

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2014

Etapa IV 15. 12. 2014

1. Definirea tarii legaturii ligand – receptor pe baza indexului de afinitate, prin intermediul vitezei de relaxare longitudinala selectiva.

Interactiunea dintre biomolecule mici (liganzi) si macromolecule (receptori), reprezinta un eveniment crucial in majoritatea proceselor biologice. Macromoleculele biologice au o flexibilitate si abilitate considerabila in formarea de complexi cu diversi bioliganzi, avand o semnificatie chimica si biologica diferita. In sisteme mari, organizate, precum celulele si organismele, clase specifice de biomacromolecule sunt implicate in procese de recunoastere, interactiune si transport al unor bioliganzi mici. Aceste interactiuni dintre moleculele bioactive (liganzi, receptori) sunt esentiale in definirea rolului biologic al macromoleculelor precum si pentru activarea unor procese chimice specifice, deoarece biomolecule precum hormonii medicamentele sau poluantii pot induce reactii chimice diferite in biomacromolecule. In literaturile de specialitate, studiul interactiunilor la nivel molecular a fost abordat printr-o multitudine de metode spectroscopice si ne-spectroscopice. In cele ce urmeaza vom prezenta si exemplifica o metoda experimentală [1,2], bazata pe o analiza a datelor de relaxare magnetica nucleara, metoda ce permite investigarea globala a procesului de interactiune ce apare intre un bioligand si un receptor macromolecular. In acest sens se defineste un parametru numit “index de afinitate” $(A)_L^T$, parametru legat de taria tuturor interactiunilor specifice si/sau ne-specifice prezente in sistem. Acest parametru calculat la temperatura T si concentratia constanta de ligand L, caracterizeaza procesul de recunoastere moleculara dintre liganzi si macromolecule. Acest parametru poate fi calculat in sisteme dominate de un schimb chimic rapid al moleculelor de ligand intre starea libera si starea legata de macromolecula. Aceasta situatie este in general caracteristica proceselor de recunoastere ligand – bioreceptor.

Teorie

In cazul interactiunilor multispin caracteristice sistemelor complexe de biomolecule, viteza de relaxare spin retea “neselectiva”, R_1^{ns} a unui nucleu i care interactioneaza cu j nuclee vecine si viteza “selectiva” R_1^{sel} obtinuta prin excitarea nucleului i , in timp ce nucleele j sunt in echilibru termic, au urmatoarele expresii [3]:

$$R_1^{ns} = \frac{1}{10} \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left[\frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{12\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} \right] \quad (1)$$

$$R_1^{sel} = \frac{1}{10} \frac{\gamma_H^4 \hbar^2}{r_{ij}^6} \left[\frac{3\tau_c}{1 + \omega_H^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_H^2 \tau_c^2} + \tau_c \right] \quad (2)$$

in care simbolurile $\gamma_H, \hbar, r_{ij}, \tau_c$ si ω_H au sensul lor usual [3]. Ecuatiile (1) si (2) indica existenta a doua regimuri de miscare si anume: **a)** o miscare de reorientare moleculara rapida, tipica pentru ligandul aflat in stare libera, ($\omega_H \tau_c \ll 1$) si pentru care $R_1^{ns} > R_1^{sel}$ respectiv **b)** o miscare lenta tipica ligandului legat de macromolecula, ($\omega_H \tau_c \gg 1$) si pentru care $R_1^{sel} > R_1^{ns}$. Deoarece parametrul RMN al ligandului cel mai afectat

de modificarile survenite in dinamica moleculara este R_1^{sel} , acesta va fi utilizat in vederea obtinerii de informatii privind interactiunea ligand (L) – macromolecula (M). In conditiile unui schimb chimic rapid intre starea legata si cea libera, R_1^{sel} se exprima prin relatia

