4	10	10
5	10	10
6	10	10
7	10	10
8	5	10
9	2	10
10	1	10



# Analisi Spettrofotometrica al punto isosbastico



# Metodo delle velocità iniziali

A pH costante (tamponato) la velocità di scomparsa del reagente è descritta da una cinetica dello *pseudo primo ordine* lo stesso vale per la formazione del prodotto

$$\text{velocità} = \frac{-d[\text{Asp}]}{dt} = k_{\text{obs}}[\text{Asp}] = \frac{d[\text{Sal}]}{dt}$$

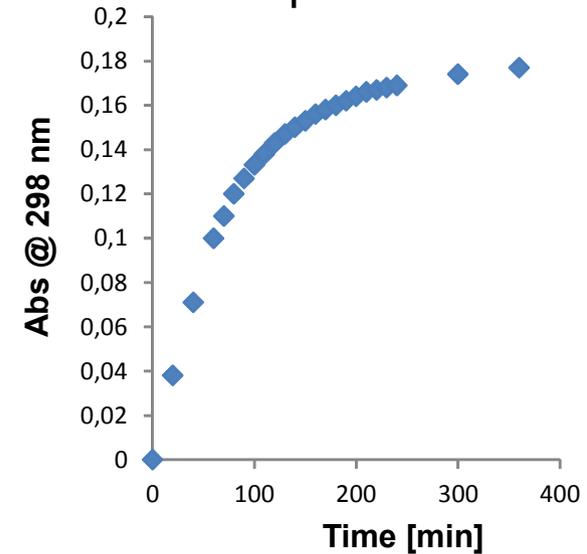
$$[\text{Sal}](t) = C(\infty)_{\text{sal}} [1 - \exp(-k_{\text{obs}} t)]$$

$$A(t) = A(\infty)_{\text{sal}} [1 - \exp(-k_{\text{obs}} t)]$$

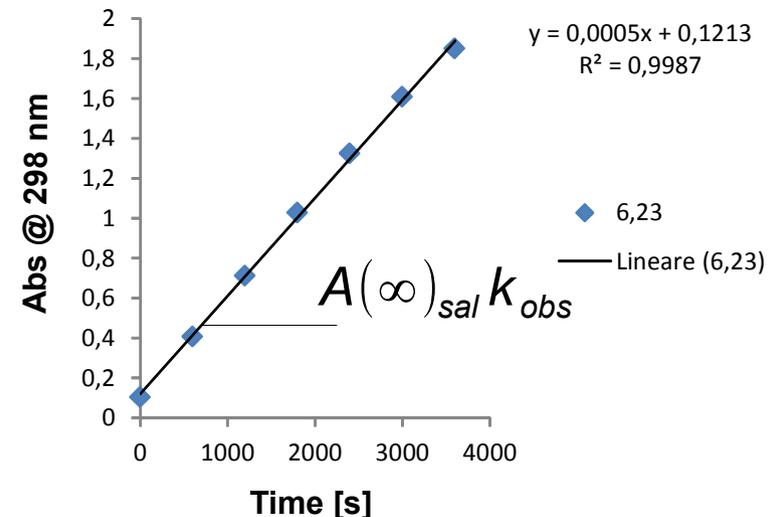
$$\frac{dA(t)}{dt} = A(\infty)_{\text{sal}} k_{\text{obs}} \exp(-k_{\text{obs}} t)$$

Nei primi istanti della reazione, quando  $t \rightarrow 0$

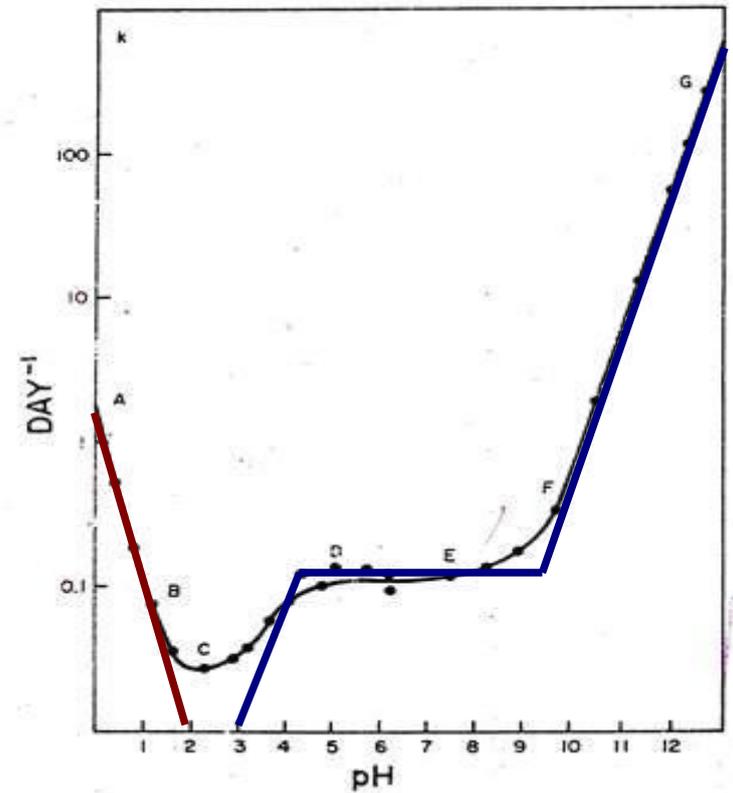
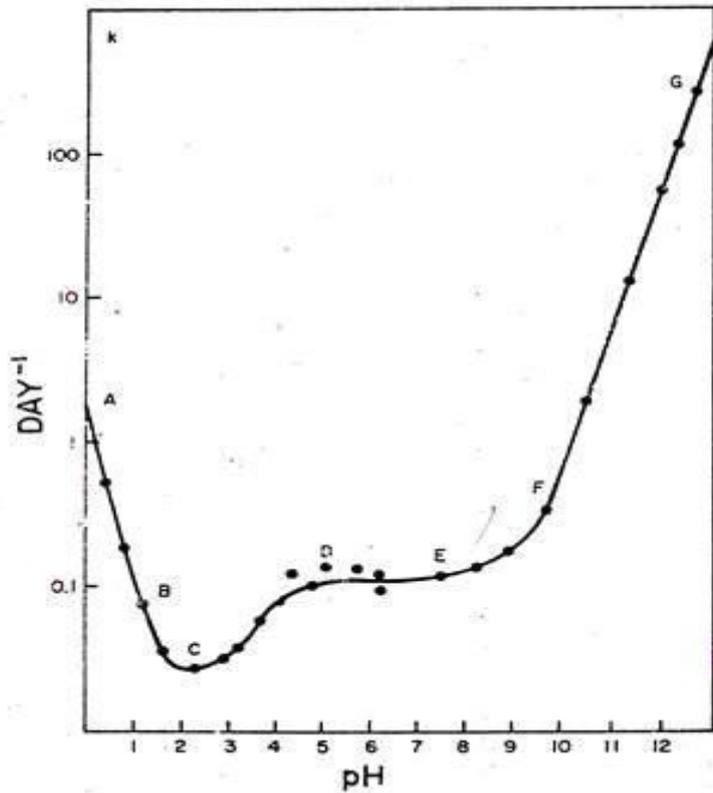
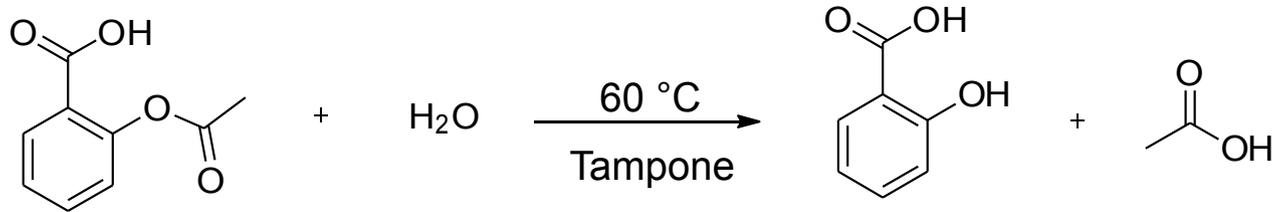
$$\left( \frac{dA(t)}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = A(\infty)_{\text{sal}} k_{\text{obs}}$$



