

Studio di meccanismi di reazione in Chimica Bioorganica

ppengo@units.it

St. 344

Laboratorio Chimica Bioorganica

Complessazione della Metmioglobina con lo ione fluoruro

Determinazione delle costanti di velocità

Determinazione della costante di complessazione

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

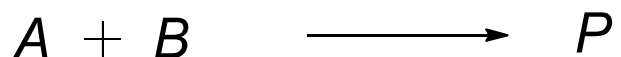
- Proporre una legge cinetica

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 α , β

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?

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

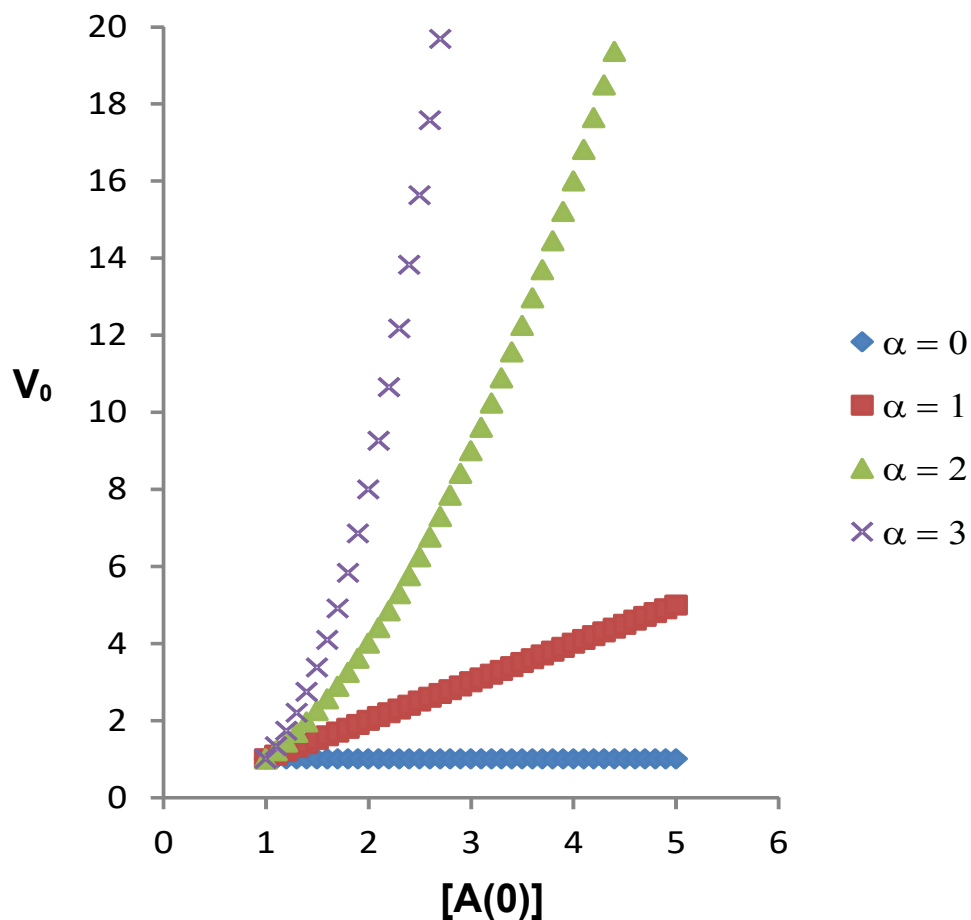
<i>Diverse composizioni della miscela di reazione</i>		<i>Diverse velocità iniziali</i>
$A_1(0); B(0)$	→	$V_{01} \simeq k_{obs} [A_1(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$
$A_2(0); B(0)$	→	$V_{02} \simeq k_{obs} [A_2(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$
$A_3(0); B(0)$	→	$V_{03} \simeq k_{obs} [A_3(0)]^\alpha [B(0)]^\beta$

Come studiare un meccanismo?