$$R_{1obs}^{sel} = \chi_f R_{1f}^{sel} + \chi_b R_{1b}^{sel} \quad (3)$$

unde R_{1obs}^{sel} reprezinta viteza de relaxare selectiva determinata experimental, R_{1f}^{sel} si R_{1b}^{sel} sunt vitezele de relaxare selective spin retea ale ligandului aflat in stare libera si stare legata, iar χ_f si χ_b sunt fractiunile de ligand liber respectiv legat de macromolecula. Considerand un echilibru ligand macromolecula simplu, $M+L \leftrightarrow ML$, acesta va fi caracterizat de catre o constanta de echilibru $K = [ML] / [M][L]$. Daca se lucreaza cu o concentratie de ligand in exces fata de cea a macromoleculei ($[L] \gg [M]$), se poate deduce ca:

$$\Delta R_1^{sel} = R_{1obs}^{sel} - R_{1f}^{sel} = \frac{K(R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel})}{(1 + K[L])} [M_0] \quad (4)$$

unde $[M_0]$ este concentratia initiala a macromoleculei. Dupa cum rezulta din ec.(4), reprezentarea grafica a lui ΔR_1^{sel} functie de $[M_0]$ va fi o dreapta ce trece prin origine si a carei panta este

$$(A)_L^T = \frac{K(R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel})}{1 + [L]} \quad (5)$$

Parametrul $(A)_L^T$ este denumit **“index de afinitate”** si este o constanta daca temperatura T si concentratia de ligand [L] sunt specificate. Indicele de afinitate se calculeaza din variatia vitezei de relaxare selectiva a unui singur proton, in ipoteza unei miscari isotrope a moleculei de ligand. Totusi, chiar si in cazul moleculelor mici de ligand, pot exista diferente in dinamica diferitelor portiuni ale moleculei. Normalizarea lui ΔR_1^{sel} cu R_{1f}^{sel} , elimina efectele diferentelor de dinamica moleculara asupra protonilor situati in diverse zone ale moleculei de ligand. Si in acest caz, dependentia lui $\Delta R_{1N}^{sel} = \Delta R_1^{sel} / R_{1f}^{sel}$ de concentratia $[M_0]$ a macromoleculei va fi o dreapta ce trece prin origine si are drept panta:

$$(A^N)_L^T = \frac{(A)_L^T}{R_{1f}^{sel}} \quad (6)$$

$(A^N)_L^T$ este si ea o constanta la o temperatura si o concentratie de ligand fixa si este definita ca **“index de afinitate normalizat”**, ($\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$).

Rezultate experimentale

Procesul de interactiune dintre albumina serica umana (HSA) si o serie de trei agenti anti-inflamatori (ibuprofen, tolmetin si naproxen), a fost monitorizat prin intermediul masuratorilor vitezelor de relaxare longitudinala selectiva si neselectiva, precum si prin determinarea indicelui de afinitate normalizat $(A^N)_L^T$. Vitezele de relaxare s-au masurat prin intermediul secventei “revenirii din inversie” $(180^\circ - \tau - 90^\circ - t)_n$. Pulsul selectiv de 180° s-a realizat prin intermediul unui puls “soft” modulat gaussian ($\Delta t=40\text{ms}$, putere 51 dB). In toate cazurile investigate, concentratia bioligandului a fost mentinuta constanta la 18 mM, temperatura la $T= 298 \text{ K}$, iar concentratia de HSA a variat intre 0 si 0.12 mM.

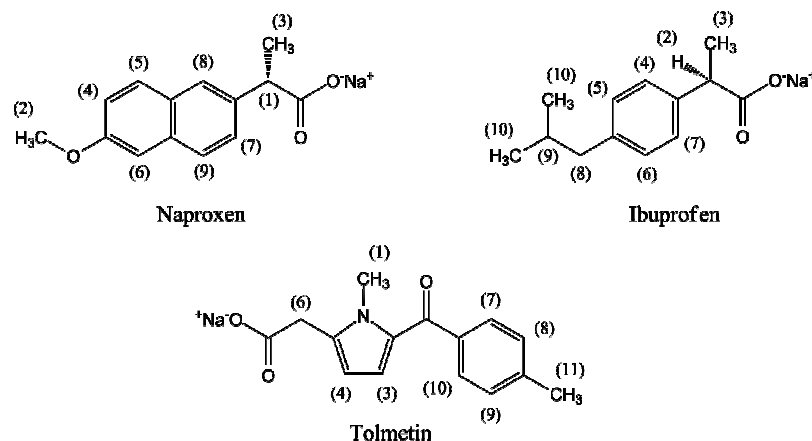


Figura 1 Structura moleculara si numerotarea protonilor bioliganzilor investigati