pH 6,23



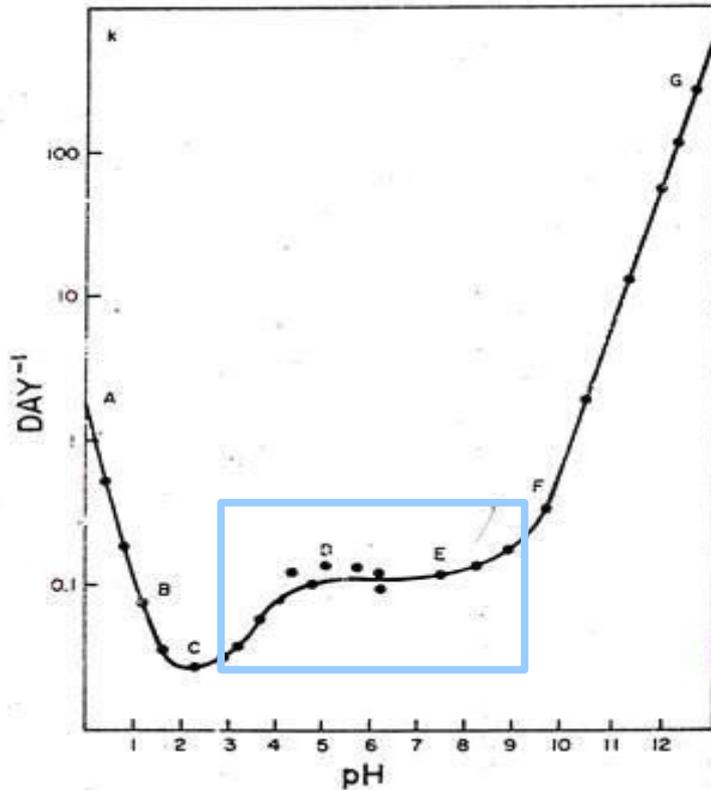
# Idrolisi dell'Aspirina



$k_{\text{obs}}$  a 17 °C in funzione del pH.