Composizioni	V_0
$A_1(0); B(0) \rightarrow$	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 α



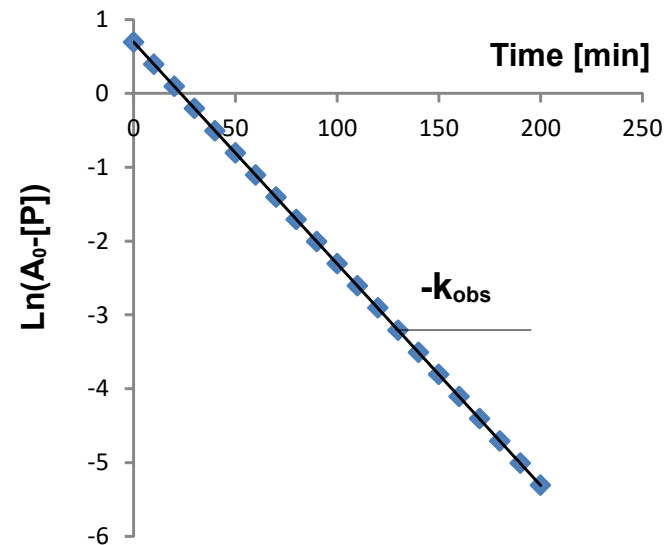
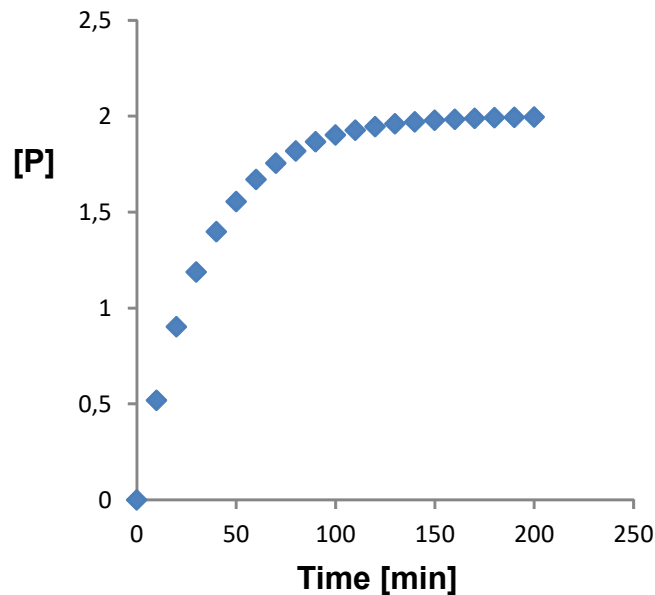
Come studiare un meccanismo?

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

Differenziale

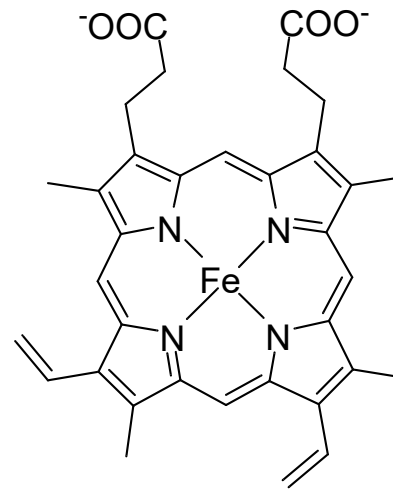
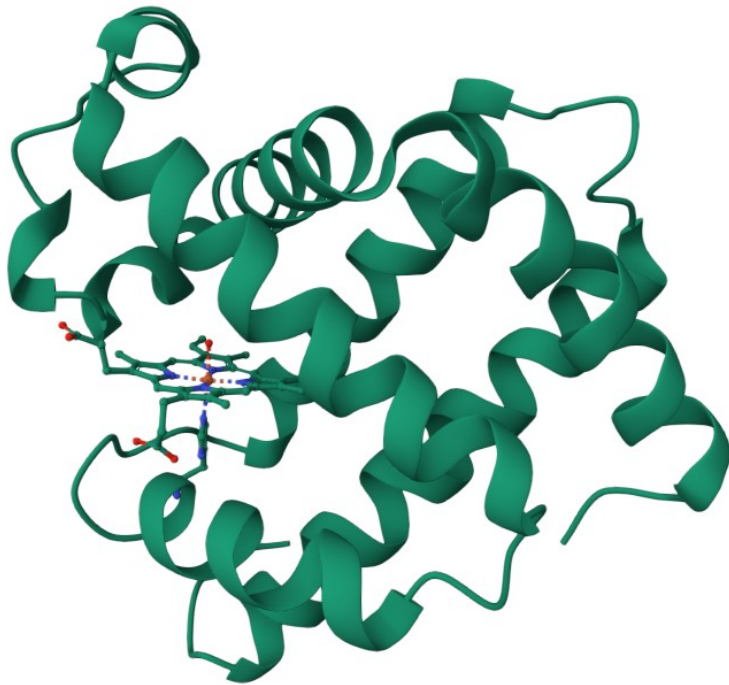
Integrale

$$\frac{d[P(t)]}{dt} = k_{obs}[A(t)] \quad \xrightarrow{\hspace{1cm}} \quad P(t) = A_0[1 - e^{(-k_{obs}t)}]$$