Spre exemplificare, in tabelul 1 sunt prezentate valorile R_1^{sel} si R_1^{ns} pentru protonii H(4), H(5) si H(6) ai naproxenului (Fig.1), functie de concentratia HSA.

Tabel 1. R_1^{sel} si R_1^{ns} ale protonilor H(4), H(5) si H(6) ai naproxenului, in prezenta unei concentratii variabile de albumina serica umana (HSA)

[HSA] mM	R_1^{sel} (s^{-1}) H(4)	R_1^{ns} (s^{-1}) H(4)	R_1^{sel} (s^{-1}) H(5)	R_1^{ns} (s^{-1}) H(5)	R_1^{sel} (s^{-1}) H(6)	R_1^{ns} (s^{-1}) H(6)
0	0.284	0.381	0.382	0.540	0.491	0.695
0.02	0.982	0.523	1.192	0.628	1.392	0.685
0.04	1.692	0.593	1.842	0.689	2.237	0.737
0.06	2.481	0.670	2.583	0.747	3.205	0.774
0.09	3.521	0.701	3.636	0.759	4.405	0.764
0.12	4.405	0.712	4.651	0.751	5.714	0.752

Din tabel rezulta ca in absenta albuminei, R_1^{ns} este mai mare decat R_1^{sel} . Acest rezultat este valabil pentru toti bioliganzii investigati si confirma ca acesti bioliganzi sunt supusi unui proces rapid de reorientare moleculara in solutie, in absenta albuminei. In schimb, odata cu cresterea concentratiei de albumina, R_1^{ns} ramane practic constanta in timp ce R_1^{sel} creste semnificativ. Aceasta amplificare a vitezei de relaxare longitudinala selectiva releva existenta unei contributii majore din partea fractiunii de ligand legat si sugereaza prezenta unei interactiuni semnificative intre bioligand si macromolecula. Pentru evaluarea tarii legaturii dintre molecula de bioligand si HSA, indexul de afinitate normalizat, obtinut din datele de relaxare a diferitilor protoni ai moleculei de bioligand a fost calculat din panta dreptei ce descrie amplificarea vitezei de relaxare selectiva a acelor protoni in functie de concentratia albuminei serice umane. In calculul indexului de afinitate normalizat am luat in considerare doar acei protoni care prezinta o amplificare substantiala a vitezei longitudinale de relaxare selective, precum cei apartinand ciclurilor aromatice sau gruparii pirol. Pentru exemplificare, prezentam in figurile 2, 3 si 4, reprezentarile grafice ale vitezei de relaxare selective normalizate ($\Delta R_N^{sel} = \Delta R^{sel} / R^{sel}$), pentru protonii tolmetinului, ibuprofenului respective naproxenului care sunt cei mai afectati de legarea de albumina serica umana.