*Trans. Farad. Soc.* **1950**, 46, 723

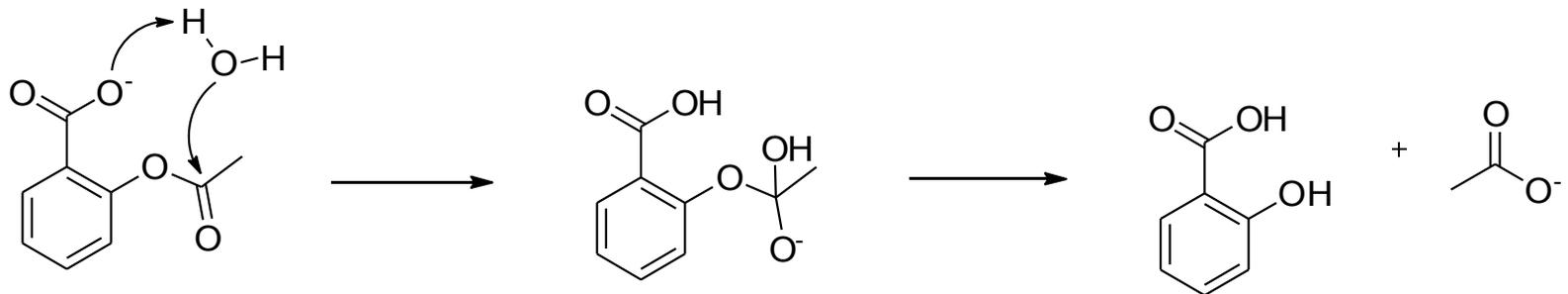
# Idrolisi dell'Aspirina



Regione A-B: catalisi acida specifica

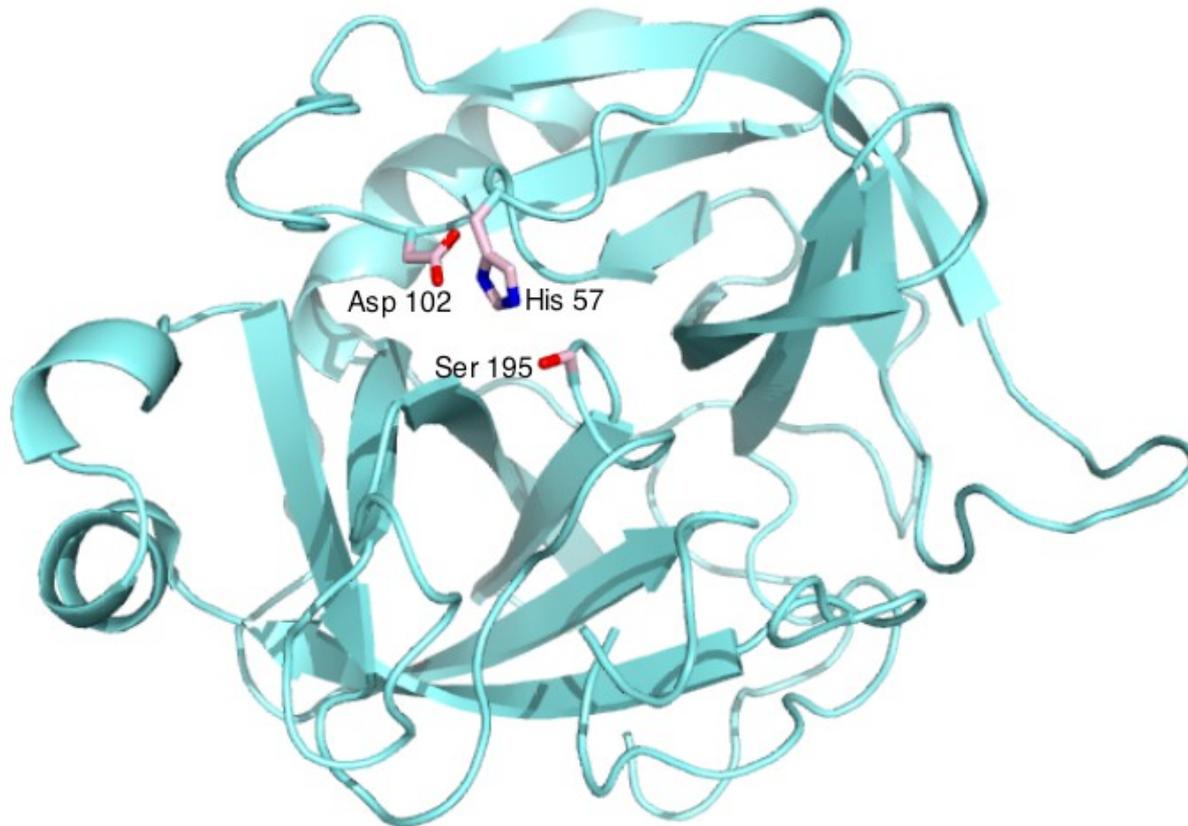
Regione F-G: catalisi basica specifica

Regione C-E: catalisi basica generale  
INTRAMOLECOLARE



# Alfa-Chimotripsina

---



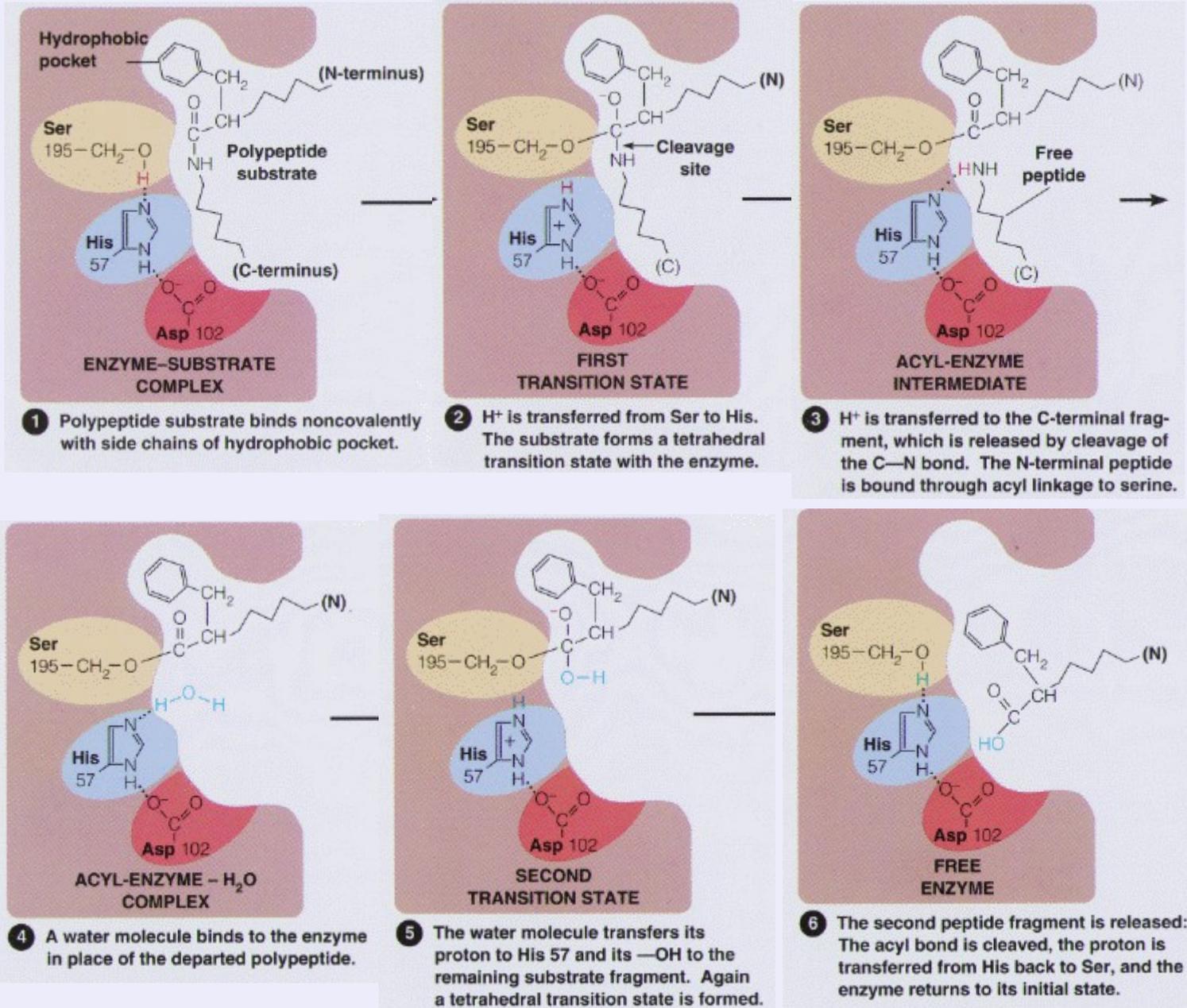
Serina-Proteasi

Nel sito attivo presenta

-Asp  
-Ser  
-His

Presenta una certa selettività per la scissione di legami peptidici coinvolgenti residui idrofobici

# Meccanismo di azione dell' Alfa-Chimotripsina



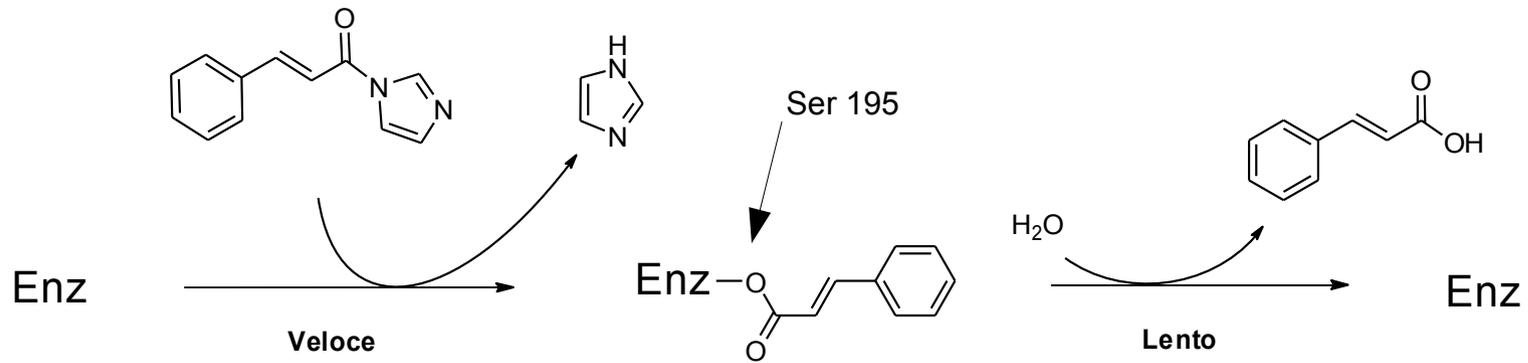
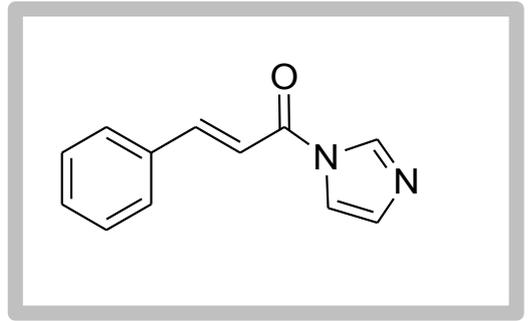
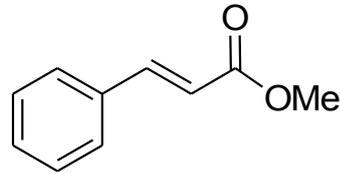
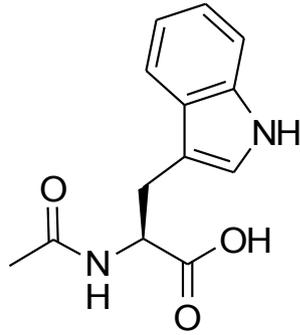
Acilazione

