

Studio della cinetica di interazione tra Ferrimioglobina (Metmioglobina) e ione fluoruro; determinazione della costante di complessazione¹

Considerazioni generali

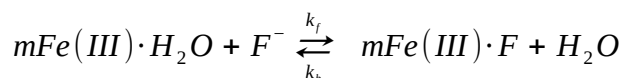
La ferrimioglobina (mioglobina ferrica) o Metmioglobina deriva dalla mioglobina per ossidazione dello ione Fe(II) che si trova nell'eme che costituisce il gruppo prostetico della proteina. La ferrimioglobina, quindi porta nel suo gruppo eme uno ione Fe(III), questa proteina è responsabile del colore marrone delle carni cotte o non fresche/mal conservate. La mioglobina è monomerica ed è costituita da un polipeptide di circa 150 amminoacidi, la sua funzione è quella di stoccare ossigeno nel muscolo striato, mentre la funzione dell'emoglobina è quella di trasportare l'ossigeno nel sangue. Le forme in cui è possibile trovare la mioglobina nel muscolo sono: la ossimioglobina (OxyMb) e la deossimioglobina (deoxyMb), la prima porta legato una molecola di ossigeno, la seconda ne è priva; queste sono tutte proteine a Fe(II). Nel muscolo 'vivente' la quantità di Metmioglobina (MetMb) è trascurabile; questa proteina non è in grado di legare l'ossigeno. Tuttavia la ferrimioglobina è in grado di legare diversi anioni, la complessazione porta ad una variazione dello spettro di assorbimento ottico di questa specie rendendo possibile monitorare l'interazione anione-MetMb. Nel caso dello ione F^- , operando in opportune condizioni di pH, la cinetica di complessazione è sufficientemente lenta da poter essere monitorata agevolmente per via spettrofotometrica. Lavorando a varie concentrazioni di ione F^- sarà anche possibile determinare la costate di equilibrio per il processo di complessazione.

Nel seguito la ferrimioglobina è indicata come $mFe(III) \cdot H_2O$ a significare che il centro di Fe(III) coordina in modo labile una molecola d'acqua; il complesso con lo ione fluoruro è indicato come $mFe(III) \cdot F$. In questa notazione non viene reso esplicito che in $mFe(III) \cdot H_2O$ lo ione Fe(III) ha una carica formale positiva e che in $mFe(III) \cdot F$ il Fe(III) ha carica formale zero.

- *Analisi cinetica del processo di complessazione, determinazione delle costanti di velocità e determinazione cinetica della K_{eq}*

Principio del metodo

L'interazione tra ferrimioglobina e ione fluoruro è reversibile e quindi dal punto di vista dell'impostazione di uno studio cinetico occorre tenere in considerazione sia il processo di formazione che il processo di dissociazione del complesso, ciascuno dei quali è regolato da una propria costante cinetica: k_f (forward) e k_b (backward) rispettivamente.



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

$$\frac{d[mFe(III) \cdot F]}{dt} = k_f [mFe(III) \cdot H_2O] [F^-] - k_b [mFe(III) \cdot F] \quad (1)$$

L'integrazione della (1) porta ad ottenere l'equazione che dà concentrazione di complesso in funzione del tempo:

$$[mFe(III) \cdot F](t) = \frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b} [1 - e^{-(k_f F_0 + k_b)t}] \quad (2)$$

Dove m_0 indica la concentrazione iniziale di mioglobina ed F_0 la concentrazione iniziale di ione fluoruro. Per ottenere questa equazione si è assunto inoltre che la concentrazione dello ione fluoruro sia molto maggiore della concentrazione della mioglobina, pertanto la $[F^-]$ praticamente non varia durante la reazione e può essere approssimata alla concentrazione iniziale F_0 , questo implica che le vostre analisi saranno condotte in condizioni dello pseudo-primo ordine.

Monitorando per via spettrofotometrica la formazione del complesso e interpolando i dati sperimentali con un modello derivato dall'equazione (2) è possibile ottenere informazioni sulle singole costanti di velocità k_f e k_b , questo dà accesso anche ad una stima della costante di equilibrio perché $K_{eq} = k_f / k_b$.

