

# Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji kemijskih i fizikalnih procesa u supramolekulskim sustavima

---

Rinkovec, Tamara

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:057278>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Tamara Rinkovec**

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Kemijski odsjek  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Sveučilište u Zagrebu

**Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji  
kemijskih i fizikalnih procesa u supramolekulskim i  
biokemijskim sustavima**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Gordan Horvat

Zagreb, 2016.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:	15. lipnja 2016.
Datum predaje korigirane verzije Završnog rada:	12. rujna 2016.
Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:	23. rujna 2016.

Mentor rada: doc. dr. sc. Gordan Horvat

Potpis:

## Sadržaj

<b>§ Sažetak .....</b>	<b>iv</b>
<b>§ 1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
1.1. Kalorimetrija .....	1
1.2. Teorijski dio.....	3
<b>§ 2. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji fizikalnih i kemijskih procesa.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Kalorimetrijske metode.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Adijabatska kalorimetrija.....	5
2.1.2. Kondukcijska kalorimetrija.....	7
2.1.3. Kompenzacijska kalorimetrija .....	8
2.1.4. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) .....	9
2.1.5. Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC) .....	11
2.1.6. Mikrokalorimetrija .....	14
<b>2.2. Supramolekulska kemija .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji faznih prijelaza .....</b>	<b>16</b>
2.3.1. Fazni prijelazi.....	16
2.3.2. Fazni prijelazi u lipidnim dvoslojima i biološkim membranama .....	18
2.3.3. Primjena razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC) na fazne prijelaze u razrijeđenim otopinama lipida <sup>20</sup> .....	19
<b>2.4. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji stabilnosti proteina.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji molekularnog raspoznavanja.....</b>	<b>27</b>
2.5.1. Primjena izotermne titracijske kalorimetrije.....	29
<b>2.6. Primjena kalorimetrije na sustave molekule DNA .....</b>	<b>32</b>
2.6.1. Termodinamička karakterizacija interakcija između molekula DNA te proteina.....	33
<b>2.7. Primjena kalorimetrije u dizajnu lijekova .....</b>	<b>37</b>
<b>§ 3. Literaturna vrela .....</b>	<b>38</b>

## § Sažetak

Kalorimetrija je eksperimentalna metoda kojom je moguće izmjeriti toplinu tijekom kemijskog ili fizikalnog procesa. Cilj ovog rada je objasniti teorijsku osnovu kalorimetrijskih mjerenja te opisati najčešće korištene kalorimetrijske metode. Također, želi se pokazati opseg strukturnih i termodinamičkih karakteristika supramolekulskih i biokemijskih sustava do kojih je moguće doći na temelju eksperimentalnih podataka. Naglasak ovog rada je na praktičnoj primjeni kalorimetrijskih mjerenja u svrhu opisa procesa uzrokovanih supramolekulskim, odnosno nekovalentnim interakcijama, budući da su te interakcije osnova i većine biokemijskih procesa u kojima je bitan proces molekuskog prepoznavanja.

Kalorimetrijskim metodama moguće je okarakterizirati i fizikalne procese koji se zbivaju u biološkim sustavima. Jedan od tih procesa je fazna transformacija lipidnih dvosloja, koji služe kao modelni sustavi bioloških membrana. Također, kalorimetrija je pogodna metoda za određivanje uvjeta pri kojima molekule proteina zadržavaju svoju nativnu konformaciju, odnosno za termodinamičku karakterizaciju procesa denaturacije proteina. Primjenom kalorimetrije stječe se uvid u termodinamičke karakteristike supramolekulskih veznih interakcija između makromolekula i različitih liganada, odnosno međusobnog vezanja više makromolekula kao što je to slučaj kod interakcija proteina i molekule DNA. Osim što omogućuju termodinamičku karakterizaciju, kalorimetrijska mjerenja omogućuju i razumijevanje mehanizama procesa molekuskog prepoznavanja u supramolekulskim i biokemijskim sustavima. Uz poznavanje mehanizama navedenih procesa, moguće je dizajnirati ligande s takvim strukturnim karakteristikama koje omogućuju vezanje tih molekula na željeno vezno mjesto makromolekule. Takav postupak bitan je u farmakologiji prilikom razvoja novih lijekova koji se direktno vežu na molekule koje sudjeluju u biokemijskih procesima unutar organizma.

## § 1. Uvod

### 1.1. Kalorimetrija

Kemijska termodinamika je znanost koja se bavi proučavanjem utjecaja pretvorbe energije, te izmjene energije između sustava i okoline na kemijske procese u sustavu. Sustav je makroskopski dio svemira čija su svojstva od posebnog interesa, dok svi dijelovi svemira koji mogu interagirati sa sustavom čine okolinu.<sup>1</sup> Proučavanjem kemijskih reakcija i raznih fizikalnih procesa uočeno je da su te pojave gotovo uvijek popraćene toplinskim efektom. Eksperimentalna metoda koja mjeri toplinu izmijenjenu između sustava i okoline tijekom kemijskog ili fizikalnog procesa naziva se kalorimetrija. Pojam kalorimetrija dolazi od latinske riječi *calor* što znači toplina i grčke riječi *métron* što znači mjeriti, a slovi za jednu od najstarijih metoda fizikalne kemije. Razvojem znanosti, od 18. stoljeća pa do danas, kalorimetrijske metode postaju sve brojnije, specijaliziranije i preciznije.<sup>2,3</sup>

Instrument kojim se provode kalorimetrijska mjerenja naziva se kalorimetar. Kalorimetar omogućuje mjerenje energije prenesene između sustava i okoline u obliku topline, a ovisno o vrsti proučavanog procesa, vrsti uzorka i uvjetima mjerenja dolazi u raznim izvedbama. Kalorimetru se sastoji od kalorimetrijske ćelije u koju je smješten sustav u kojem se odvija proučavana transformacija, te od okoline koja je u fizičkom, odnosno termičkom kontaktu s kalorimetrijskom ćelijom, ali je funkcionalno odvojena od mjerenog sustava i ima poznatu i kontroliranu temperaturu. Iako postoji više vrsta podjela kalorimetara, najčešća je ona na adijabatske i izotermne. Kod adijabatskog kalorimetra nema izmjene topline između sustava i okoline, dok se kod izotermnog kalorimetra toplina nastoji u potpunosti i u što kraćem roku izmijeniti između sustava i okoline preko dija termnih stjenki kalorimetrijske ćelije.

Postoji nekoliko načina eksperimentalnog određivanja topline: mjerenjem promjene temperature sustava, određivanjem energije potrebne da bi se kompenzirala toplina promatranog procesa i prijenosom topline između sustava i okoline preko točno definirano kondukcijskog puta. Ovisno o načinu mjerenja topline postoje i odgovarajuće izvedbe kalorimetara. U adijabatskom kalorimetru mjeri se promjena temperature sustava iz koje se

računa izmijenjena toplina, kod kondukcijskih kalorimetara mjeri se toplinska snaga na temelju toka topline stvorene unutar reakcijske ćelije (izmijenjena toplina dobije se integriranjem toplinske snage u vremenu), dok se kod kompenzacijskih kalorimetara mjeri količina topline potrebna da se kompenzira toplinski efekt unutar reakcijske ćelije kalorimetra.<sup>2,4</sup>

Kalorimetrijske metode imaju široku primjenu. Budući da su fizikalni procesi i kemijske reakcije najčešće popraćeni promjenom topline, kalorimetrijskim mjerenjima moguće je termodinamički i kinetički okarakterizirati navedene promjene. Proučavani sustavi mogu biti izuzetno različiti, od makromolekula, biokemijskih sustava ili anorganskih sustava u čvrstom stanju. Cilj ovog rada je opisati najčešće korištene kalorimetrijske metode, objasniti do kojih informacija o sustavu je moguće doći na temelju eksperimentalnih podataka, te navesti primjenjivost tih metoda na ispitivanje raznih vrsta sustava. Budući da se u današnje vrijeme koristi cijeli niz različitih kalorimetrijskih metoda, njihova primjena biti će prikazana prema vrsti proučavanog procesa: fizikalni procesi (fazni prijelazi, kristalizacija), supramolekulske interakcije (molekularno raspoznavanje, afiniteti vezanja) te kemijske reakcije.