Idrolisi

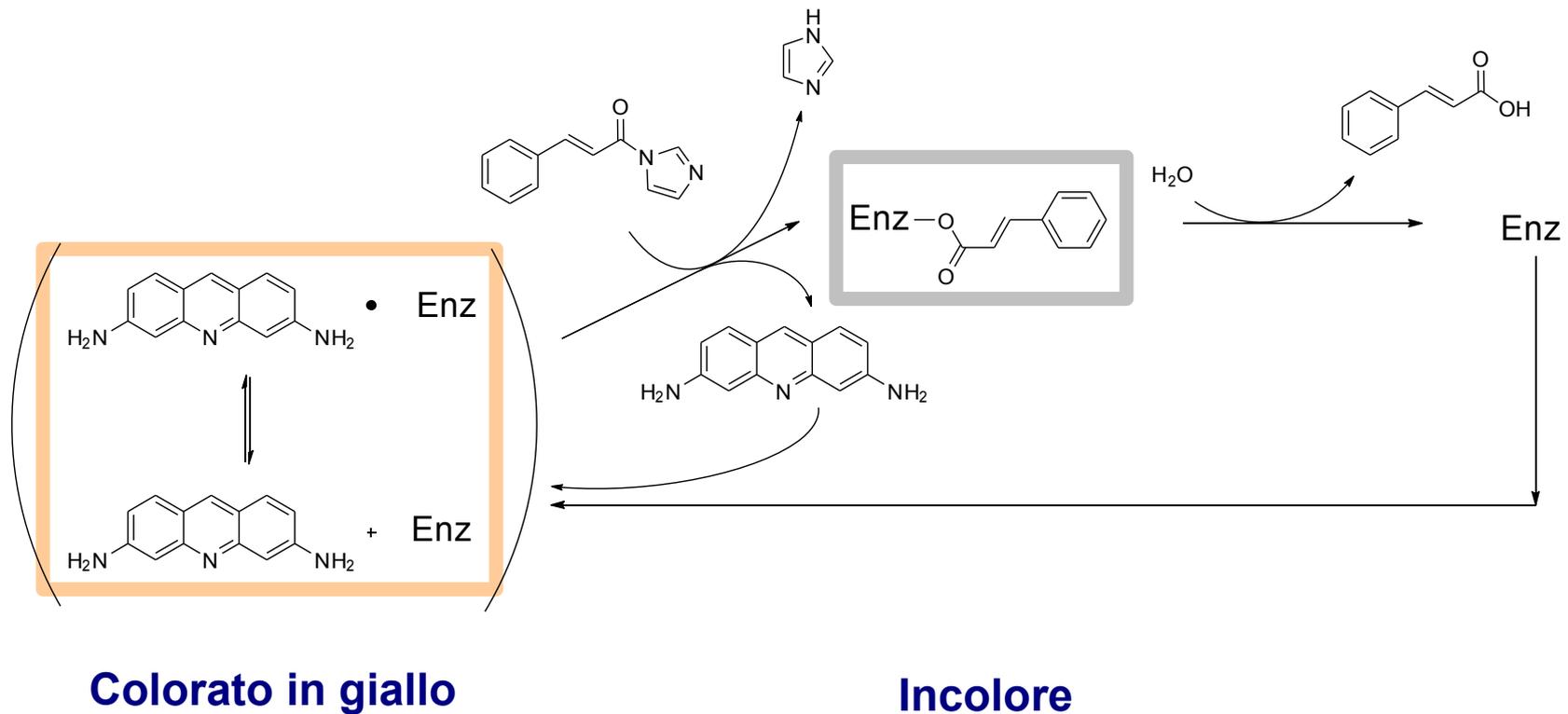
# Acilazione dell' Alfa-Chimotripsina



Myron Lee Bender



# Principio del metodo



**La velocità di deacilazione dell'enzima è un processo del primo ordine cinetico, dipende dalla concentrazione dell'acil-enzima (e dal pH)**

# Principio del metodo

---

- Come essere sicuri che la proflavina si lega al sito attivo ?
  - Con quale stechiometria si forma il complesso enzima-proflavina?
  - Quale è la costante di formazione del complesso enzima-proflavina?
- 
- La stechiometria può essere determinata usando il **metodo delle variazioni continue** (Job plot)
  - La costante di legame può essere determinata (**nota la stechiometria**) dal fitting di una curva di titolazione

# Principio del metodo

## Spettroscopia di differenza

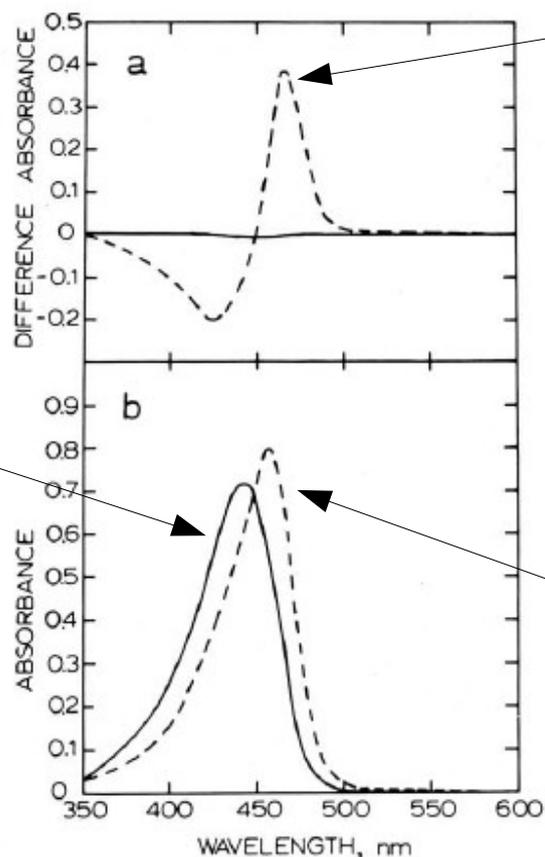
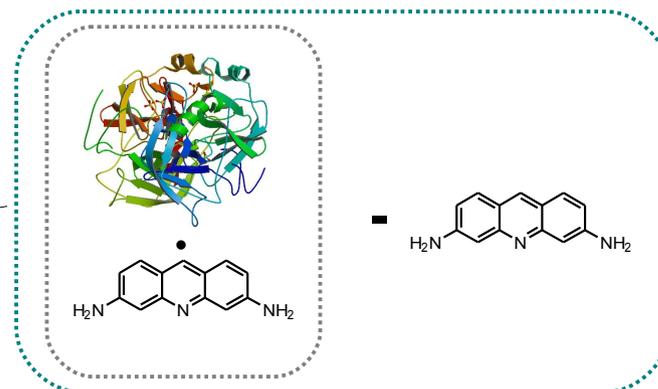
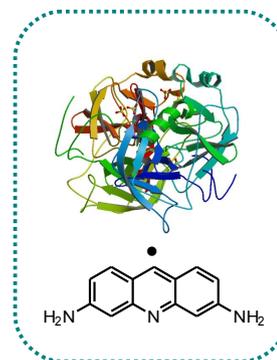


Figure 2. (a) Difference spectrum between proflavine and the chymotrypsin-proflavine complex. (b) Change in the absorption spectrum of proflavine with the addition of chymotrypsin, 0.1 M TRIS buffer, pH 8.0 (Proflavine) =  $2.14 \times 10^{-5}$  M, (—) no chymotrypsin, (---) with chymotrypsin ( $4 \times 10^{-4}$  M).



Ramo di misura

Ramo di riferimento

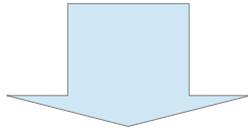


# Principio del metodo

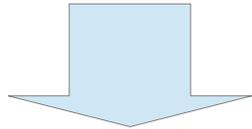
---

- Con quale stechiometria si forma il complesso enzima-proflavina?
- Quale è la costante di formazione del complesso enzima-proflavina?