Sebbene l'equazione (2) abbia questa forma:

$$y(t) = \Delta y (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (3)$$

Per il fitting è conveniente però usare un modello del tipo

$$y(t) = y_0 + \Delta y (1 - e^{-k_{obs}t}) \quad (4)$$

In cui è stata inserita la quantità y_0 per ragioni che saranno chiarite nella sezione 'Analisi dei dati'. In entrambe (3) e (4) sia k_{obs} che Δy dipendono dalla concentrazione iniziale (e praticamente costante) di ione fluoruro. In particolare la k_{obs} dipende linearmente dalla F_0 , infatti, $k_{obs} = k_f F_0 + k_b$. Pertanto determinando k_{obs} a diversi valori di F_0 si ottiene una serie di punti che sono interpolabili da una retta con pendenza k_f ed intercetta k_b . Con questi dati è possibile calcolare la K_{eq} .

Procedura sperimentale

La molecola d'acqua legata al ferro nella $mFe(III) \cdot H_2O$ può essere deprotonata a pH circa 9, questo genera una specie non più sensibile all'interazione con lo ione fluoruro. A pH acidi, invece la reazione di sostituzione è troppo rapida per essere monitorata agevolmente in laboratorio per via spettrofotometrica. E' quindi necessario operare in un intervallo di pH ristretto e nel nostro caso lavoreremo a pH 8.0 assicurato dall'uso di un tampone borato.

La sorgente di ione fluoruro sarà il KF. poiché sarà necessario studiare la cinetica a diverse concentrazioni iniziali di fluoruro è necessario mantenere costante la forza ionica della soluzione aggiungendo un altro sale che non interferisca con la determinazione delle costanti cinetiche e che sia molto meno affine di F^- per il $Fe(III)$, a questo scopo si può utilizzare il KCl.

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.

Per le letture di assorbanza sarà necessario predisporre delle cuvette contenenti un volume fisso di soluzione di mioglobina (480 μL) e volumi variabili di soluzioni di KF e KCl in modo che la somma di questi volumi sia costante (320 μL). In questo modo il volume totale in cella sarà di 800 μL , assumendo i volumi additivi, e la concentrazione finale di ferrimioglobina sarà 78 μM . Una possibile serie di soluzioni è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Esempio di soluzioni utilizzabili per le misure cinetiche.

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

Letture di assorbanza

Le analisi spettroscopiche devono essere effettuate misurando l'assorbanza a 608 nm ogni 10 secondi per un tempo totale sufficiente ad osservare un plateau, indicativamente qualche minuto. Come riferimento può essere usato un bianco costituito acqua milliQ visto che a 608 nm il borato ed i sali utilizzati non assorbono.

Per le misure di assorbanza è necessario inserire in cuvetta la soluzione di KF immediatamente prima dell'inizio della cinetica mentre il resto delle soluzioni possono essere inserite in anticipo.

Analisi dei dati

L'analisi dei dati richiede l'interpolazione della curva ottenuta per ogni singola cinetica (cioè quelle ottenute ad ogni concentrazione iniziale di F') secondo il modello costituito dall'equazione (4), il parametro rilevante è la k_{obs} . Per l'interpolazione può essere utilizzato SciDAVis (scaricabile gratuitamente da <https://sourceforge.net/projects/scidavis/>) o qualunque altro programma di fitting non lineare: Origin, SigmaPlot etc). La costruzione del grafico delle k_{obs} in funzione della F_0 dà come

pendenza la k_f e come intercetta la k_b . Per il fitting si può ricorrere ancora a SciDaVis o ad altro software come sopra.

E' il caso di osservare che poiché farete misure spettrofotometriche e a 608 nm assorbono sia la ferrimioglobina che il complesso, in ogni istante della reazione, l'assorbanza a 608 nm sarà la somma di due contributi secondo quanto segue:

$$A_{608}(t) = [mFe(III) \cdot H_2O] \epsilon^m + [mFe(III) \cdot F] \epsilon^c$$

che, considerando il bilancio di massa e ponendo $\Delta \epsilon = \epsilon^c - \epsilon^m$ può essere scritta come:

$$A_{608}(t) = m_0 \epsilon^m + \Delta \epsilon [mFe(III) \cdot F]$$

Sostituendo la $[mFe(III) \cdot F]$ con il secondo membro della (2) si ottiene:

$$A_{608}(t) = m_0 \epsilon^m + \Delta \epsilon \frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b} [1 - e^{-(k_f F_0 + k_b)t}] \quad (5)$$

che è proprio una equazione della forma (4) e giustifica l'introduzione del termine y_0 in quest'ultima.