Ferrimioglobina (Metmioglobina)

La ferrimioglobina (mioglobina ferrica) o Metmioglobina deriva dalla mioglobina per ossidazione dello ione Fe(II) che si trova nell'eme che costituisce il gruppo prostetico della proteina.



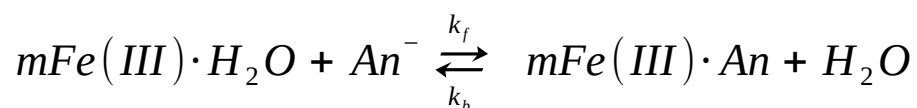
Fe^{2+} (Deossimioglobina)

$\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2$ (Ossimioglobina)

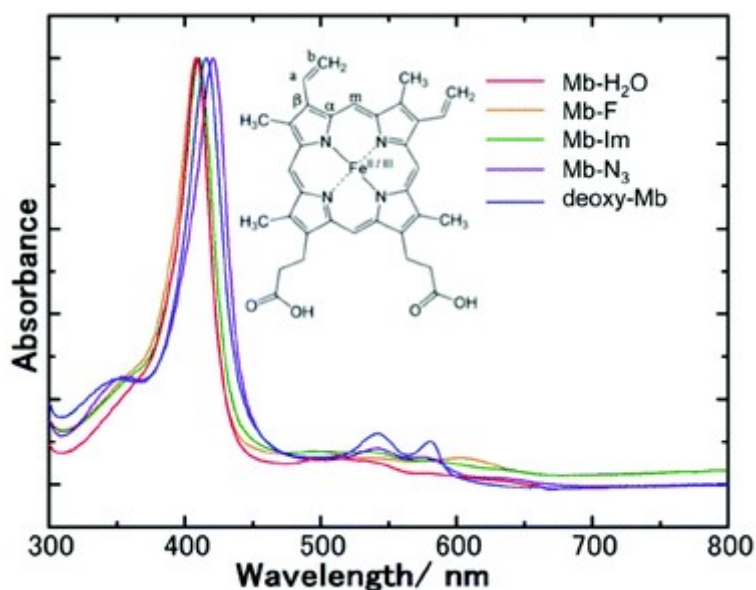
$\text{Fe}^{3+} - \text{H}_2\text{O}$ (Metmioglobina)

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

La ferrimioglobina può complessare (in genere in modo reversibile) una varietà di anioni come F^- , SCN^- , CN^- , N_3^- per sostituzione della molecola d'acqua legata al centro di $Fe(III)$.



Spettri UV-Vis della mioglobina.



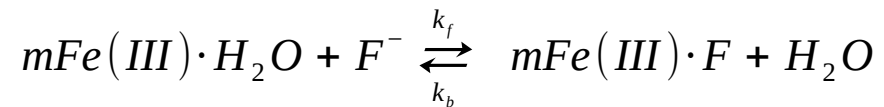
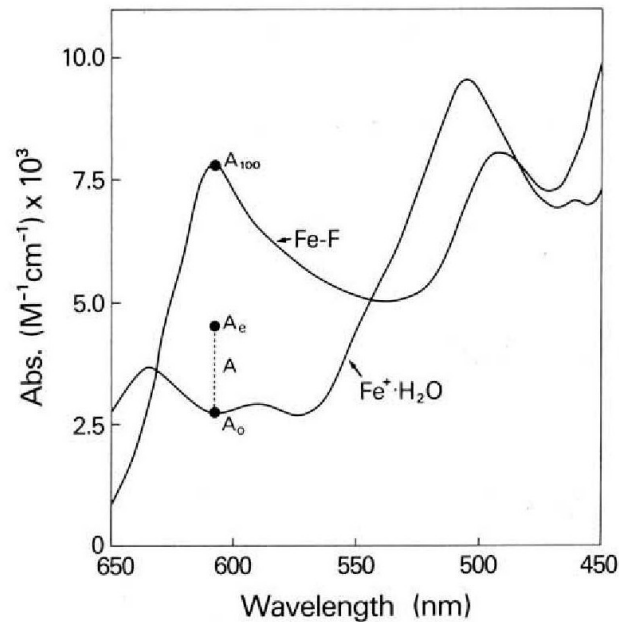
La complessazione è influenzata dal pH del mezzo. Sia perché l'anione può essere soggetto ad equilibri acido-base, ma soprattutto perché la molecola d'acqua legata al centro di $Fe(III)$ può essere deprotonata ($pH > \sim 9.0$), generando una specie molto meno reattiva.