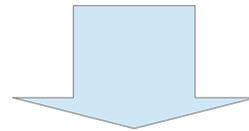
**metodo delle variazioni continue**



**STECIOMETRIA DEL COMPLESSO**



**Fitting della curva di titolazione**



**COSTANTE DI COMPLESSAZIONE**

# Principio del metodo

---

pH	Time [s]
5,5	60
6	60
6,5	30
7	30
7,5	20
8	10
8,5	10

Enzima (tampone)  
Proflavina  
Substrato



Campione

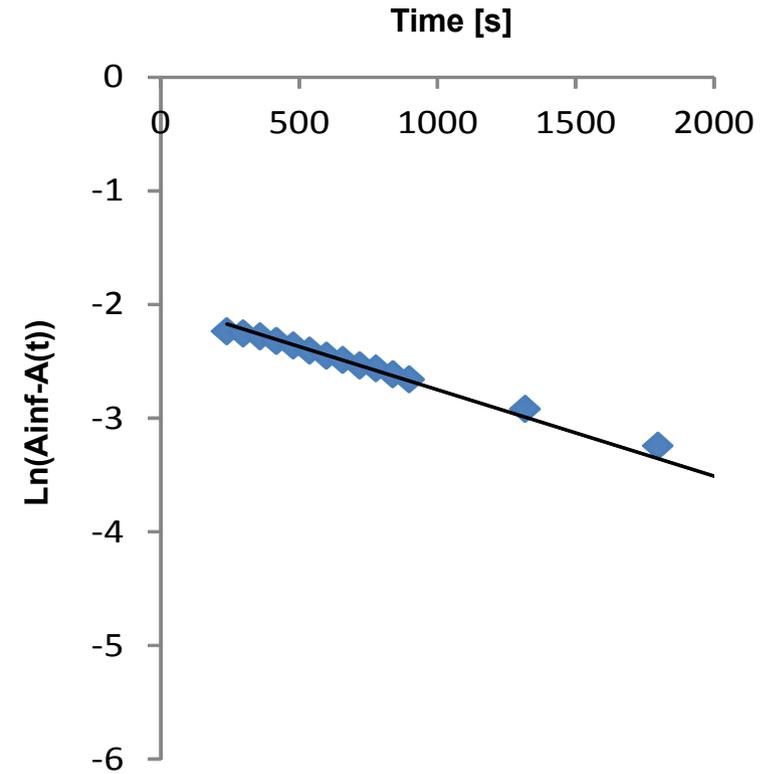
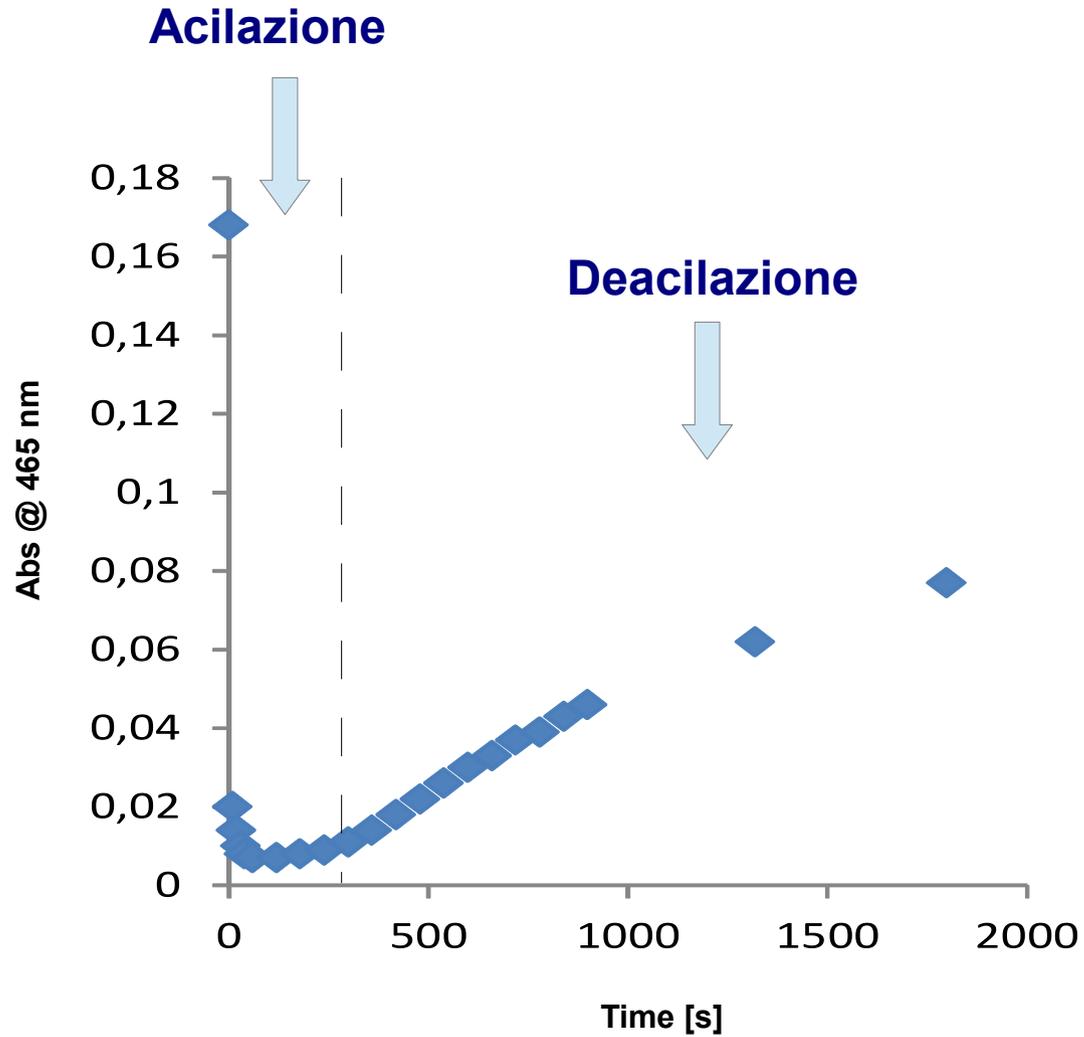
Tampone  
Proflavina  
Substrato



Riferimento

**Letture di Assorbanza a 465 nm**

# Analisi dei dati

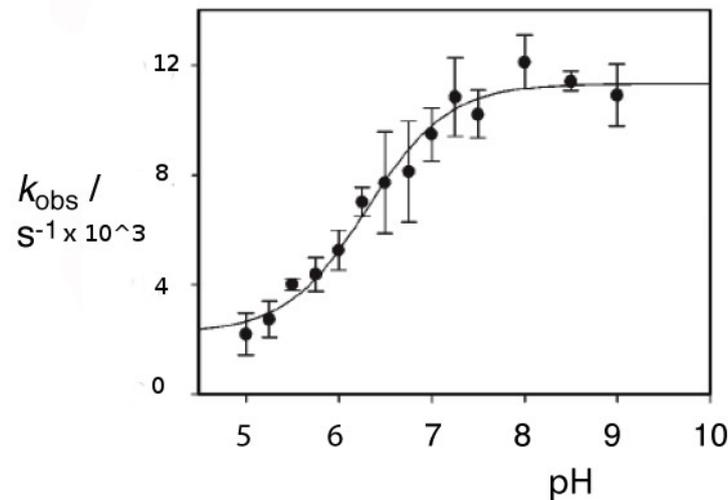
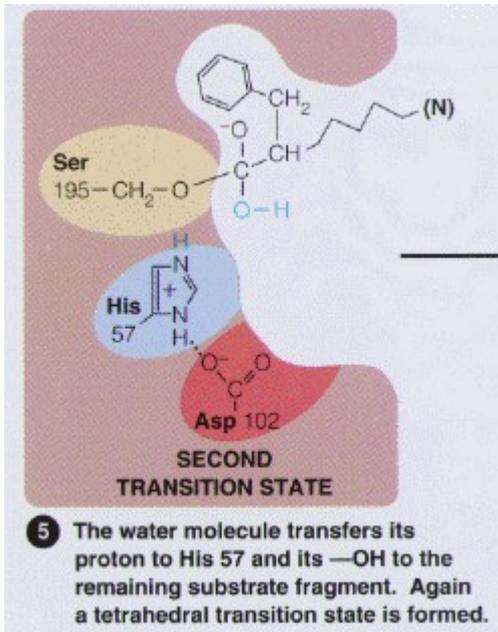
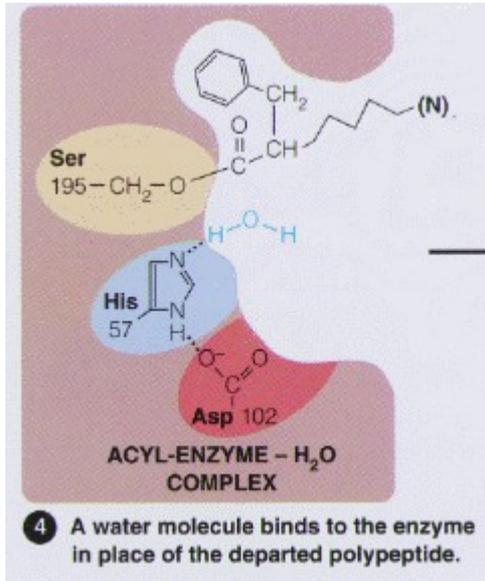