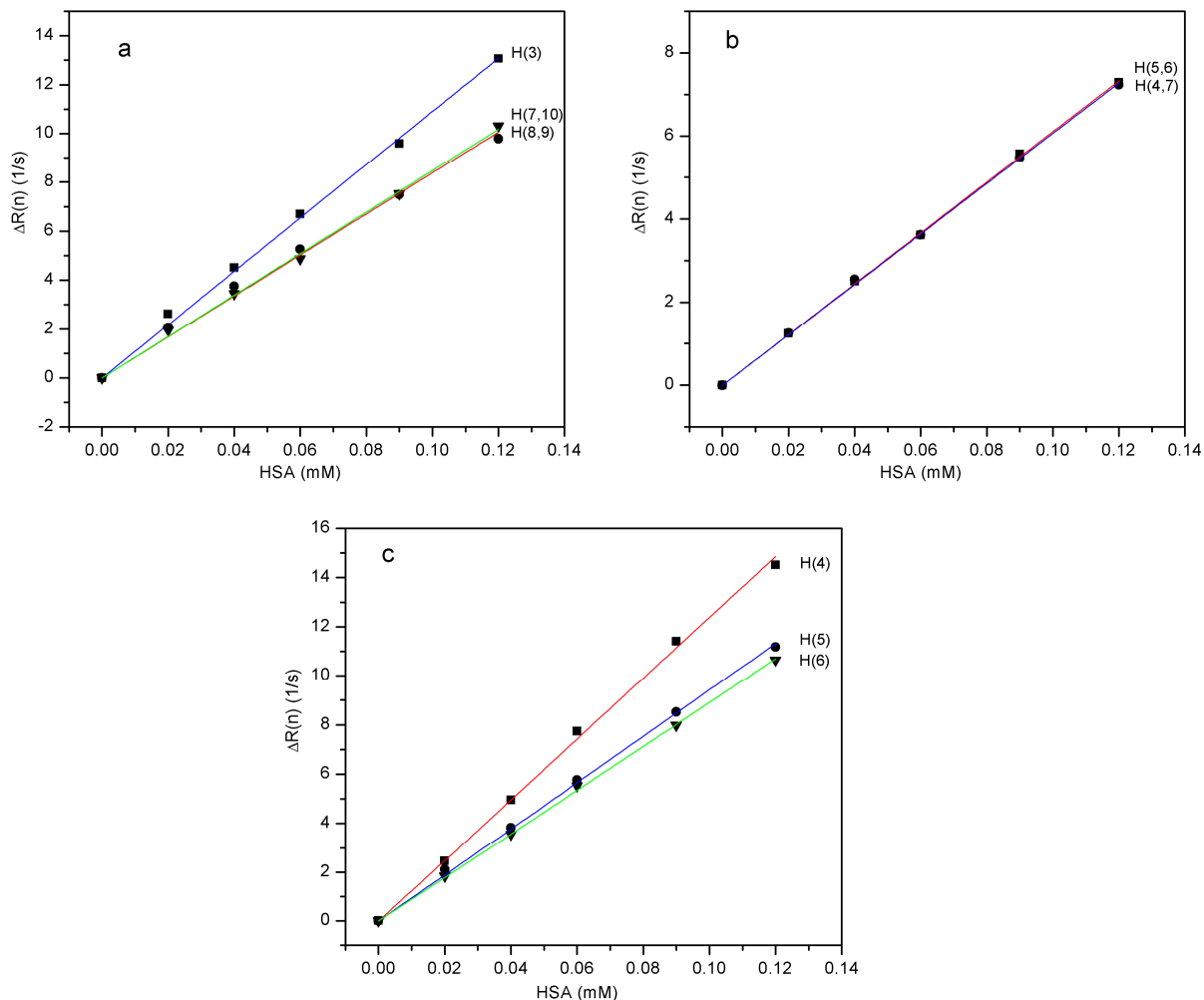


Figura 2 Dependenta variatiei relaxarii selective normalizate, $\Delta R^{\text{sel}}(n)$ pentru anumiti protoni ai:
a) Tolmetin, b) Ibuprofen, c) Naproxen, in functie de concentratia de HSA.

. Tabelul 2. prezinta rezultatele obtinute pentru indexul de afinitate normalizat, corespunzator protonilor din biomolecula, cei mai puternic restrictionati din punctual de vedere al mobilitatii lor, datorita legarii de albumina serica umana, precum si valoarea medie a acestuia pentru un anumit grup de protoni.