Lo spettro UV-Vis del gruppo eme cambia in funzione dello stato di ossidazione del ferro ed in funzione del legante che porta.

Questo ci consente di monitorare il processo di complessazione per via spettrofotometrica

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro



Le due specie hanno un diverso coefficiente di estinzione molare a 608 nm. Monitorerete la complessazione a questa lunghezza d'onda.

Nel caso dello ione fluoruro, la complessazione è ragionevolmente lenta, richiede alcuni minuti per raggiungere l'equilibrio. Questo consente di monitorare la cinetica del fenomeno che consiste sia di un processo di formazione che di un processo di dissociazione.

La velocità netta di formazione del complesso $mFe(III) \cdot F$ si ottiene considerando **entrambi i processi** e sarà quindi

$$\frac{d[mFe(III) \cdot F]}{dt} = k_f [mFe(III) \cdot H_2O] [F^-] - k_b [mFe(III) \cdot F]$$

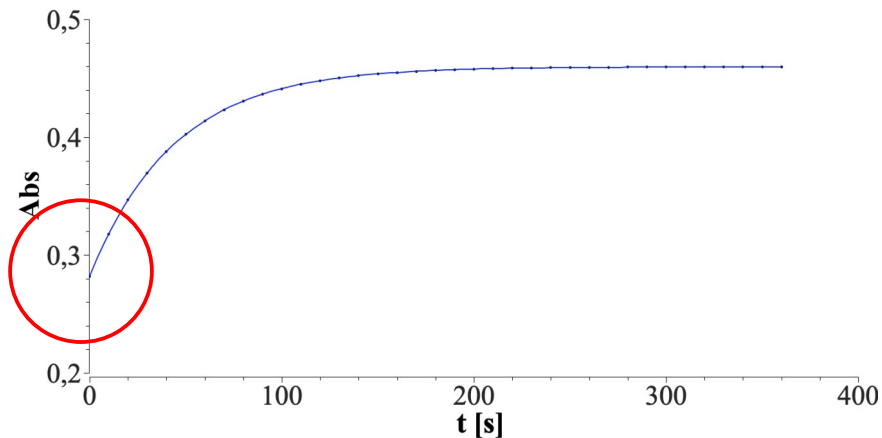
Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro

L'integrazione della equazione precedente, assumendo di operare in condizioni dello pseudo-primo ordine (per eccesso di ione fluoruro) porta alla equazione che segue:

$$[mFe(III) \cdot F](t) = \frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b} [1 - e^{-(k_f F_0 + k_b)t}]$$

Esempio di cinetica



ATTENZIONE: usando per il fitting dei dati sperimentali un modello derivato da questa equazione e conducendo esperimenti a concentrazioni diverse di ione fluoruro è possibile determinare sia la k_f che la k_b e quindi, indirettamente la K_{eq}

Il modello da utilizzare per il fitting è del tipo:

$$y(t) = y_0 + \Delta y (1 - e^{-k_{obs}t})$$

dove il termine y_0 è inserito per tenere conto che la ferrimioglobina assorbe anch'essa a 608 nm. Il termine k_{obs} è quello che interessa perché:

$$k_{obs} = k_f F_0 + k_b$$

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro

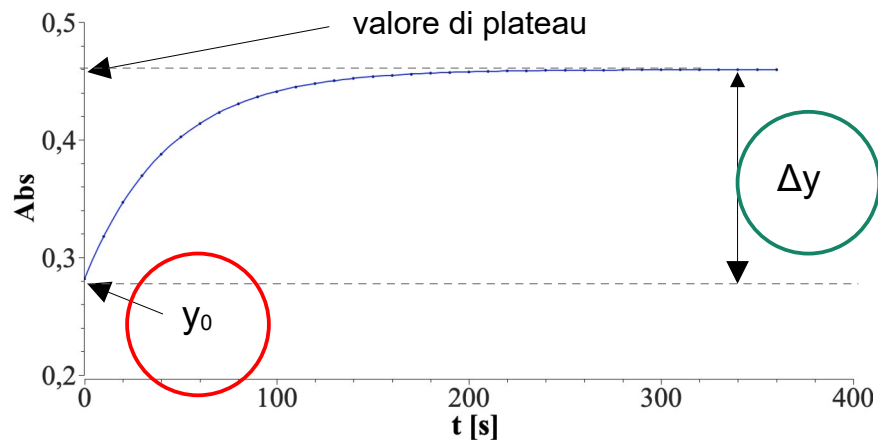
$$k_{obs} = k_f F_0 + k_b$$

Sulla base di questa equazione è chiaro che determinando k_{obs} as una serie di concentrazioni iniziali di ione fluoruro è possibile determinare sia k_f che k_b . Si tratta, infatti, di una retta di pendenza k_f e intercetta k_b . Ottenuti questi valori si può calcolare la K_{eq} .

$$K_{eq} = \frac{k_f}{k_b}$$

Determinazione termodinamica della K_{eq}

Il termine $\frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b}$ rappresenta la **concentrazione di equilibrio del complesso** ed è legato al valore di plateau della cinetica



$$y(t) = y_0 + \Delta y (1 - e^{-k_{obs} t})$$

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro

I valori di Δy dipendono quindi da qual'è la concentrazione di equilibrio ad una data concentrazione iniziale di ferrimioglobina e ione fluoruro. In particolare il valore di Δy vale:

$$\Delta \epsilon \frac{K_{eq} F_0 m_0}{K_{eq} F_0 + 1}$$

Dove $\Delta \epsilon$ è la differenza tra i coefficienti di estinzione molare del complesso e della ferrimioglobina.

Riportando in un diagramma I valori di plateau, o di Δy , in funzione delle concentrazioni iniziali di ione fluoruro si ottiene una curva dal cui fitting è possibile ottenere il valore di K_{eq} .

Per il fitting può essere utilizzato un modello del tipo:

$$y = y_0 + a \frac{Kx}{1 + Kx}$$

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro

In laboratorio lavorerete a pH 8.0, realizzato usando un tampone borato 50 mM. Lavorerete anche a forza ionica costante usando KCl per controbilanciare le varie quantità di KF che userete di volta in volta.

Lavorerete usando celle da spettrofotometria con un volume massimo di 850 μL , realizzando un volume totale di soluzione di 800 μL . Il KF andrà aggiunto immediatamente prima di iniziare le letture di assorbanza.

Le letture di assorbanza (608 nm) andranno effettuate ogni 10 secondi per un totale di alcuni minuti (indicativamente 5 minuti).

Ferrimioglobina
KF (KCl)



Campione

Tampone



Riferimento

Ferrimioglobina (Metmioglobina)

Complessazione con lo ione fluoruro

Sarà necessario preparare le seguenti soluzioni stock:

Tampone borato 50 mM, pH 8.0;
mioglobina ($1.3 \cdot 10^{-4}$ M) in tampone borato 50 mM;
KCl 0.4 M in tampone borato 50 mM;
KF 0.4 M in tampone borato 50 mM.

Condizioni da esplorare

Run	[F ⁻] (M)	Vol. MetMb sol.	Vol. KCl sol.	Vol. KF sol.
1	8.00×10^{-3}	480 µL	304 µL	16 µL
2	1.60×10^{-2}	480 µL	288 µL	32 µL
3	2.10×10^{-2}	480 µL	278 µL	42 µL
4	3.35×10^{-2}	480 µL	253 µL	67 µL
5	4.65×10^{-2}	480 µL	227 µL	93 µL
6	5.30×10^{-2}	480 µL	217 µL	106 µL
7	5.90×10^{-2}	480 µL	202 µL	118 µL
8	7.20×10^{-2}	480 µL	176 µL	144 µL