**La pendenza è la -kobs**

# Dipendenza dal pH

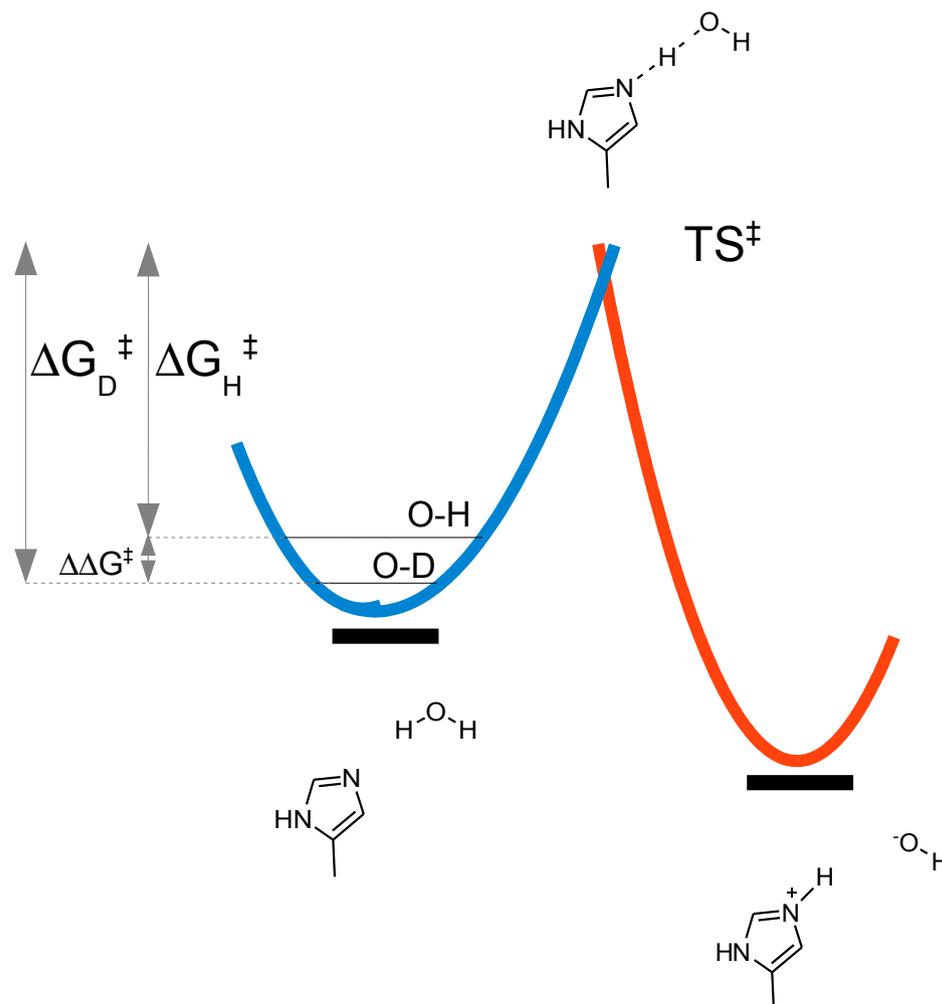
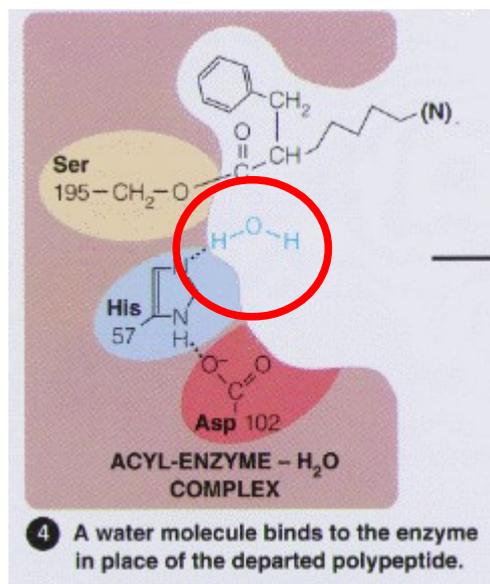
Quando la base responsabile della deprotonazione dell'acqua non è disponibile perché protonata, l'idrolisi dell'intermedio acil-enzima è rallentata

L'analisi della reattività ( $k_{\text{obs}}$ ) in funzione del pH permette di avere informazioni sulla  $pK_a$  della base coinvolta nel processo



# Effetto isotopico cinetico del solvente

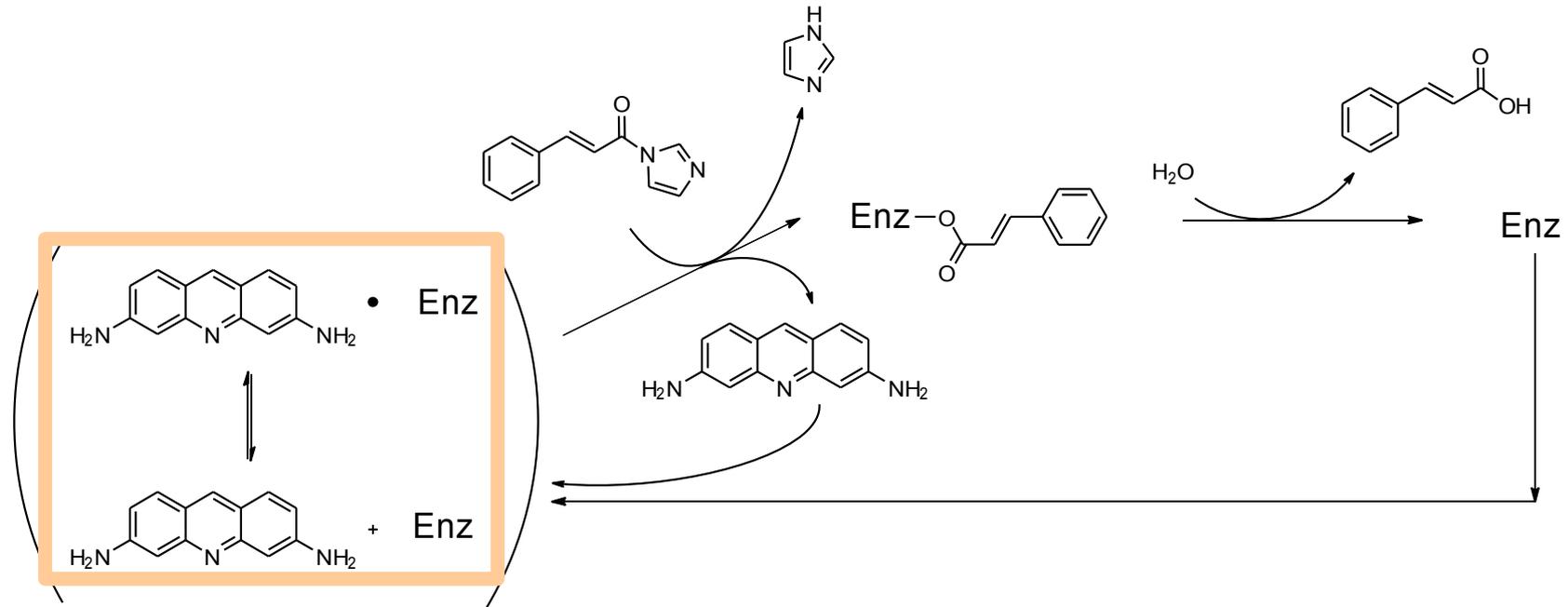
Cosa accade se  $\text{H}_2\text{O}$  viene sostituita da  $\text{D}_2\text{O}$ ?