Tabel 2. Indecsi de afinitate normalizati, $(A^N)_L^Y$, calculati pentru anumiti protoni ai biomoleculelor investigate, impreuna cu valorile medii ale acestor indecsi $\langle (A^N)_L^Y \rangle$, pentru grupe specifice de protoni.

Sistemul investigat	# proton	$(A^N)_L^Y$ (dm^3M^{-1})	$\langle (A^N)_L^Y \rangle$ (dm^3M^{-1})
Tolmetin / HSA	H(3)	$109044,9 \pm 1418,8$	$102523,8 \pm 1696,2$
	H(4)	$96001,1 \pm 1973,6$	
	H(8,9)	$83636,1 \pm 1767$	$84202,8 \pm 1382,9$
	H(7,10)	$84769,6 \pm 998,8$	
Ibuprofen / HSA	H(4,7)	$60631,5 \pm 364,1$	$60848,5 \pm 328,6$
	H(5,6)	$61065,5 \pm 293,1$	
Naproxen / HSA	H(4)	$123794,3 \pm 1412,8$	$102393,2 \pm 916,6$
	H(5)	$94261,2 \pm 797,2$	
	H(6)	$89124,2 \pm 539,8$	
	H(8)	$70602,1 \pm 420,7$	

Se observa ca cea mai puternica afinitate fata de HSA o prezinta tolmetinul, urmat indeaproape de naproxen. Indexul de afinitate al ibuprofenului reprezinta aprox. 60% din cel al tolmetinului sau naproxenului, fiind astfel mult mai labil legat de HSA. Miscarea moleculara a protonilor gruparilor alifaticе (CH₃, CH₂ sau H) este mult mai putin restrictionata de legarea bioligandului de HSA. In acest sens, in tabelul 3, sunt prezentate valorile indecsilor de afinitate normalizati ale protonilor apartinand unor grupari alifaticе corespunzatoare celor trei biomolecule investigate.

Tabel 3. Indecsi de afinitate normalizati, $(A^N)_L^Y$, calculati pentru protonii gruparilor alifaticе ale biomoleculelor investigate.

Sistemul investigat	# proton	$(A^N)_L^Y$ (dm ³ M ⁻¹)
Tolmetin /HSA	H(1)	16182,6±364,6
	H(6)	14394,2±345,5
	H(11)	16340,0±265,1
Ibuprofen / HSA	H(3)	14077,3±100,9
	H(10)	17621,9±120,7
Naproxen / HSA	H(2)	12234,9±339,4
	H(3)	26755,9±379,1

Mentionam faptul ca in cazul ibuprofenului, protonul H(2) fiind apropiat de ciclul aromatic care se leaga puternic de albumina serica umana , mobilitatea acestuia este puternic restrictionata de catre acestea cat si de celelalte grupuri functionale din jurul acestuia. Din acest motiv indexul de afinitate normalizat are o valoare ridicata si anume $(A^N)_L^Y = 94504,9±464,2$ dm³M⁻¹. Exact acelasi comportament il prezinta protonul H(1) al naproxenului care wste caracterizat de catre un index de afinitate normalizat a carei valoare este $(A^N)_L^Y = 85613,2±403,7$ dm³M⁻¹. Comparand valorile indecsilor de afinitate normalizati raportati in tabelele 2 si 3, rezulta ca in general procesul de interactiune dintre albumina serica umana si un bioligand se realizeaza printr-o legatura necovalenta a albuminei cu ciclurile aromatice ale ligandului, gruparile alifaticе fiind mai putin afectate de aceasta interactiune. In cazul bioliganzilor investigate de noi, indecsii de afinitate normalizati, caracteristici gruparilor alifaticе sunt de cel putin 4 ori mai mici decat cei caracteristici ciclurilor aromatice sau gruparii pirol. In concluzie, indexul de afinitate normalizat, caracterizeaza afinitatea globala dintre un bioligand si o macromolecula. Calculul acestuia nu necesita cunoasterea *a priori* a numarului pozitiiilor de legare prezente pe suprafata macromoleculii sau a valorilor constantelor cinetice specifice . In particular, aceasta metodologie permite compararea tariei proceselor de interactiune ce implica o proteina (albumina serica umana) si diversi bioliganzi