• *Determinazione termodinamica della K_{eq}*

Principio del metodo

Dopo che la reazione ha raggiunto l'equilibrio, il valore di assorbanza non cambia più con il tempo, avete visto che le cinetiche raggiungono un plateau, questo valore di plateau è dato da:

$$A_{608}(\infty) = m_0 \epsilon^m + \Delta \epsilon \frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b} = m_0 \epsilon^m + \Delta \epsilon \frac{K_{eq} F_0 m_0}{K_{eq} F_0 + 1} \quad (6)$$

che si ottiene facilmente dalla (5) considerandone il limite per tempi lunghi ($t \rightarrow \infty$). Questo valore dipende dalla concentrazione di equilibrio del complesso, infatti il termine

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

è proprio la concentrazione di equilibrio del complesso per valori dati di m_0 ed F_0 . Riportando in un diagramma i valori di $A_{608}(\infty)$ contro la concentrazione iniziale di ione fluoruro si può ottenere una curva, che di fatto è una curva di titolazione, da cui, per interpolazione, è possibile ricavare il valore di K_{eq} .

Procedura sperimentale

Per la costruzione della prima parte della curva si possono utilizzare i dati ottenuti nella prima parte dell'esperienza, occorre però acquisire alcuni altri dati a concentrazioni superiori di ione fluoruro come indicato in Tabella 2.

Tabella 2. Ulteriori soluzioni richieste per la costruzione della curva di titolazione.

Run	[F] (M)	Vol. MetMb sol.	Vol. KCl sol.	Vol. KF sol.
1	1.01×10^{-1}	480 μ L	118 μ L	202 μ L
2	1.27×10^{-1}	480 μ L	67 μ L	253 μ L
3	1.52×10^{-1}	480 μ L	16 μ L	304 μ L

Le soluzioni possono essere ottenute direttamente in cella, dopo aver atteso alcuni minuti per garantire il raggiungimento dell'equilibrio (non è necessario registrare la cinetica), si possono effettuare le letture di assorbanza a 608 nm.

Analisi dei dati

L'insieme dei dati di assorbanza di equilibrio ottenuti nella prima e nella seconda parte dell'esperienza devono essere riportati in un grafico in funzione della concentrazione di ione fluoruro. Il fitting dei dati usando un modello come il seguente:

$$y = y_0 + a \frac{K_X}{1 + K_X} \quad (7)$$

consente di ottenere il valore di K_{eq} . Osservate che si tratta, di fatto, della equazione (6) riscritta in termini semplificati.

Appendice

• Derivazione della equazione (2)

Dal bilancio di massa si ha che in ogni istante della reazione $m_0 = [mFe(III) \cdot H_2O] + [mFe(III) \cdot F]$ dove m_0 è la concentrazione iniziale di mioglobina.

Allo stesso modo vale $F_0 = [F^-] + [mFe(III) \cdot F]$ dove F_0 è la concentrazione iniziale di ione fluoruro.

In laboratorio userete un grande eccesso di ione fluoruro rispetto alla ferrimioglobina, in queste condizioni quest'ultima relazione si semplifica a:

$$F_0 \approx [F^-]$$

e la concentrazione di F^- diviene, di fatto, praticamente costante. In altre parole opererete in condizioni dello pseudo-primo ordine.