$$k_D < k_H \quad k_H/k_D > 1$$

Effetto isotopico normale

# Il legame Enzima-Proflavina

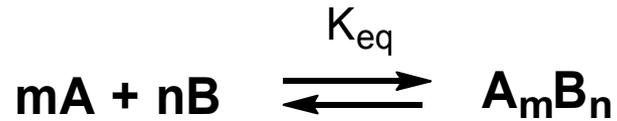


**1. Stechiometria del complesso Enzima-Proflavina**

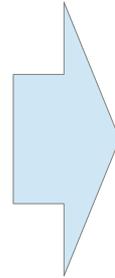
**2. Determinazione della costante di complessazione**

# Il legame Enzima-Proflavina

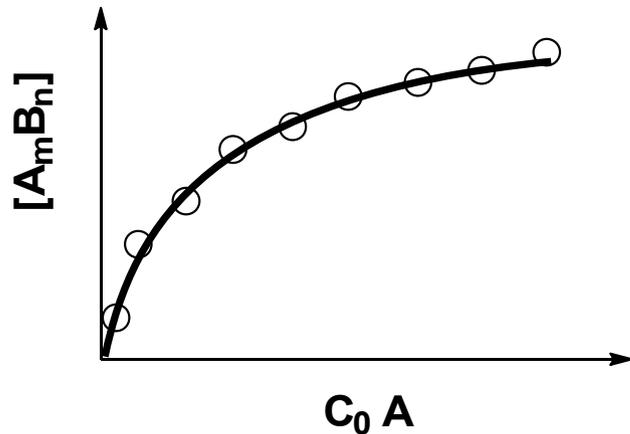
## 1. Stechiometria del complesso Enzima-Proflavina



$C_0 B = \text{costante}$ , variamo  $C_0 A$



Curva di titolazione



Costante di complessazione

Fitting dei dati sperimentali

Richiede di conoscere la  
stechiometria del complesso!

# Il legame Enzima-Proflavina

## Metodo delle variazioni continue (Job Plot)

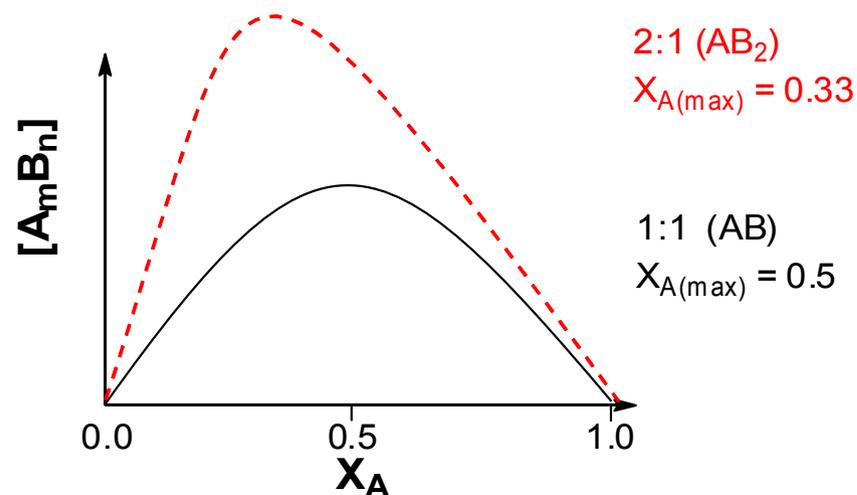


$C_0 A + C_0 B = \text{costante}$

Ma

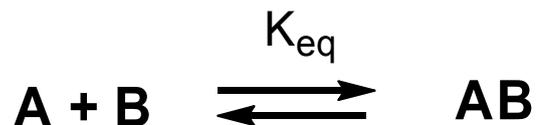
$C_0 A$  e  $C_0 B$  vengono variate entrambe

$$X_A = \frac{C_0 A}{C_0 A + C_0 B}$$

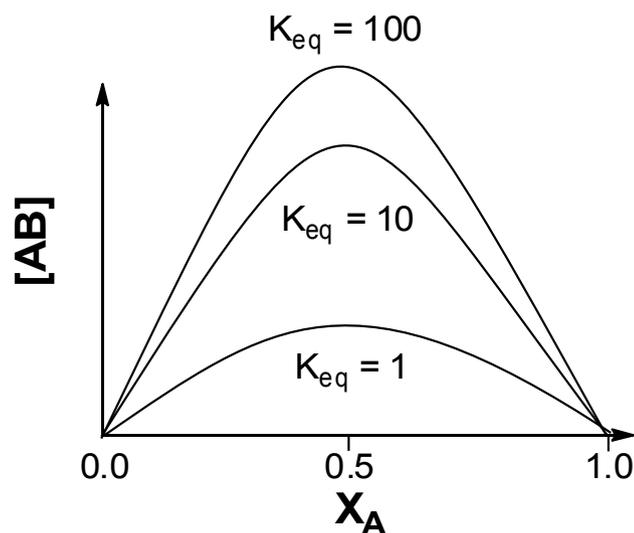


# Il legame Enzima-Proflavina

## Metodo delle variazioni continue (Job Plot)



$$[AB] = \frac{1 + 2cK_{eq} - \sqrt{1 + 2cK_{eq} + [cK_{eq}(1 - 2X_A)]^2}}{2K_{eq}}$$



$[AB]_{\max}$  si ha per  $X_A = 0.5$

La forma della curva dipende dalla costante di complessazione

# Il legame Enzima-Proflavina, Stechiometria

---

## Metodo delle variazioni continue (Job Plot)

Ricordando che:

$C_0 A + C_0 B = \text{costante}$  **MA**  $C_0 A$  e  $C_0 B$  vengono variate entrambe

$C_0 \text{ Enz} + C_0 \text{ Proflavina} = 0.1 \text{ mM}$

Soluzione madre di enzima 0.75 mM in tampone fosfato 50 mM pH 7.5

Soluzione madre di Proflavina 0.43 mM in tampone fosfato 50 mM pH 7.5

# Il legame Enzima-Proflavina, Stechiometria

## Metodo delle variazioni continue (Job Plot)

### Campioni

Campione	Enzima (mM)	Proflavina (mM)	X Enzima	X Proflavina
0	0	0,1	0	1
1	0,01	0,09	0,1	0,9
2	0,02	0,08	0,2	0,8
3	0,03	0,07	0,3	0,7
4	0,04	0,06	0,4	0,6
5	0,05	0,05	0,5	0,5
6	0,06	0,04	0,6	0,4
7	0,07	0,03	0,7	0,3
8	0,08	0,02	0,8	0,2
9	0,09	0,01	0,9	0,1
10	0,1	0	1	0