## 1.2. Teorijski dio

U termodinamici, ukupna energija sustava (zbroj kinetičke i potencijalne energije molekula u sustavu) naziva se unutrašnja energija,  $U$ . Unutrašnja energija je funkcija stanja što znači da ovisi samo o trenutnom stanju sustava, a ne i o putu kojim se u to stanje došlo. Prema prvom zakonu termodinamike (1.1) unutrašnja energija izoliranog sustava je konstantna, a promjena u unutrašnjoj energiji sustava može biti posljedica izmijenjene topline  $q$  ili izvršenog rada  $w$  okoline nad sustavom (1.2).

$$U = \text{konst.} \quad (1.1)$$

$$\Delta U = q + w \quad (1.2)$$

Ukoliko se sustavu pri konstantnom tlaku dovodi toplina može doći do povećanja volumena, te do negativnog volumnog rada okoline. Ukoliko se pretpostavi da je jedini oblik rada volumni ( $w = -p\Delta V$ ), pri čemu  $p$  označava tlak okoline, vrijedi da je izmijenjena toplina pri konstantnom tlaku jednaka:

$$q_p = \Delta U - w = \Delta U + p\Delta V \quad (p = \text{konst.}) \quad (1.3)$$

$$q_p = U_2 - U_1 + pV_2 - pV_1 = (U_2 + pV_2) - (U_1 + pV_1) \quad (1.4)$$

Uvede li se kao nova funkcija stanja entalpija,  $H$  za koju vrijedi:

$$H = U + pV \quad (1.5)$$

jednadžba (1.4) može se pojednostaviti na sljedeći način:

$$q_p = H_2 - H_1 = \Delta H \quad (1.6)$$

Iz jednadžbe (1.6) vidljivo je da je promjena entalpije jednaka izmijenjenoj toplini pri konstantnom tlaku.<sup>1,5</sup> Entalpija zatvorenog sustava je funkcija tri varijable: tlaka, temperature i dosega kemijske reakcije, pa je njen totalni diferencijal glasi:

$$dH = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p,\xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{p,T} d\xi + \left(\frac{\partial H}{\partial p}\right)_{T,\xi} dp \quad (1.7)$$

dok pri izobarnim uvjetima ( $p = \text{konst.}$ ) vrijedi:



$$dq = \left(\frac{\partial H}{\partial T}\right)_{p,\xi} dT + \left(\frac{\partial H}{\partial \xi}\right)_{p,T} d\xi \quad (1.8)$$

Reakcijska veličina,  $\Delta_r X$  odgovara parcijalnoj derivaciji veličine  $X$  po doseg reakcije pri konstantnim vrijednostima ostalih varijabli u totalnom diferencijalu:

$$\Delta_r X = \frac{\partial X}{\partial \xi} \quad (1.9)$$

Iz toga slijedi da je parcijalna derivacija entalpije po doseg reakcije pri konstantnom tlaku i temperaturi jednaka reakcijskoj entalpiji  $\Delta_r H$ .<sup>4</sup> Definira li se parcijalna derivacija entalpije po temperaturi pri konstantnom tlaku i sastavu kao izobarni toplinski kapacitet sustava,  $C_p$  prema jednadžbi (1.8) slijedi:

$$dq_p = C_p dT + \Delta_r H d\xi \quad (1.10)$$

Deriviranjem promjene topline u vremenu moguće je dobiti se izraz koji prikazuje vremensku ovisnost promjene topline:

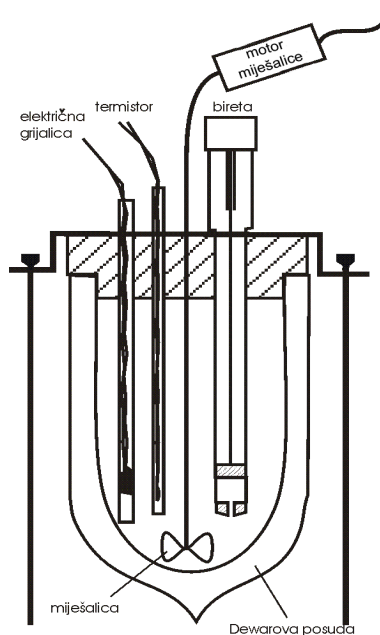
$$\frac{dq_p}{dt} = C_p \frac{dT}{dt} + \Delta_r H \frac{d\xi}{dt}. \quad (1.11)$$

## § 2. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji fizikalnih i kemijskih procesa

### 2.1. Kalorimetrijske metode

#### 2.1.1. Adijabatska kalorimetrija

Adijabatska kalorimetrija<sup>2,4</sup> je metoda kod koje se toplina koja je posljedica nekog procesa ili reakcije određuje mjerenjem promjene temperature sustava. Kako bi se što preciznije odredila promjena temperature uzrokovana promatranom reakcijom, izmjena topline između okoline i kalorimetrijske ćelije, odnosno nereakcijski toplinski efekti nastoje se smanjiti na što manju mjeru. Kod aktivnih adijabatskih kalorimetara izmjena topline između ćelije i okoline onemogućava se način da se okolina održava na približno jednakoj temperaturi kao što je unutrašnjost kalorimetra. To se postiže korištenjem grijaćih ili rashladnih elemenata. Kod pasivnih adijabatskih kalorimetara izmijenjena toplina računa se na temelju jednadžbi koje opisuju prijenos topline (npr. pomoću Newtonovog zakona prijenosa topline). Pasivni adijabatski kalorimetri koji se nalaze u okolini konstantne temperature nazivaju se izoperibolni, a jedan takav instrument shematski je prikazan na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz izoperibolnog reakcijskog kalorimetra.<sup>5</sup>

Kod idealnog adijabatskog kalorimetra nema izmjene topline između sustava i okoline:

$$q = 0 \quad (2.1)$$

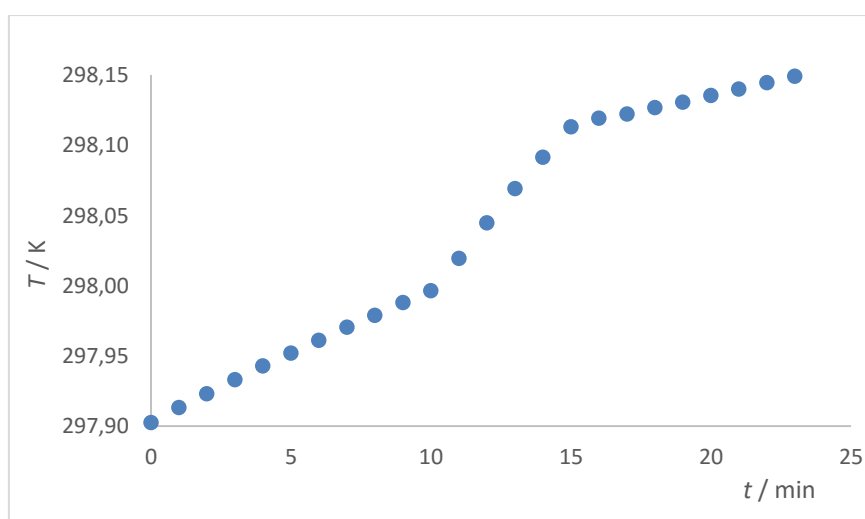
Uvrsti li se ta jednadžba u jednadžbu (1.10) dobiva se jednadžba (2.2) koja integriranjem, uz pretpostavku da su reakcijska entalpija i izobarni toplinski kapacitet neovisni o temperaturi, daje jednadžbu (2.3):

$$\Delta_r H d\xi = -C_p dT \quad (2.2)$$

$$\Delta H = \Delta_r H \Delta \xi = -C_p \Delta T \quad (2.3)$$

Iz tih jednadžbi vidljivo je da je mjerenjem temperature u adijabatskom kalorimetru moguće doći do promjene entalpije promatranog sustava. Za izračun promjene entalpije nužno je znati vrijednost toplinskog kapaciteta koji se određuje baždarenjem. Dva najčešće korištena načina baždarenja kalorimetra su električno i kemijsko baždarenje. Električno baždarenje provodi se pomoću grijalice pri čemu rad električne struje pri konstantom tlaku odgovara promjeni entalpije. Kemijsko baždarenje može se provesti izvođenjem kemijske reakcije za koju je poznata vrijednost reakcijske entalpije te ravnotežni doseg pri čemu se mjeri pripadajuća promjena temperature.

Osim toplinskog efekta do kojeg dolazi uslijed kemijske reakcije ili nekog fizikalnog procesa, u kalorimetru se javljaju dodatni toplinski efekti koji su posljedica miješanja ili mjerenja temperature sustava. Osjetljivost kalorimetra direktno ovisi o kvaliteti opisa nereakcijskih toplinskih efekata.

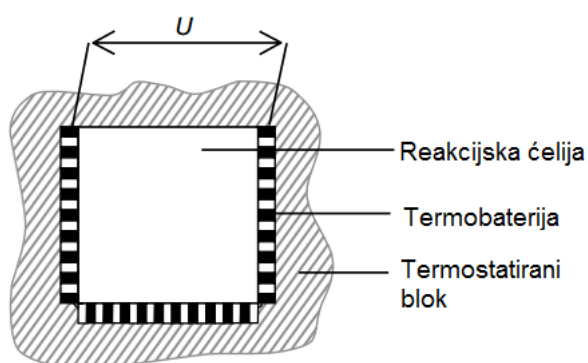


Slika 2. Termogram za reakciju u izoperibolnom kalorimetru.

Rezultat mjerenja u adijabatskoj kalorimetriji je termogram, odnosno ovisnost promjene temperature reakcijske ćelije kalorimetra u vremenu. Jedan takav termogram prikazan je na slici 2. Temperaturni skok moguće je odrediti Dickinsonovom ekstrapolacijskom metodom, Regnault – Pfaundlerovom integracijskom metodom ili iz ovisnosti toplinske snage o vremenu koja se računa prema jednadžbi (2.4). Ukupna promjena entalpije u tom slučaju dobiva se integriranjem izraza za toplinsku snagu.

$$P(t) = C_p \frac{dT(t)}{dt} \quad (2.4)$$

### 2.1.2. Kondukcijska kalorimetrija

Slika 3. Shematski prikaz principa rada izoternog kondukcijskog kalorimetra.<sup>6</sup>

U kondukcijskoj kalorimetriji<sup>6</sup> toplinska snaga mjeri se pomoću senzora koji su smješteni između reakcijske ćelije kalorimetra i termostatirane okoline. Na slici 3 prikazan je shematski prikaz kondukcijskog kalorimetra. Najčešća vrsta senzora korištena za mjerenje toka topline su termobaterije. Termobaterija je sastavljena od velikog broja termočlanaka, a napon na termobateriji je proporcionalan razlici u temperaturi toplinskog bloka i reakcijske ćelije. Izlazni napon se na termobateriji pretvara u toplinsku snagu množenjem s koeficijentom  $\varepsilon$  (jednadžba (2.5)) koji se određuje baždarenjem kalorimetra.

$$P(t) = \varepsilon \cdot U(t) \quad (2.5)$$

Ukupna toplina reakcije ili procesa dobiva se integriranjem toplinske snage reakcije  $P_R$  u ovisnosti o vremenu prema jednadžbi (2.6).

$$q = \int_{t_1}^{t_2} P_R(t) dt \quad (2.6)$$

Koja se računa iz izmjerene toplinske snage  $P$  pomoću Tianove jednadžbe:

$$P_R(t) = P(t) + \tau \cdot \frac{dP(t)}{dt} \quad (2.7)$$

gdje je  $\tau$  vremenska konstanta kalorimetra.