Tenendo presente queste considerazioni, l'equazione (1) può essere riscritta come:

$$\frac{d[mFe(III) \cdot F]}{dt} = k_f F_0 (m_0 - [mFe(III) \cdot F]) - k_b [mFe(III) \cdot F]$$

e riarrangiando:

$$\frac{d[mFe(III) \cdot F]}{dt} = -[(k_f F_0 + k_b)][mFe(III) \cdot F] + k_f F_0 m_0$$

L'integrazione di questa equazione differenziale dà la concentrazione del complesso in funzione del tempo. Separando le variabili si ottiene:

$$\frac{d[mFe(III) \cdot F]}{[(k_f F_0 + k_b)][mFe(III) \cdot F] - k_f F_0 m_0} = -dt \Rightarrow \frac{d[C]}{[C] - \alpha/\beta} = -\beta dt$$

dove si è posto per semplicità $[mFe(III) \cdot F] = [C]$; $\alpha = k_f F_0 m_0$; $\beta = k_f F_0 + k_b$. Con il cambiamento di variabile $[C] - \alpha/\beta = u$ l'ultima equazione si può riscrivere come

$$\frac{du}{u} = -\beta dt$$

che per integrazione dà: $\ln(u) + cost = -\beta t$ e quindi $u = Ae^{-\beta t}$ e sostituendo nuovamente le variabili abbiamo:

$$[C](t) = \frac{\alpha}{\beta} + Ae^{-\beta t}$$

Considerando che la condizione iniziale impone che la concentrazione di complesso sia nulla al tempo zero si ricava il valore di A che equivale esattamente a $-\alpha/\beta$, quindi

$$[C](t) = \frac{\alpha}{\beta} (1 - e^{-\beta t})$$

o, in forma più esplicita:

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

Rimane da osservare che il fattore

$$\frac{k_f F_0 m_0}{k_f F_0 + k_b}$$

non è nient'altro che il valore della concentrazione di equilibrio del complesso ad una data concentrazione di ione fluoruro ed una data concentrazione iniziale di MetMb. Sostituendo $K_{eq} = k_f/k_b$ si ottiene:

$$[C]_{eq} = \frac{K_{eq} F_0 m_0}{K_{eq} F_0 + 1}$$

e si verifica facilmente che questo valore rende il quoziente di reazione uguale alla K_{eq} , ovviamente sotto l'ipotesi che la $[F^-]_{eq} \approx F_0$ (largo eccesso di ione fluoruro) che è sicuramente verificata perché state lavorando proprio in queste condizioni.

• *Determinazione termodinamica di K_{eq}*

Generalmente per ottenere informazioni su una costante di binding, la nostra costante di equilibrio è una costante di binding, si ricorre alla costruzione di una curva di titolazione. Questo prevede di aggiungere quantità crescenti di titolante (il legante) ad una concentrazione fissa di recettore e di determinare (ad esempio per via spettrofotometrica) la quantità di complesso formato ad ogni aggiunta di titolante. Questo è quello che avete fatto nella prima e seconda parte dell'esperienza. Nella prima parte avete anche osservato la cinetica di complessazione, nella seconda avete solo determinato la concentrazione del complesso.

Nella costruzione di una curva di titolazione è importante saper esprimere, in modo formale, il rapporto tra la concentrazione di complesso formato rispetto alla concentrazione totale del recettore ad una certa concentrazione di titolante; cioè, in sostanza, la stechiometria di complessazione. Nel nostro caso la stechiometria è 1:1 e la concentrazione totale di recettore è m_0 . Quindi siamo interessati a questa quantità:

$$\phi = \frac{[mFe(III) \cdot F]}{m_0} = \frac{[mFe(III) \cdot F]}{[mFe(III) \cdot F] + [mFe(III) \cdot H_2O]}$$

Dividendo numeratore e denominatore per $[mFe(III) \cdot H_2O][F_0]$ si ottiene

$$\phi = \frac{K_{eq}[F_0]}{K_{eq}[F_0] + 1}$$

e quindi la concentrazione totale di complesso sarà:

$$[mFe(III) \cdot F] = m_0 \phi = m_0 \frac{K_{eq}[F_0]}{K_{eq}[F_0] + 1}$$

Se si analizza il sistema per via spettrofotometrica si potrà misurare l'assorbanza del complesso ad una determinata lunghezza d'onda. Se però anche il recettore libero assorbe a quella lunghezza d'onda, l'assorbanza totale misurata sarà la somma dei due contributi.

$$A_{608} = [mFe(III) \cdot H_2O] \epsilon^m + [mFe(III) \cdot F] \epsilon^c$$

Considerando il bilancio di massa per la MetMb $m_0 = [mFe(III) \cdot H_2O] + [mFe(III) \cdot F]$ si arriva ancora, anche se per altra via, alla (6).

$$A_{608} = m_0 \epsilon^m + \Delta \epsilon \frac{K_{eq} F_0 m_0}{K_{eq} F_0 + 1}$$

Che può essere usata per l'interpolazione dei dati sperimentali al fine di ottenere il valore di K_{eq} .