### Riferimento

Proflavina (mM)
0,1
0,09
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0

**ATTENZIONE! Ogni Campione ha IL SUO riferimento**

# Il legame Enzima-Proflavina

## Misure spettrofotometriche

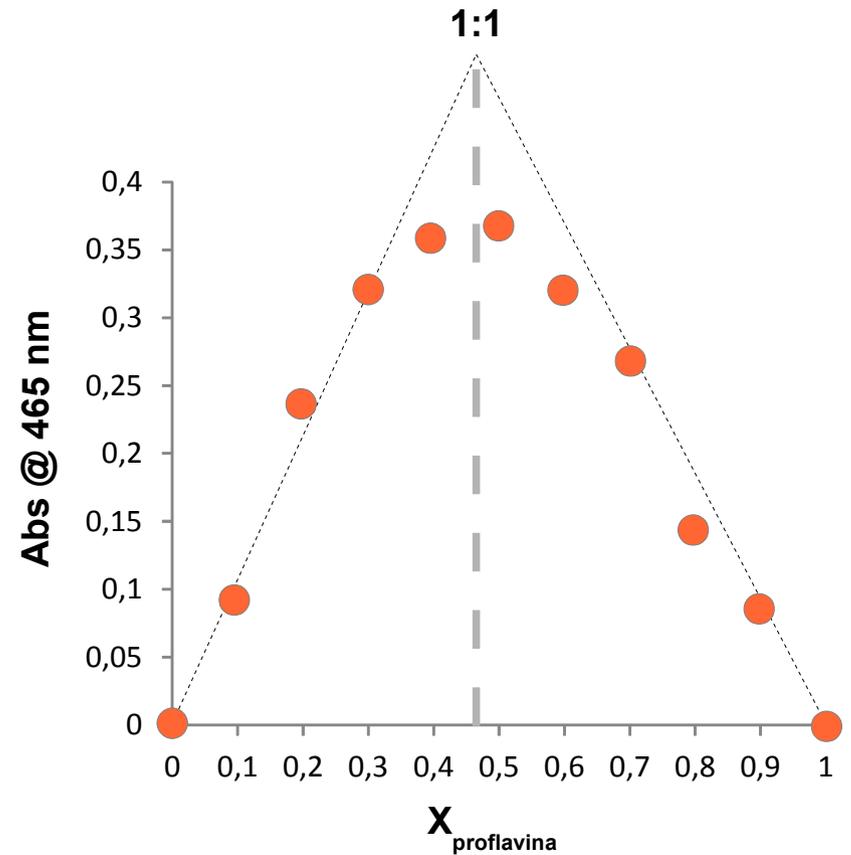


Campione:  
da 0 a 10



Riferimento:  
Stessa concentrazione di  
proflavina, SENZA enzima

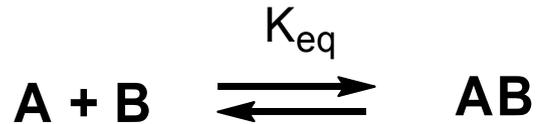
## Lecture di Assorbanza a 465 nm



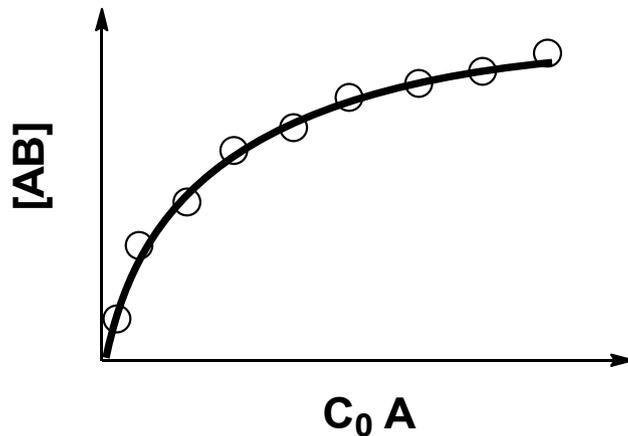
# Il legame Enzima-Proflavina

---

## 2. Determinazione della costante di complessazione



$C_0 B = \text{costante}$ , variamo  $C_0 A$



In Laboratorio manterrete **fissa** la concentrazione di **proflavina** e **varierete** la concentrazione di **enzima**

Preparando **dieci** soluzioni a concentrazione **fissa** di **proflavina** e concentrazione **variabile** di **enzima**

# Il legame Enzima-Proflavina

## 2. Determinazione della costante di complessazione

Proflavina 16.7  $\mu\text{M}$  in tampone fosfato 50 mM pH 7.5

Soluzione madre di enzima 1.0 mM in tampone fosfato 50 mM pH 7.5

<i>Campione</i>	<i>Enzima (M)</i>	<i>Proflavina</i>
0	0,00E+00	1,67E-05
1	1,00E-05	1,67E-05
2	2,00E-05	1,67E-05
3	3,00E-05	1,67E-05
4	5,00E-05	1,67E-05
5	7,00E-05	1,67E-05
6	8,00E-05	1,67E-05
7	1,00E-04	1,67E-05
8	1,50E-04	1,67E-05
9	2,00E-04	1,67E-05
10	3,00E-04	1,67E-05

### Misure spettrofotometriche



Campione  
da 0 a 10

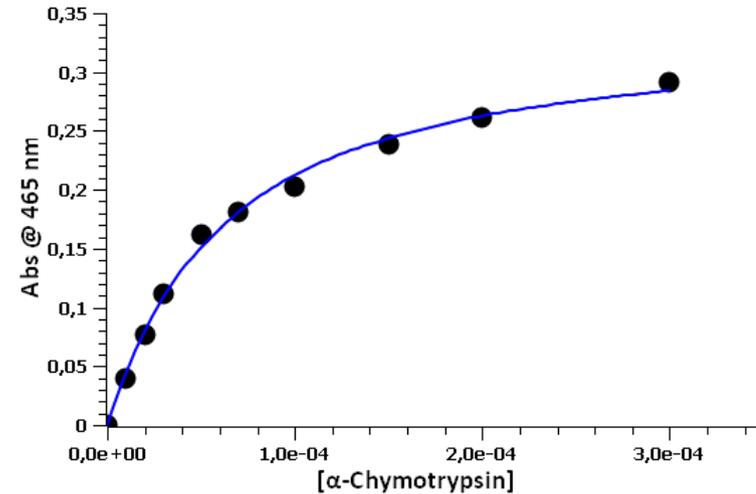


Riferimento:  
Stessa composizione  
del campione 0

**Letture di Assorbanza a 465 nm**

# Il legame Enzima-Proflavina

Campione	Enzima (M)	Proflavina
0	0,00E+00	1,67E-05
1	1,00E-05	1,67E-05
2	2,00E-05	1,67E-05
3	3,00E-05	1,67E-05
4	5,00E-05	1,67E-05
5	7,00E-05	1,67E-05
6	8,00E-05	1,67E-05
7	1,00E-04	1,67E-05
8	1,50E-04	1,67E-05
9	2,00E-04	1,67E-05
10	3,00E-04	1,67E-05



**Fitting dei dati sperimentali**



**Costante di complessazione**

Dati di letteratura per la costante di complessazione

*Biopolymers*, **1978**, 17, 1773-1792.

Programma di fitting consigliato: SciDAVis

<http://scidavis.sourceforge.net/>