### 2.1.3. Kompenzacijska kalorimetrija

Kompenzacijska kalorimetrija<sup>4</sup> temelji se na principu kompenziranja vezane ili oslobođene topline unutar reakcijske ćelije kalorimetra pomoću električnih elemenata (grijalicom ili hladilom). Električni rad na kompenzacijskim elementima mora biti istog iznosa, ali suprotnog predznaka kao i promjena entalpije unutar reakcijske ćelije. Kompenzacijski elementi snage  $P_{komp}(t)$  održavaju tijekom reakcije konstantu temperaturu sustava. Definira li se  $P_{komp}(t)$  kao vremenska promjena entalpije iz jednadžbe (1.11) dobiva se:

$$P_{komp}(t) = C_p \frac{dT(t)}{dt} + \Delta_r H \frac{d\xi}{dt}, \quad (2.8)$$

koja u slučaju da nema izmjene topline između sustava i okoline (adijabatski kalorimetar) poprima oblik:

$$P_{komp}(t) = \Delta_r H \frac{d\xi}{dt}. \quad (2.9)$$

Iz jednadžbe (2.9) moguće je doći do promjene entalpije reakcije integriranjem vremenske ovisnosti kompenzacijske toplinske snage u vremenu trajanja reakcije:

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} \Delta_r H \frac{d\xi}{dt} dt = \int_{t_1}^{t_2} P_{komp}(t) dt. \quad (2.10)$$

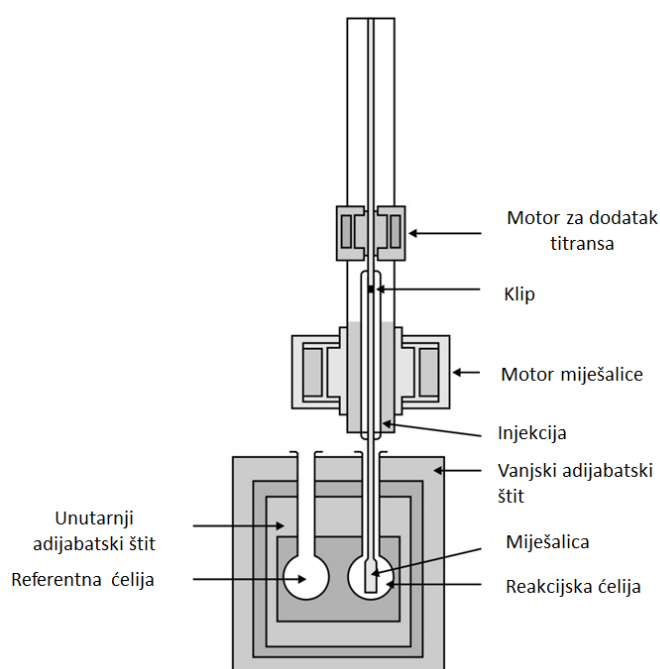
Osim adijabatskih kompenzacijskih kalorimetara postoje i izotermni kompenzacijski kalorimetri koji su najčešće dvojne izvedbe, što znači da imaju dvije ćelije – referentnu i reakcijsku. Uz obje ćelije nalaze se grijalice kojima se u ćelije unosi toplina poznatim snagama. Mjeri se razlika u temperaturi dviju ćelija te se ona nastoji u potpunosti smanjiti

mijenjanjem toplinske snage koja prolazi kroz reakcijsku ćeliju. Može se pokazati<sup>4</sup> da je u tom slučaju promjena entalpije reakcije jednaka ( $r$  -reakcijska,  $ref$  – referentna ćelija):

$$\Delta H = \int_{t_1}^{t_2} \Delta_r H \frac{d\xi}{dt} dt = \int_{t_1}^{t_2} (P_r(t) - P_{ref}(t)) dt \quad (2.11)$$

#### 2.1.4. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Izotermna titracijska kalorimetrija<sup>7,8</sup> je kalorimetrijska metoda kod koje se direktno mjeri promjena entalpije prilikom dodatka titransa u titrand tijekom titracije. Na temelju izmjerenih toplina u titraciji moguće je termodinamički karakterizirati interakcije molekula titransa i titranda. Najčešće se za provedbu kalorimetrijskih titracija koristi dvojni tip kompenzacijskog ili kondukcijskog kalorimetra. Kod takvih kalorimetara se u reakcijskoj ćeliji nalazi otopina titranda u koju se u određenim vremenskim razmacima dodaju alikvoti titransa pri čemu se mjeri toplina nakon svakog dodatka, a jedan takav instrument shematski je prikazan na slici 4. U referentnoj ćeliji nalazi se otapalo u kojem su otopljeni reaktanti.



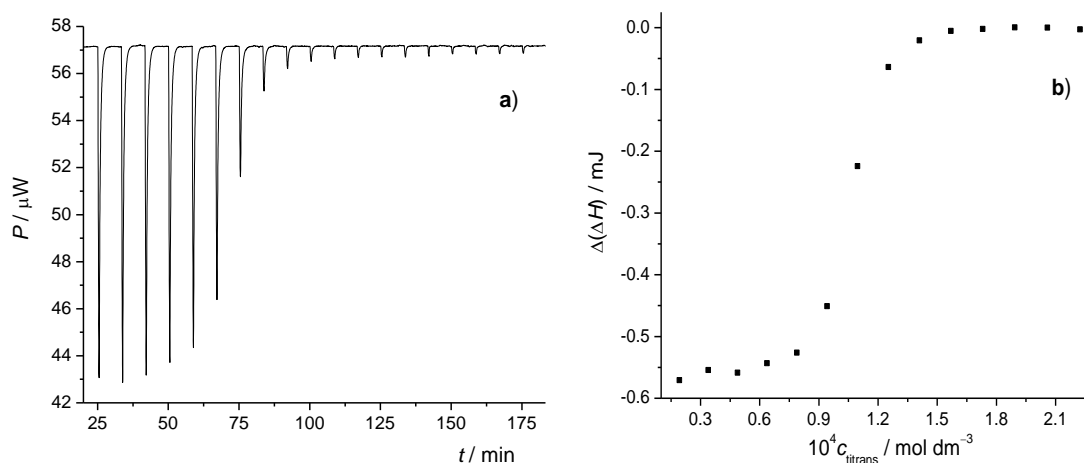
Slika 4. Shematski prikaz kalorimetra za izotermnu titracijsku kalorimetriju (ITC).<sup>9</sup>

Na slici 5a prikazani su podaci prikupljeni izotermnom reakcijskom kalorimetrijom, a površina ispod svakog signala odgovara toplini nakon  $i$ -tog dodatka, odnosno sukcesivnoj

promjeni entalpije između  $i-1$  i  $i$ -tog dodatka otopine liganda. Tijekom titracije se s dodatkom titransa smanjuje sukcesivna promjena doseg, a samim time su promjene u toplini sve manje. U području titracije u kojem nema reakcije jedine promjene u toplini odgovaraju toplinskim efektima razrjeđenja, miješanja i ostalim nereakcijskim učincima. Topline koji odgovaraju razrjeđenju i ostalim nespecifičnim efektima,  $\Delta q_{i,dil}$  i  $\Delta q_{i,ns}$  odrede se baždarnom titracijom liganda u puferskoj otopini.<sup>7</sup>

$$\Delta q_{i,app} = q_i - q_{i-1} \quad (2.12)$$

$$q_{i,app} = \Delta q_i + \Delta q_{i,dil} + \Delta q_{i,ns} \quad (2.13)$$



Slika 5. Rezultati mjerenja izotermnom titracijskom kalorimetrijom. a) ovisnost toplinske snage o vremenu tijekom izotermne kalorimetrijske titracije b) sukcesivne promjene entalpije za svaki dodatak.<sup>7</sup>

Izotermna titracijska kalorimetrija je metoda koja se često koristi za termodinamičku karakterizaciju reakcija kompleksiranja u otopini. Iz rezultata takvih titracija moguće je odrediti reakcijsku entalpiju kompleksiranja, konstantu ravnoteže vezanja, a zatim i reakcijsku entropiju:

$$\Delta_r G^\circ = -R \cdot T \cdot \ln K^\circ \quad (2.14)$$

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \cdot \Delta_r S^\circ \quad (2.15)$$

odnosno:

$$\Delta_r S^\circ = \frac{(\Delta_r H^\circ - \Delta_r G^\circ)}{T} \quad (2.16)$$

Ukoliko se izotermna reakcijska kalorimetrija provodi pri više različitih temperatura, moguće je odrediti temperaturnu ovisnost reakcijske entalpije iz koje se može izračunati temperaturna ovisnost izobarnog reakcijskog toplinskog kapaciteta,  $\Delta_r C_p$ . Također, na taj je način moguće odrediti kako o temperaturi ovise promjena slobodne Gibbsove energije,  $\Delta G$  i konstanta ravnoteže,  $K_A$ . Reakcijsku entalpiju moguće je odrediti iz temperaturne ovisnosti konstante ravnoteže stvaranja kompleksa, određenom nekom drugom analitičkom metodom, prema van't Hoffovoj jednadžbi:

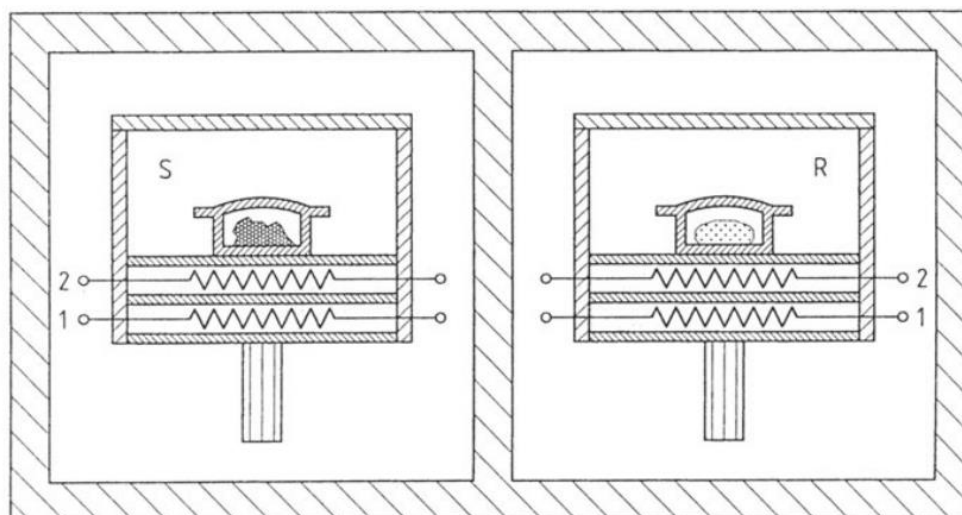
$$\int_{T_1}^{T_2} d \ln K_A = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta_r H}{RT^2} dT. \quad (2.17)$$

Mikroskopska interpretacija termodinamičkih reakcijskih veličina dobivenih iz ITC eksperimenata nije uvijek jednostavna. Vrijednosti  $\Delta_r G^\circ$ ,  $\Delta_r H^\circ$  i  $\Delta_r S^\circ$  nisu vezane isključivo za nastajanja interakcija između reaktanata u otopini, već uključuju i doprinose procesa kao što su konformacijske promjene molekula te desolvataciju reaktanata i solvataciju produkata.

### 2.1.5. Razlikovna pretražna kalorimetrija (DSC)

Razlikovna pretražna kalorimetrija<sup>1,10</sup> (DSC) je kalorimetrijska metoda kod koje se mjeri razlika toplinske snage između toplinske snage prenesene uzorku u odnosu na onu prenesenu referentnoj ćeliji u ovisnosti o temperaturi. Kalorimetar koji se koristi za ovakvu vrstu mjerenja dvojne je izvedbe, a može biti kondukcijskog ili kompenzacijskog tipa. Pojam razlikovna (engl. differential) odnosi se na činjenicu da se zbivanja unutar reakcijske ćelije uspoređuju s zbivanja unutar referentne ćelije u kojoj ne dolazi do fizikalne ili kemijske promjene. Pojam pretražna (engl. scanning) označava da se temperature uzorka i referentnog materijala konstantno povećavaju tijekom analize.





Slika 6. Shematski prikaz kompenzacijskog DSC kalorimetra tvrtke Perkin – Elmer Instrument. S prikazuje reakcijsku, a R prikazuje referentnu ćeliju, 1 je grijač, a 2 je termometar. Referentna i reakcijska ćelija su razdvojene, a svaka se nalazi u termostatiranom bloku.<sup>11</sup>

Ćelije u DSC kalorimetru se tijekom eksperimenta električki zagrijevaju konstantom brzinom. Temperatura  $T$  linearno se mijenja s vremenom prema formuli (2.18) u kojoj je  $T_0$  početna temperatura, a  $\alpha$  je brzina promjene temperature. Toplinske snage potrebne za održavanje iste temperature u reakcijskoj i referentnoj ćeliji tijekom analize kontrolira računalo.

$$T = T_0 + \alpha t \quad (2.18)$$

Kemijska reakcija ili fizikalni proces koji se događa u reakcijskoj ćeliji zahtjeva ukupni dotok topline  $q_p + q_{p,ex}$  pri čemu se prvi član odnosi na zagrijavanje uzorka referentnog toplinskog kapaciteta, a drugi član odgovara toplini potrebnoj za održavanje jednake temperature dvije ćelije. U DSC mjerenju toplina  $q_{p,ex}$  interpretira se kao promjena toplinskog kapaciteta uzorka tijekom temperaturnog pretraživanja:

$$dq_p + dq_{p,ex} = (C_p + C_{p,ex})dT \quad (2.19)$$

$$C_{p,ex} = \frac{dq_{p,ex}}{dT} = \frac{dq_{p,ex}}{\alpha dt} = \frac{P_{ex}}{\alpha} \quad (2.20)$$

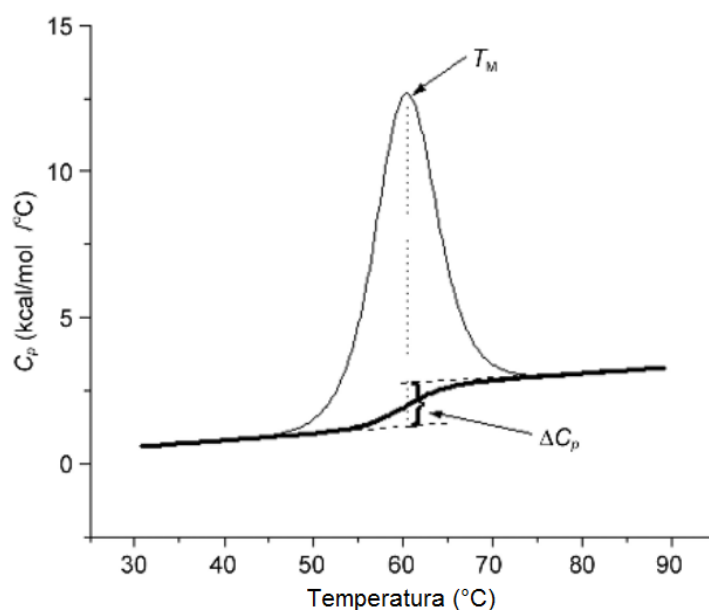
Pri čemu je  $P_{ex} = q_{p,ex}/\Delta t$  dodatna snaga električne struje potrebna za održavanje jednakih temperatura reakcijske i referentne ćelije. Rezultat razlikovne pretražne kalorimetrije naziva se termogram (slika 7) koji prikazuje ovisnost snage,  $P_{ex}$  ili toplinskog kapaciteta  $C_{p,ex}$  o temperaturi. Reakcijska entalpija dobiva se kao određeni integral funkcije toplinskog kapaciteta između temperatura  $T_1$  u kojoj započinje reakcija (proces) i  $T_2$  u kojoj završava.

$$\Delta H_{cal} = \int_{T_1}^{T_2} C_{p,ex} dT \quad (2.21)$$

Važno je naglasiti da je kalorimetrijski dobivena promjena entalpije neovisna o modelu na kojem se neki proces temelji. Iz ovisnosti  $C_p/T$  o  $T$  moguće je odrediti promjenu entropije promatranog sustava prema jednadžbi 2.22:

$$\Delta S_{cal} = \int \frac{C_{p,ex}}{T} dT. \quad (2.22)$$

Na temelju podataka za entalpiju i entropiju moguće je doći do promjene slobodne Gibbsove energije pri određenoj temperaturi prema jednadžbi 2.15.



Slika 7. Ovisnost toplinskog kapaciteta o temperaturi dobivena razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC).<sup>10</sup>

Osim što omogućava direktno mjerenje toplinskog kapaciteta, velika prednost metode razlikovne pretražne kalorimetrije je mala količina uzorka potrebnog za analizu.

### 2.1.6. Mikrokalorimetrija

Mikrokalorimetrija<sup>12-14</sup> je kalorimetrijska tehnika kod koje se koriste izuzetno osjetljivi mjerni instrumenti koji mogu mjeriti male promjene u toplini. Mikrokalorimetrijske izvedbe izotermne titracijske kalorimetrije i razlikovne pretražne kalorimetrije koriste se za mjerenje konformacijskih promjena, interakcija između molekula ili određivanje veznih afiniteta. Široku primjenu nalaze u dizajnu lijekova jer olakšavaju termodinamičku karakterizaciju i razvitak stabilnih terapeutika.<sup>13</sup>

## 2.2. Supramolekulska kemija

Pojave kao što su vezanje supstrata za enzim, lijeka za svoju *metu* ili izmjena signala između stanica ostvaruju se pomoću specifičnih interakcija koje omogućuju kinetičku ili termodinamičku kontrolu procesa.

Supramolekulska kemija interdisciplinarno je područje znanosti koje obuhvaća kemijska, fizikalna i biološka svojstva kompleksnijih kemijskih vrsta koje međusobne vezanje ostvaruju nekovalentnim interakcijama. Poznavanje i karakterizacija osnovnih principa takvih interakcija omogućuje dizajniranje sustava složenih struktura koji nisu biološkog podrijetla.