2. Implementarea unui model teoretic privind legarea competitiva a doi liganzi de o macromolecula

Inainte de a analiza diferite abordari ale legarii competitive a doi liganzi de o proteina, vom trece pe scurt in revista, modelul de legare a unui ligand de o proteina. Afinitatea si capacitatea de legare a bioligandului poate fi descrisa prin intermediul constantei de disociere a complexului molecular format si a numarului pozitiiilor de legare de pe proteina.

a) *Complexare necompetitiva*

In cazul unei stoichiometрии 1:1, compozitia solutiei se defineste ca $[P]_0 = [P] + [PL]$, respectiv $[L]_0 = [L] + [PL]$, unde $[L]_0$ si $[P]_0$ sunt concentratiile totale de ligand respective proteina. Solutia aflata in echilibru termodinamic este caracterizata de o constanta de disociere K_D definite ca $K_D = [P][L]/[PL]$ unde $[P]$ si $[L]$ sunt concentratiile speciilor libere de proteina respective ligand. Metoda experimentală utilizata pentru monitorizarea legarii unui ligand de o proteina se bazeaza pe determinarea vitezei de relaxare longitudinală selectivă spin-retea ($R_{1b}^{sel} = 1/T_1^{sel}$), a protonilor ligandului. In cazul existentei unui schimb rapid a moleculelor de ligand între starea liberă și cea legată, R_{1b}^{sel} se exprima prin intermediul relatiei (3). Dacă se lucrează cu o concentrație de ligand în exces față de cea a proteinei, adică $[L] \cong [L]_0$ și $[P]_0 = \text{constant}$, titrand cu ligandul L, atunci fitarea datelor experimentale cu ec.(4) permite determinarea lui R_{1b}^{sel} și $K_D = 1/K$. Dacă nu se lucrează cu ligand în exces, expresia exactă cu care se vor fi datele experimentale are forma:

$$(R_{1obs}^{sel} - R_{1f}^{sel}) / (R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel}) = \alpha - \sqrt{(\alpha^2 - \beta)} \quad (7)$$

unde $\alpha = ([P]_0 + [L]_0 + K_D) / (2[L]_0)$ și $\beta = [P]_0 / [L]_0$, parametrii de fit fiind R_{1b}^{sel} și K_D . Dacă se considera că ligandul poate lega de oricare din cele n poziții independente și identice de legare de pe proteina P, în expresia (7) se face substituția $[P]_0 = nC_p$, unde C_p este concentrația totală de proteina. Fitarea datelor experimentale cu ec.(7) va conține în acest caz și parametrul de fit n .

b) *Complexare competitiva*

Spre deosebire de interacțiunea dintre un ligand și o proteina, co-administrarea simultană a doi bioliganzi influențează parametrii de legare a acestora de proteina. Astfel, poate apărea o substituție la poziția de legare de pe proteina a unui ligand cu celălalt, dacă acesta are o afinitate mai ridicată față de proteina sau poate altera structura proteinei, conducând astfel la o modificare a afinității proteinei față de bioliganzi. Vom prezenta în continuare câteva moduri posibile de determinare a parametrilor specifici complexării competitive (K și n), pe baza determinărilor de viteză de relaxare longitudinală selectivă funcție de concentrația unui bioligand.