• *Cosa succede se le cinetiche vengono monitorate con un certo ritardo?*

Può capitare, anzi è sempre così, che il monitoraggio di una cinetica inizi con un certo ritardo, in genere trascurabile, rispetto all'inizio della reazione da monitorare, cioè la scala dei tempi della reazione non coincide con la scala dei tempi di osservazione. Se l'obiettivo è ottenere informazioni sulla costante di velocità per interpolazione di tutta la cinetica un certo ritardo, purché non eccessivo, non costituisce un grosso problema. La questione è diversa se siamo invece interessati a determinare la velocità iniziale: la velocità iniziale senza ritardo è diversa dalla velocità iniziale determinata con ritardo.

Infatti, la k_{obs} che si determina è sempre la stessa, che ci sia o non ci sia ritardo perché il processo che si osserva è sempre lo stesso mentre la velocità di reazione diminuisce sempre di più mano a mano che la reazione progredisce.

Effetto di un ritardo sulla determinazione della costante di velocità

Come esempio considero il processo che interessa questa esperienza, ma il risultato vale in generale. Quando la reazione ha inizio, l'assorbanza dovuta alla formazione del prodotto varia in questo modo: $A(t) = A_0 + \Delta A (1 - e^{-k_{obs}t})$. All'inizio della reazione $A(t=0) = A_0$ è l'assorbanza dovuta al reagente, alla fine della reazione il valore di assorbanza è: $A(\infty) = A_0 + \Delta A$ e l'ampiezza del fenomeno è semplicemente ΔA . Supponiamo ora di iniziare a monitorare la reazione solamente dopo un certo tempo di ritardo τ e sia t' la nuova scala dei tempi di osservazione tale per cui $t' = t + \tau$.

In questa circostanza il valore iniziale di assorbanza è: $A(t'=0) = A(\tau)$, notate che questo è un numero, non una funzione, perché τ è un tempo ben definito. Il valore finale di assorbanza è sempre $A(\infty) = A_0 + \Delta A$, questo non può dipendere da quando abbiamo iniziato ad osservare la reazione ma solo da quanto prodotto si è formato alla fine. L'ampiezza del fenomeno però ora si è ridotta, non è più

ΔA ma $\Delta A - (A(\tau) - A_0) = \Delta A(\tau)$. Questo implica la variazione di assorbanza in funzione del tempo t' , tempo di osservazione, sia: $A(t') = A(\tau) + [\Delta A - (A(\tau) - A_0)](1 - e^{-k_{obs}t'})$ che ha la stessa forma della relazione da cui siamo partiti e quindi il fitting restituirà lo stesso valore di k_{obs} in entrambi i casi. Se però τ diventa troppo grande il termine in parentesi quadre diventa sempre più piccolo, questo rende il fitting poco accurato o addirittura impraticabile.

Effetto di un ritardo sulla determinazione della velocità iniziale

La velocità istantanea per una reazione monitorata senza ritardo iniziale è la derivata rispetto al tempo della $A(t) = A_0 + \Delta A(1 - e^{-k_{obs}t})$, la velocità iniziale è semplicemente il limite per $t \rightarrow 0$ di questa derivata e si trova quindi che $v_0 = \Delta A k_{obs}$. La velocità istantanea per una reazione monitorata con un ritardo iniziale τ è invece la derivata rispetto al tempo (t' in questo caso) della $A(t') = A(\tau) + [\Delta A - (A(\tau) - A_0)](1 - e^{-k_{obs}t'})$, la velocità iniziale è ancora il limite per $t' \rightarrow 0$ di questa derivata e si trova che se c'è un ritardo la $v_0 = \Delta A e^{-k_{obs}\tau} k_{obs}$ e i due valori chiaramente non coincidono.

Riferimenti

-
- 1) L'esperienza si basa sul seguente riferimento: Russo, S. O.; Hanania, G. I, H. *J. Chem. Educ.* **1990**, 67, 352-355.