Razvoj supramolekulske kemije započeo je istraživanjem selektivnog vezanja kationa alkalijskih metala u biološke ili sintetske makrocikličke ili makropolicikličke spojeve kao što su krunasti eteri ili kriptandi. Nakon toga, započet je razvitak područja molekularnog raspoznavanja koje uključuje interakciju različitih vrsta molekula receptora sa supstratima na temelju elektrostatskih interakcija, vodikovih veza, van der Waalsovih interakcija te interakcija donor-akceptor. Budući da se većina biokemijskih reakcija odvija upravo na temelju nekovalentnih interakcija, supramolekulska se kemija iznimno brzo razvija.<sup>15</sup>

## 2.3. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji faznih prijelaza

### 2.3.1. Fazni prijelazi

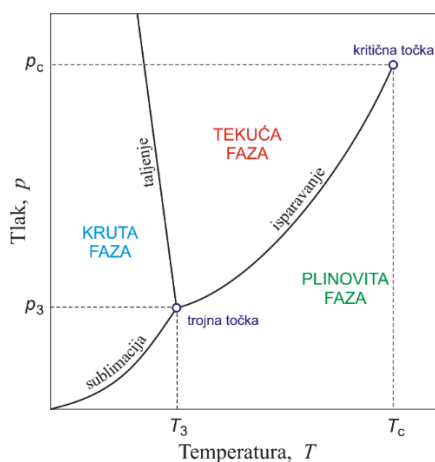
Faza je homogeni dio nekog heterogenog sustava tvari koji u cijelom području ima jednak kemijski sastav i fizikalna svojstva. Fazni prijelaz je spontani prijelaz jedne faze u drugu koji se događa pri karakterističnoj temperaturi na danom tlaku uslijed čega ne dolazi do promjene kemijskog sastava.<sup>1</sup> Temperatura faznog prijelaza je temperatura pri kojoj su dvije faze,  $\alpha$  i  $\beta$ , u ravnoteži.

$$A(\alpha) \rightleftharpoons A(\beta) \quad (2.23)$$

Ako su dvije faze u ravnoteži pri nekom tlaku  $p$  i temperaturi  $T$ , njihove su molarne Gibbsove energije, odnosno kemijski potencijali, jednaki:

$$G_{m,A(\alpha)} = G_{m,A(\beta)}. \quad (2.24)$$

Prikaz raspona vrijednosti tlaka i temperature pri kojima je neka faza termodinamički najstabilnija naziva se fazni dijagram.<sup>5</sup>



Slika 8. Shematski prikaz faznog dijagrama.<sup>16</sup>

Postoji mnogo vrsta faznih prijelaza, pri čemu su najpoznatiji taljenje i sublimacija, dok su oni manje poznati fazni prijelazi u čvrstom stanju ili prijelazi iz vodiča u supravodič. Najpoznatija i danas najčešće korištena podjela faznih prijelaza je Ehrenfestova podjela. Kod faznih prijelaza koji su praćeni promjenama u volumenu i entalpiji dolazi do promjene u kemijskom potencijalu pojedine faze:

$$dG = Vdp - SdT \quad (2.25)$$

$$\left(\frac{\partial \mu_{\beta}}{\partial p}\right)_T - \left(\frac{\partial \mu_{\alpha}}{\partial p}\right)_T = V_{m,\beta} - V_{m,\alpha} = \Delta_{\text{trs}}V \quad (2.26)$$

$$\left(\frac{\partial \mu_{\beta}}{\partial T}\right)_p - \left(\frac{\partial \mu_{\alpha}}{\partial T}\right)_p = -S_{m,\beta} + S_{m,\alpha} = \Delta_{\text{trs}}S = \frac{\Delta_{\text{trs}}H}{T_{\text{trs}}} \quad (2.27)$$

Budući da su veličine  $\Delta_{\text{trs}}V$  i  $\Delta_{\text{trs}}H$  različite od nule za procese kao što su taljenje ili isparavanje, slijedi da uslijed faznog prijelaza dolazi do nagle promjene kemijskog potencijala tvari koja sudjeluju u tom procesu u ovisnosti o tlaku ili temperaturi pri uvjetima fazne transformacije. To znači da je prva derivacija kemijskog potencijala te tvari po tlaku ili temperaturi diskontinuirana u točki prijelaza. Fazni prijelazi za koje to vrijedi nazivaju se *fazni prijelazi prvog reda*. Kod takvih prijelaza izobarni toplinski kapacitet tvari je u točki faznog prijelaza prve vrste beskonačan, budući da za neku konačnu promjenu entalpije nema promjene u temperaturi sustava.

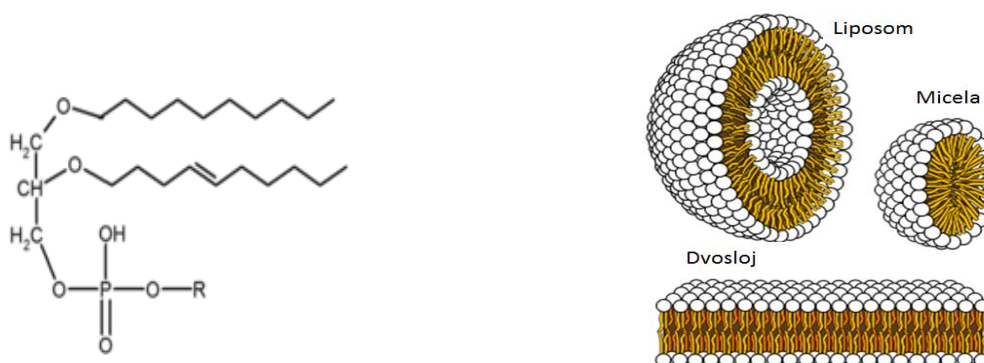
*Fazni prijelaz drugog reda* je onaj za koji je prva derivacija kemijskog potencijala po temperaturi kontinuirana, no druga derivacija je diskontinuirana. Kontinuirana prva derivacija kemijskog potencijala znači da se tijekom faznog prijelaza ne mijenja volumen ili entalpija. Treća vrsta faznih prijelaza su  $\lambda$  – *prijelazi* kod kojih prva derivacija kemijskog potencijala po temperaturi nije diskontinuirana, no pri temperaturi faznog prijelaza takvi sustavi imaju beskonačan izobarni toplinski kapacitet. Kod ove vrste faznog prijelaza dolazi do porasta u toplinskom kapacitetu prije samog prijelaza, a krivulja ovisnosti toplinskog kapaciteta o temperaturi ima oblik grčkog slova lambda. Ova vrsta prijelaza javlja se primjerice kod „order-disorder“ prijelaza u legurama.<sup>1</sup>

Budući da su fazni prijelazi najčešće popraćeni toplinskim efektom, kalorimetrija može poslužiti kao analitička metoda kojom se može termodinamički okarakterizirati fazni prijelaz određivanjem toplinskih kapaciteta, entalpija i temperatura taljenja raznih tvari kao što su primjerice ulja, lipidi, biološke makromolekule, polimeri, kristali itd.

### 2.3.2. Fazni prijelazi u lipidnim dvoslojima i biološkim membranama

Biološke membrane<sup>17</sup> su jedne od glavnih staničnih dijelova i građene su od lipida i proteina. Lipidi su amfipatske molekule što znači da imaju polarni dio (glavu) i hidrofobni dio (rep). Takve molekule u vodenim otopinama spontano tvore dvoslojne strukture u kojima su polarni dijelovi okrenuti otapalu, dok se hidrofobni repovi nalaze u unutrašnjosti dvosloja. Nastajanje dvosloja lipida u vodenim otopinama entropijski je povoljno zbog otpuštanja velikog broja molekula vode iz solvacijske sfere lipida prilikom slaganja u dvosloj. Takve vrste agregata mogu tvoriti zatvorene sferne vezikule i liposome koji su idealni modelni sustavi za opis staničnih membrana.

Lipidi u membranama su najčešće fosfolipidi, esteri alkohola glicerola i dvije masne kiseline koji sadržavaju i polarnu fosfatnu glavu (slika 9). Uz fosfolipide, u membranama se javljaju i druge vrste lipida, kao što je kolesterol, te uz njih se nalaze i proteini. Proteini mogu biti vezani elektrostatskim interakcijama s jedne strane membrane (periferni) ili mogu biti ugrađeni u membranu (integralni).



Slika 9. Shematski prikaz fosfolipida (lijevo) i shematski prikaz struktura koje tvore lipidi u vodenim otopinama (desno).<sup>18, 19</sup>

Ovisno o vrsti lipida (duljini ugljikovodičnog lanca masnih kiselina) i udjelu vode, nastaje mnoštvo različitih vrsta dvoslojnih struktura. Promjenom udjela vode u sustavu dolazi do faznog prijelaza iz jedne dvoslojne strukture u drugu. Fazni prijelaz može se potaknuti i promjenom u temperaturi. Budući da lipidni dvosloji u obliku liposoma služe kao

modelni sustavi za proučavanje bioloških membrana, temperaturno inducirani fazni prijelazi kod takvih struktura najviše su istraženi.