1b) Vom considera proteina P, având o concentrație constantă $[P]_0$. În soluția cu proteina se introduce ligandul L având o concentrație constantă $[L]_0$. Soluția rezultată se titrează cu ligandul competitor C, a cărui concentrație $[C]_0$ variază. Se monitorizează viteza de relaxare selectivă R_{1obs}^{sel} , a ligandului L, funcție de $[C]_0$. Dacă se lucrează în condițiile $[C]_0 \gg [P]_0$, după un calcul matematic laborios se obține:

$$(R_{1obs}^{sel} - R_{1f}^{sel}) / (R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel}) = \delta - \sqrt{\delta^2 - \gamma} \quad (8)$$

unde $\delta = ([P]_0 + [L]_0 + K_D + K_D[C]_0 / K_C) / (2[L]_0)$ iar $\gamma = [P]_0 / [L]_0$. Inițial, dintr-un experiment necompetitiv se determină R_{1b}^{sel} și K_D pentru ligandul L. Fitarea datelor experimentale cu ec.(8), permite determinarea constantei de disociere K_C , a ligandului competitiv C, în prezența ligandului L. Dacă se lucrează cu concentrațiile ambilor liganzi în exces ($[L]_0, [C]_0 \gg [P]_0$), ec. (8) se reduce la expresia:

$$(R_{1obs}^{sel} - R_{1f}^{sel}) / (R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel}) = [P]_0 / ([L]_0 + K_D + [C]_0 K_D / K_C) \quad (9)$$

2b) In cazul in care afinitatea celor doi liganzi fata de o proteina este foarte diferita, experimentul consta in titrarea solutiei de proteina ce contine o concentratie constanta de ligand ce leaga puternic (L1), cu un ligand ce leaga slab de proteina (L2). In prima etapa se determina R_{1b}^{sel} si $K_D(L2)$ pentru ligandul slab legat, printr-un experiment de legare necompetitiva. In etapa urmatoare se titreaza solutia ce contine $[P]_0$ si $[L1]$ constante, cu ligandul ce leaga slab (L2), monitorizandu-se $R_{1obs}^{sel}(L2)$ in functie de $[L2]$. Tratarea matematica a problemei conduce la o relatie identica cu ec. (4) si anume:

$$\left(\frac{R_{1obs}^{sel}(L2) - R_{1f}^{sel}(L2)}{R_{1b}^{sel}(L2) - R_{1f}^{sel}(L2)}\right) = \frac{[P]_f}{(K_D(L2) + [L2]_0)} \quad (10)$$

in care in loc de $[M_0]$ apare $[P]_f$ iar K reprezinta constanta de asociere ($K = 1/K_D(L2)$), a ligandului slab legat. $[P]_f$ reprezinta concentratia de proteina aflata in stare libera [4], dupa ce o fractiune din ea a fost complexata cu L1 si devine accesibila pentru complexarea cu L2. Vom avea deci $[P]_f = [P]_0 - [PL1]$. Expresia lui $[PL1]$ se deduce din definitia constantei de disociere a ligandului L1 si anume $K_D(L1) = [P]_f[L1]_f / [PL1]$. Dupa un scurt calcul matematic si rezolvarea unei ecuatii de grad doi se obtine:

$$[PL1] = \left(a - \sqrt{a^2 - 4[P]_0[L1]_0}\right) / 2 \quad \text{cu} \quad a = [P]_0 + [L1]_0 + K_D(L1) \quad (11)$$

Expresia lui $[P]_f = [P]_0 - [PL1]$ se introduce in ec. (10) si din dependenta lui $R_{1obs}^{sel}(L2)$ functie de $[L2]$, singurul parametru de fit va fi $K_D(L1)$.

3b) In cazul in care se investigheaza pozitiile de legare cu afinitate scazuta de pe o proteina, pentru doi liganzi, aceste pozitii sunt clasificate drept **pozitii specifice** respectiv **nespecifice sau mutuale** pentru fiecare ligand in parte [5]. Procesul de legare competitiva se produce doar pentru pozitiile de legare mutuale, care au un impact semnificativ asupra interactiunii dintre un ligand si proteina. Elaborarea modelului matematic de legare competitiva cu afinitate scazuta a doi liganzi (A si B) de o proteina P, implica urmatoarele ipoteze: a) toate pozitiile de legare de pe proteina sunt independente, b) reactia $PA + B \leftrightarrow PB + A$ este reversibila, c) constanta de disociere a ligandului A, ($K_{DA} = [P][A]/[PA]$), este diferita de cea a ligandului B, ($K_{DB} = [P][B]/[PB]$), d) exista n_A si n_B pozitii de legare pe proteina pentru ligandul A si B, precum si n_M pozitii mutuale. Numarul total al pozitiiilor de legare de pe proteina va fi $n = n_A + n_B - n_M$. Daca tinem cont de lea conservarii maselor :