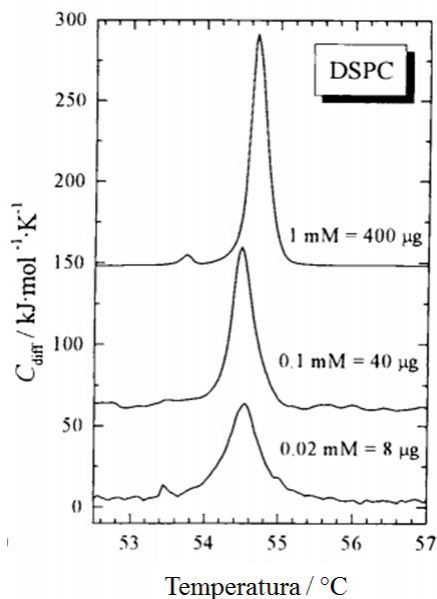
Visoko temperaturna faza lipidnog dvosloja ( $L_{\alpha}$ -faza) je tekuće – kristalna faza.<sup>17</sup> Sastoji se od niza dvosloja razdvojenih slojevima vode određene debljine. Molekule unutar dvosloja čine tekuću fazu u smislu da im je omogućena lateralna difuzija unutar dvosloja te rotacija molekule lipida oko osi koju čini ugljikovodični lanac masnih kiselina. Interakcije između polarnih skupina fosfolipida i nepolarnih repova masnih kiselina u takvom uređenju čine strukturu fluidnom. Snižanjem temperature dolazi do faznog prijelaza iz tekuće–kristalne faze u gel fazu pri čemu dolazi do uređenja lipida unutar dvosloja. Molekule lipida u takvoj vrsti dvosloja gusto se pakiraju zbog jakih van der Waalsovih interakcija između ugljikovodičnih lanaca. Ovakav fazni prijelaz iz tekuće-kristalne faze u gel fazu pripada faznom prijelazu prve vrste.

### 2.3.3. Primjena razlikovne pretražne kalorimetrije (DSC) na fazne prijelaze u razrijeđenim otopinama lipida<sup>20</sup>

Iako se prilikom faznog prijelaza molekula lipida događa i promjena u hidratacijskoj sferi svake od struktura u otopini, za pojednostavljenje termodinamičke karakterizacije, promjene vezane uz hidrataciju smatraju se pred-prijelazom te se analiziraju zasebno. Za analizu faznog prijelaza koristi se vrlo razrijeđena suspenzija lipida te DSC kalorimetar visoke osjetljivosti, najčešće adijabatskog tipa. Tipičan rezultat mjerenja za najispitiviji fosfolipid distearoilfosfatidilkolin prikazan je na slici 10 kao ovisnost toplinskog kapaciteta o temperaturi. Na temelju mjerenja poznate su vrijednosti temperature faznog prijelaza,  $T_m$ .

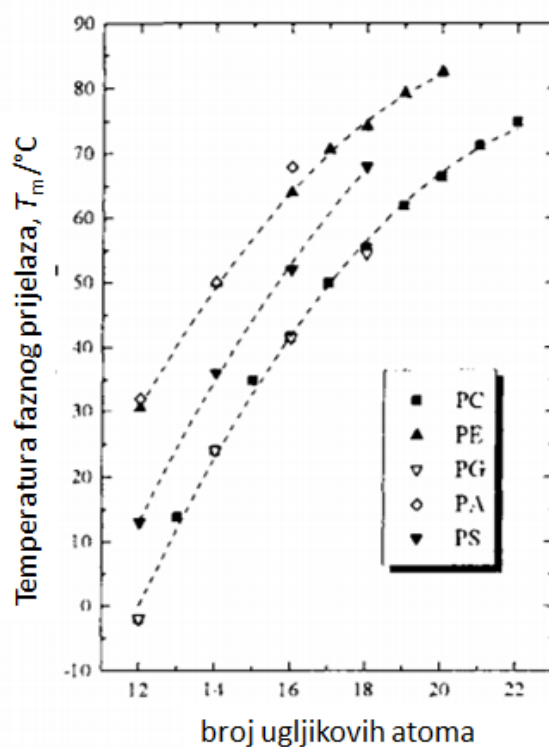
Kako bi se bolje okarakterizirala svojstva lipidnih dvoslojâ, provode se mjerenja kojima se ispituje utjecaj strukture molekula, ili nekih od parametara pri kojima se eksperiment izvodi, na karakteristične vrijednosti faznog prijelaza. Tako se na primjer može ispitati utjecaj strukture polarne skupine ili duljine ugljikovodičnog lanca na vrijednost  $T_m$ .





Slika 10. DSC krivulje faznog prijelaza distearoilfosfatidilkolina (DSPC) dobivene pomoću VP-DSC kalorimetra tvrtke MicroCal, Inc.<sup>20</sup>

Proučavanjem utjecaja duljine ugljikovodičnog lanca masnih kiselina fosfolipida pomoću DSC kalorimetrije ustanovljeno je da do faznog prijelaza dolazi pri višoj temperaturi za one fosfolipide čiji je ugljikovodični lanac duži, što se može vidjeti na slici 11. Ovakvo je ponašanje očekivano s obzirom da produljenjem ugljikovodičnog lanca dolazi do jačanja van der Waalsovih interakcija. Također, mjerenja su pokazala da promjenom polarne skupine (glave) fosfolipida dolazi do promjene temperature faznog prijelaza. Ispitivanje utjecaja polarne skupine fosfolipida provedeno je za sljedeće lipide: fosfatidil-kolin (PC), fosfatidil-etanolamin (PE), fosfatidil-serin (PS), fosfatidil-glicerol (PG) te fosfatidat (PA). Ustanovljeno je (slika 11) da fosfatidil-kolin te fosfatidil-etanolamin imaju višu temperaturu faznog prijelaza u usporedbi s fosfatidil-serinom te fosfatidil-glicerolom. Što su polarne skupine manje i imaju veću sposobnost stvaranja međumolekulskih interakcija, kao što je to slučaj kod skupina koje mogu ostvariti vodikove veze, temperatura faznog prijelaza biti će veća. Međutim, povećanje negativnog naboja na polarnom dijelu molekule fosfolipida uzrokuje snažnije odbijanje molekula, odnosno povećanje hidratacijske sfere lipida. Uslijed navedenih pojava dolazi do smanjenja vrijednosti temperature mekšanja.

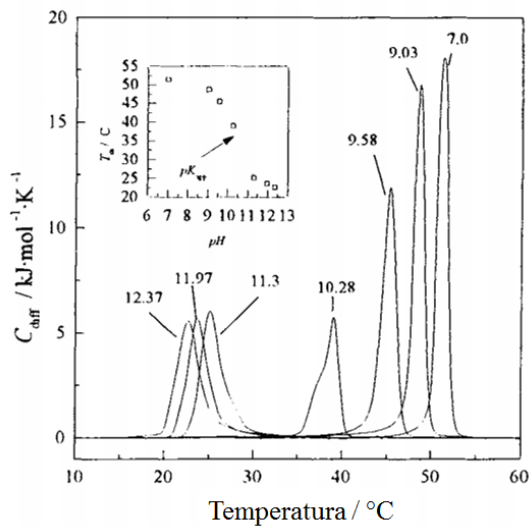


Slika 11. Temperature faznih prijelaza ( $T_m$ ) za fosfolipide različitih masnih kiselina.<sup>20</sup>

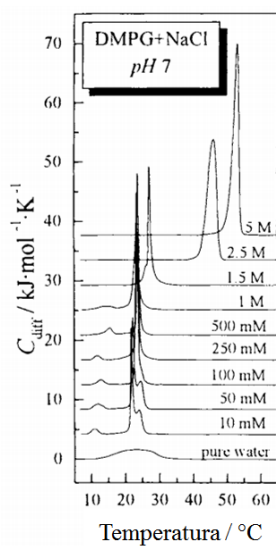
Razlikovna pretražna kalorimetrija pokazala se kao odlična metoda za određivanje temperature faznog prijelaza, međutim nije tako dobra za određivanje entalpije procesa. Razlog tome djelomično je eksperimentalne prirode, odnosno uslijed neprecizno određenih koncentracija lipida u otopini. Drugi razlog je približna korekcija DSC krivulje s obzirom na vrijednost bazne linije prilikom obrade podataka.

Za fosfolipide s ionizabilnim polarnim skupinama moguće je termički okarakterizirati fazni prijelaz tekuće kristalno–gel na temelju ispitivanja utjecaja promjene vrijednosti pH otopine, te vezanjem raznih vrsta iona. Primjerice, sniženjem vrijednosti pH dolazi do protoniranja hidrofilnih skupina fosfolipida što uzrokuje promjenu temperature pri kojoj dolazi do faznog prijelaza. Takve promjene lako su uočljive na DSC krivuljama (slika 12). Promjene u strukturi polarne skupine uzrokuju promjene u entalpiji i entropiji faznog prijelaza. Vezanje jednostruko ili višestruko nabijenih kationa na lipide s negativno nabijenim hidrofilnim skupinama također znatno utječe na karakteristike faznog prijelaza. Dodatkom otopine soli u sustav lipida dolazi do povećanja ionske jakosti otopine. Time se negativan naboj hidrofilne skupine zasjenjuje jer ta skupina stupa u elektrostatsku interakciju s dodanim kationima soli.

Takva interakcija dodatno stabilizira sustav što za posljedicu ima porast temperature faznog prijelaza. Ta pojava vidljiva je na krivulji (slika 13) kao pomak maksimuma toplinskog kapaciteta prema većim vrijednostima.



Slika 12. DSC krivulje dimistroilfosfatidatne kiseline kao funkcija pH. <sup>20</sup>



Slika 13. DSC krivulje dimistroilfosfatidatil glicerola kao funkcija koncentracije natrijeva klorida pri pH = 7. <sup>20</sup>

## 2.4. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji stabilnosti proteina

Proteini su jedna od glavnih skupina bioloških makromolekula. Građeni su od specifičnog linearnog slijeda aminokiselina koji se naziva primarna struktura proteina. Međutim, u otopini nisu prisutni u obliku ravnolančanog polipeptida, već zauzimaju specifične strukture koje su stabilizirane vodikovim vezama između karbonilnih kisikovih i amidnih vodikovih atoma, što čini sekundarnu strukturu proteina. Prostornim elektrostatskim interakcijama, hidrofobnim ili kovalentnim interakcijama (disulfidni mostovi) bočnih ogranaka aminokiselina ostvaruje se tercijska struktura proteina i dodatno smatanje proteina u otopini.

Proteini mogu biti fibrilarni ili globularni. Dok je uloga fibrilarnih proteina u organizmima strukturne i potporne prirode, globularni proteini su topljiviji, djeluju kao enzimi, prenositelji su različitih molekula te ostvaruju interakcije sa ostalim makromolekulama. Uslijed tih svojstava sudjeluju u raznim prijenosima signala ili reakcijama. Za proteine je karakteristična povezanost njihove sekundarne i tercijske strukture s funkcijom koju obnašaju. Naime, promjenama u strukturi proteina, odnosno narušavanjem nekovalentnih interakcija, dolazi do djelomičnog ili potpunog gubitka funkcije proteina. Taj proces naziva se denaturacija, a može biti temperaturno ili kemijski induciran.

Kako bi se dobila točna uloga nekog proteina u stanici, potrebno je ispitati njegovu strukturu i funkciju. Pri tome, za ispitivanje funkcije proteina potrebno termodinamički i kinetički okarakterizirati sustav u kojem je protein aktivan. Ispitivanjem procesa denaturacije proteina moguće je ustanoviti pri kakvim uvjetima temperature, ionske jakosti ili pH je protein stabilan, te na koji način promjena svojstava sustava utječe na njegovu funkciju.<sup>21</sup>

Razlikovna pretražna kalorimetrija je metoda kojom je moguće pratiti promjenu strukture proteina, koja se može opisati kao vrsta faznog prijelaza iz nativnog oblika u denaturirani.

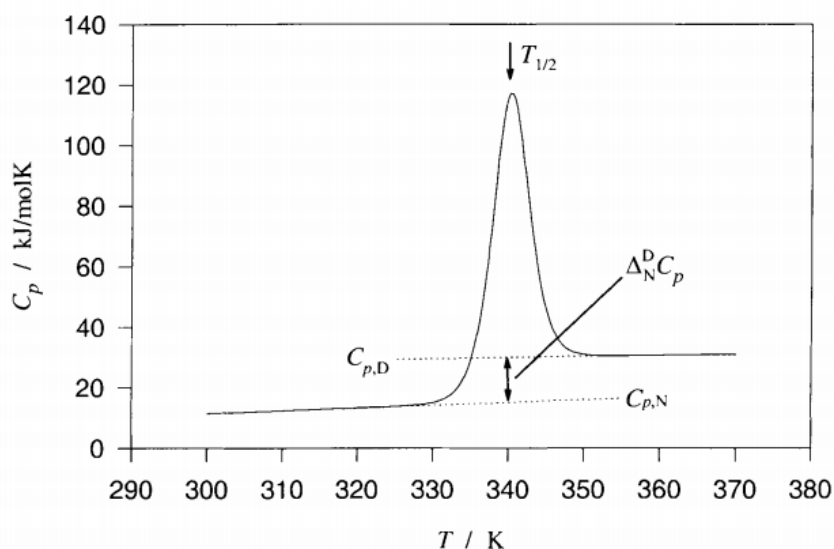
Osnovni parametri dobiveni DSC mjerenjima su temperatura pri kojoj dolazi do denaturacije i entalpija tog procesa. Na temelju vrijednosti tih veličina moguće je doći do entropije, toplinskog kapaciteta ili Gibbsove energije denaturacije pri uvjetima fazne

transformacije. Denaturacija proteina može se opisati kao ravnoteža između dva stanja, nativnog (N) i denaturiranog (D)<sup>22</sup>:



Nativna struktura proteina je ona koju protein zauzima pri fiziološkim uvjetima. Tada protein obavlja svoju funkciju koja je vezana uz uređenu tercijarnu strukturu, dok je denaturirana proteina bez uređene strukture i nije funkcionalan.

Na temelju DSC mjerenja<sup>22</sup> dobivena je krivulja ovisnosti toplinskog kapaciteta o temperaturi koja je prikazana na slici 14. Krivulja se sastoji od tri dijela: dva područja koja prikazuju linearnu promjenu toplinskog kapaciteta u ovisnosti o temperaturi razdvojena su područjem maksimuma toplinskog kapaciteta u kojem dolazi do denaturacije proteina, odnosno faznog prijelaza prve vrste.



Slika 14. DSC krivulja denaturacije proteina.<sup>22</sup>

Kako bi se mogle uspoređivati stabilnosti različitih proteina pri određenim uvjetima, definirana je temperatura prijelaza  $T_{1/2}$  koja označava temperaturu pri kojoj je 50% molekula denaturirano. Na DSC krivulji ta temperatura je ona pri kojoj toplinski kapacitet postiže maksimalnu vrijednost.

Osim kvalitativnog opisa denaturacije proteina razlikovnom pretražnom kalorimetrijom, u smislu određivanja raspona temperatura unutar kojeg dolazi do denaturacije, taj proces može se opisati vrijednostima termodinamičkih veličina

denaturacije. Kao što je već spomenuto, ukupna toplina prilikom denaturacije proteina odgovara razlici površina ispod DSC krivulje i bazne linije. Ta toplina može se dobiti iz vrijednosti toplinskog kapaciteta denaturacije  $\Delta_N^D C_p$  pri konstantnom tlaku:

$$C_p = \left( \frac{\partial H}{\partial T} \right)_p \quad (2.29)$$

$$\Delta_N^D C_p = C_{p,D} - C_{p,N} = \left( \frac{\partial H_D}{\partial T} \right)_p - \left( \frac{\partial H_N}{\partial T} \right)_p = \left( \frac{\partial \Delta_N^D H^o(T)}{\partial T} \right)_p. \quad (2.30)$$

Ukoliko vrijedi da je razlika toplinskog kapaciteta temperaturno neovisna vrijedi i:

$$\Delta_N^D H^o(T) = \Delta_N^D H^o(T_{1/2}) + \Delta_N^D C_p (T - T_{1/2}) \quad (2.31)$$

Razlika entropije denaturiranog i nativnog oblika iznosi:

$$\frac{\Delta_N^D C_p}{T} = \left( \frac{\partial \Delta_N^D S^o(T)}{\partial T} \right)_p \quad (2.32)$$

$$\Delta_N^D S^o(T) = \Delta_N^D S^o(T_{1/2}) + \Delta_N^D C_p \frac{\ln T}{T_{1/2}}. \quad (2.33)$$

Ukoliko se denaturacija proteina smatra kao reverzibilan proces, moguće je definirati konstantu ravnoteže denaturacije kao:

$$K = \frac{[D]}{[N]}. \quad (2.34)$$

Pri temperaturi  $T_{1/2}$ , jednaka je koncentracija nativnih i denaturiranih proteina te konstanta ravnoteže iznosi  $K = 1$ . Tada vrijedi:

$$\Delta_N^D H^o \left( T_{\frac{1}{2}} \right) - T_{\frac{1}{2}} \cdot \Delta_N^D S^o \left( T_{\frac{1}{2}} \right) = \Delta_N^D G^o \left( T_{\frac{1}{2}} \right) = -RT_{\frac{1}{2}} \ln \left[ K \left( T_{\frac{1}{2}} \right) \right] = 0 \quad (2.35)$$

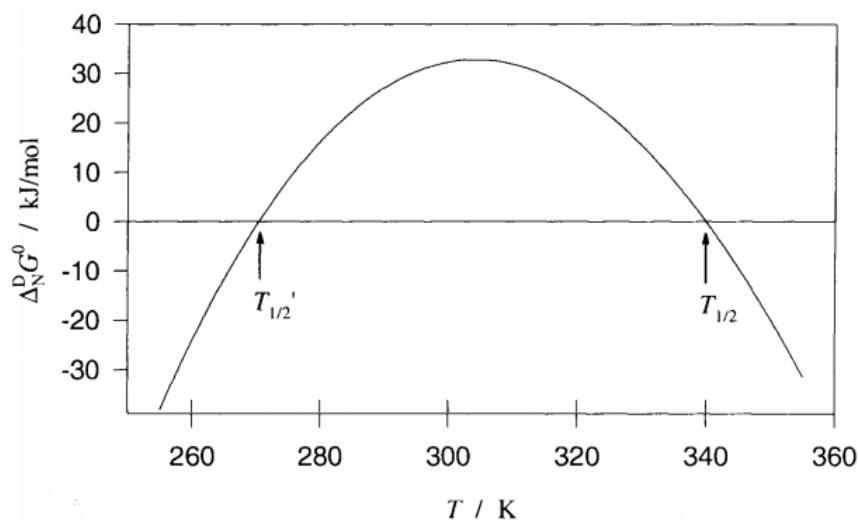
$$\Delta_N^D S^o(T_{1/2}) = \frac{\Delta_N^D H^o(T_{1/2})}{T_{1/2}} \quad (2.36)$$

$$\Delta_N^D G^o(T) = \Delta_N^D H^o(T) - T \cdot \Delta_N^D S^o(T) \quad (2.37)$$

$$\Delta_N^D G^o(T) = \Delta_N^D H^o(T_{1/2}) + \Delta_N^D C_p (T - T_{1/2}) - T \left[ \frac{\Delta_N^D H^o(T_{1/2})}{T_{1/2}} + \Delta_N^D C_p \frac{\ln T}{T_{1/2}} \right] \quad (2.38)$$

Jednadžba (2.38) definicijska je jednadžba za stabilnost proteina, a njena ovisnost o temperaturi daje krivulju stabilnosti proteina koja je prikazana na slici 14. Uvrštavanjem jednadžbe (2.38) u jednadžbu (2.14) moguće je dobiti izraz za određivanje konstante ravnoteže denaturacije proteina:

$$K = \exp \left( -\frac{\Delta_N^D G^o(T)}{RT} \right) \quad (2.39)$$



Slika 15. Krivulja stabilnosti proteina za ravnotežu između nativnog i denaturiranog oblika.<sup>22</sup>

Eksperimentalna vrijednost entalpije procesa ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) određuje se numeričkom integracijom eksperimentalne krivulje, a izjednačava se sa standardnom reakcijskom entalpijom fazne promjene pri temperaturi  $T_{1/2}$ .