$$C_A = [A] + [PA]; \quad C_B = [B] + [PB]; \quad nC_P = [P] + [PA] + [PB] \quad (12)$$

unde $[PA]$ si $[A]$, $[PB]$ si $[B]$ reprezinta concentratiile ligandului A si B, legat respective liber. Iar C_P , C_A si C_B sunt concentratiile totale ale proteinei respective ale ligandului A si B. Definind fractiile molare de ligand legat ca $\chi_{bA} = [PA]/C_A$ si $\chi_{bB} = [PB]/C_B$, pe baza relatiei (3) se deduce ca $\chi_b = \left(R_{1obs}^{sel} - R_{1f}^{sel}\right) / \left(R_{1b}^{sel} - R_{1f}^{sel}\right)$ functie de viteza de relaxare selective observata. Tinand cont de definitiile constantelor de disociere si de relatiile anterioare se deduce o ecuatie de gradul III de tipul:

$$\chi_{bA}^3 + a\chi_{bA}^2 + b\chi_{bA} + c = 0 \quad (13)$$

$$\text{cu} \quad a = \frac{1}{K-1} - 1 + \frac{KC_B}{(K-1)C_A} - \frac{K_{DA}}{C_A} - \frac{nC_P}{C_A} \quad b = \frac{nC_P}{C_A} - \frac{1}{K-1} \left(\frac{nC_P}{C_A} + \frac{KC_B}{C_A} + \frac{K_{DA}}{C_A} + 1 \right)$$

$$c = \frac{nC_P}{C_A(K-1)} \quad K = \frac{K_{DA}}{K_{DB}} \quad (14)$$

Rezolvand analitic ec.(13), obtinem doua ecuatii reale si anume:

$$\begin{aligned} \chi_{bA}(1) &= \frac{2}{3} \sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{2\pi + \theta}{3}\right) - \frac{a}{3} && \text{pentru } K_{DA} < K_{DB} \\ \chi_{bA}(2) &= \frac{2}{3} \sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{2\pi - \theta}{3}\right) - \frac{a}{3} && \text{pentru } K_{DA} > K_{DB} \end{aligned} \quad (15)$$

unde

$$\theta = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

Pentru a putea utilize acest model, se efectueaza un experiment de titrare mentinand C_p si C_B constant si variind C_A pentru a monitoriza dependenta lui χ_{bA} de C_A . Determinand din experimente de complexare anterioare, K_{DA} si K_{DB} , precum si numarul pozitiilor de legare n_A si n_B se poate obtine numarul total n si cel mutual n_M pentru cei doi liganzi precum si numarul pozitiilor specifice de legare $n_A - n_M$ respectiv $n_B - n_M$ pentru ligandul A si B prin fitarea curbei de titrare χ_{obs} functie de C_A cu ecuatia (15).

Bibliografie

- [1] C. Rossi, C. Bonechi, S. Martini, M. Ricci, G. Corbini, P. Corti, A. Donati, *Magn. Res. Chem.* **39**, 457 (2001).
- [2] S. Martini, C. Bonechi, G. Corbini, C. Rossi, *Chem. Phys. Lett.* **447**, 147 (2007)
- [3] M. Liu, J.C. Lindon, *Concepts in Magn. Res.* **8**, 161 (1996)
- [4] N. Salvi, R. Buratto, A. Bornet, S. Ulzega, I. R. ebollo, A. Angelini, C. Heinis, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11076 (2012)
- [5] G. Bai, Y. Cui, Y. Yang, C. Ye, M. Liu. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **38**, 588 (2005)

Director proiect,