Osim denaturacije proteina, kalorimetrijski se može pratiti i smatanje proteina u biološki aktivan oblik iz denaturiranog oblika. Mikrokalorimetrijskom razlikovnom pretražnom kalorimetrijom praćen je proces promjene tercijarne strukture lizozima iz kristalnog oblika u nativan oblik u otopini.<sup>23</sup>

## 2.5. Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji molekularnog raspoznavanja

Pravilno ostvarivanje interakcija između molekule liganda i makromolekule prilikom nastanka kompleksa ligand-makromolekula, ključno je za stabilnost nastalog kompleksa. Vezanje liganda uključuje specifične nekovalentne interakcije s točno određenom regijom makromolekule koja se naziva vezno mjesto. Uslijed takvog vezanja moguća je promjena konformacije makromolekule, što može uzrokovati promjenu u fizikalnim i kemijskim svojstvima molekule. Makromolekula može imati više od jednog veznog mjesta za vezanje liganda. Ukoliko vezanje prve molekule liganda mijenja afinitet vezanja ostalih molekula liganda na makromolekulu proces se naziva kooperativnim, odnosno dolazi do pojave pozitivnog alosteričkog efekta.<sup>24</sup>

Kako bi se mogla objasniti primjena kalorimetrije na određivanje termodinamičkih veličina procesa molekularnog raspoznavanja potrebno je uvesti stehiometrijske modele na kojima se temelji interakcija makromolekule i liganda. Najjednostavniji slučaj vezanja liganda za makromolekulu je onaj kada postoji samo jedno vezno mjesto. Ravnoteža između slobodnih reaktanata i kompleksa u takvom sustavu dana je jednadžbom:



Vezni afinitet makromolekule M prema ligandu L izražava se kao vrijednost standardne konstante vezanja  $K_b^o$ :

$$K_b^o = \frac{a(ML)}{a(M)a(L)} \quad (2.41)$$

gdje pripadajući izraz za koncentracijsku konstantu ravnoteže glasi:

$$K_{c,b} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (2.42)$$

Termodinamička konstanta ravnoteže, koja karakterizira vezanje, izražena je preko ravnotežnih aktiviteta vrsta u ravnoteži. No budući da sam eksperiment nosi veću pogrešku od aproksimacije vrijednosti aktiviteta koncentracijom podijeljenom sa standardnom vrijednosti, uobičajeno je afinitet iskazati preko vrijednosti koncentracijske konstante ravnoteže. Rezultati dobiveni izotermnim kalorimetrijskim titracijama pružaju potpunu termodinamičku karakterizaciju interakcija makromolekula–ligand, te omogućavaju određivanje veznog afiniteta, entalpije i entropije procesa vezanja. Iz vrijednosti standardne



konstante vezanja moguće je doći do standardne reakcijske Gibbsove energije prema jednadžbi (2.14), a zatim i do standardne reakcijske entropije pomoću izraza (2.16).

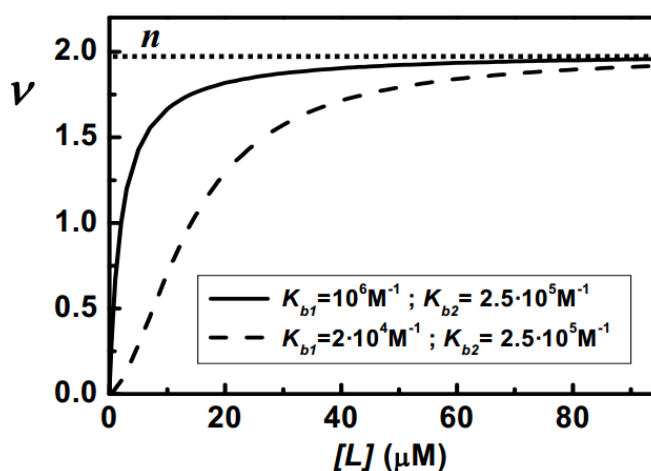
Za opis modela kojim se objašnjava način raspoznavanja molekula i vezanje liganada na makromolekulu s više veznih mjesta, potrebno je definirati određene parametre<sup>24</sup>: broj veznih mjesta na makromolekuli za vezanje molekula liganda označen kao  $n$  koji može biti jedan ili veći, te ovisi o strukturi makromolekule. Vezni parametar,  $v$  označava množinu vezanog liganda po 1 mol makromolekule. Faktor zasićenja ( $\vartheta$ ) je udio popunjenih veznih mjesta makromolekule. U slučaju da postoji samo jedno vezno mjesto, tada je vezni parametar definiran kao omjer koncentracije vezanog liganda i ukupne koncentracije makromolekule na način:

$$v = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{[ML]}{[M]+[ML]} = \frac{K_b[L]}{1+K_b[L]} \quad (2.43)$$

Do ravnotežne konstante,  $K_{c,b}$  moguće je doći nelinearnom regresijom prema jednadžbi (2.43) ili linearizacijom jednadžbe (2.43):

$$\log\left(\frac{v}{1-v}\right) = \log(K_{c,b}[L]) \quad (2.44)$$

Proučavanje ravnoteža vezanja liganda i makromolekule može se primijeniti na složenije sustave u kojima dolazi do vezanja više liganada, pri čemu svaki korak može imati pozitivan ili negativan alosterički efekt na vezanje sljedećeg liganda.<sup>24</sup>



Slika 16. Vezna krivulja za reakciju vezanja liganda na makromolekulu s dva vezna mjesta.<sup>24</sup>

Kooperativnost pri vezanju liganada na makromolekulu najlakše se određuje na temelju Hilllove krivulje koja je dana kao ovisnost veznog parametra o koncentraciji liganada (slika 16).

Za vezanje više molekula liganada L na makromolekulu M vrijedi slijedeće:

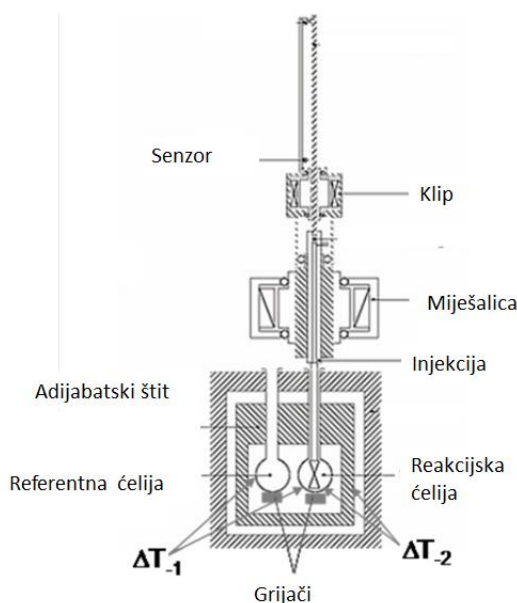


$$\log\left(\frac{v}{1-v}\right) = \log(K_n) + n \cdot \log([L]) \quad (2.46)$$

pri čemu je  $K_n$  konstanta ravnoteže dane jednadžbom (2.45), dok je  $n$  Hillov koeficijent koji varira između  $1 < n_H < n$ . Iz vrijednosti Hillovog koeficijenta moguće je odrediti u kakvom su međudnosu vezna mjesta na makromolekuli. Ukoliko je vezanje neovisno tada će vrijednost Hillovog koeficijenta biti jedan. Ukoliko je vezanje liganada na makromolekulu kooperativno, vrijednost Hillovog koeficijenta biti će veća od jedan prilikom pozitivne kooperativnosti, a manja od jedan za negativnu kooperativnost.

### 2.5.1. Primjena izotermne titracijske kalorimetrije

Najčešća vrsta titracijskog kalorimetra korištena za određivanje supramolekulskih interakcija je kompenzacijski kalorimetar u kojem se toplinski efekt koji nastaje uslijed interakcija molekula liganada i makromolekule kompenzira toplinskom snagom. Na slici 17 prikazan je shematski prikaz takvog kalorimetra.



Slika 17. Shematski prikaz dvojnog kompenzacijskog titracijskog kalorimetra.<sup>25</sup>

Tijekom titracije u otopinu titranda koja se nalazi u reakcijskoj ćeliji kalorimetra dodaje se niz volumena otopine titransa te se mjeri pripadajući toplinski efekt. Svaki dodatak liganda potrebno je vremenski razmaknuti od prethodnog tako da se osigura vraćanje sustava u termičku, a zatim i u kemijsku ravnotežu.

Iz termograma titracije moguće je dobiti toplinu nakon svakog dodatka liganda, pri čemu je potrebno korigirati sustav na baznu liniju. Prikaz vrijednosti entalpije prema analitičkoj koncentraciji titransa se naziva *izoterma vezanja* (slika 5b). Analiza veznih izoterma provodi se pomoću nelinearne regresije, prilikom čega se dobiju vrijednosti konstante ravnoteže i entalpije procesa. Reakcijska entalpija i entropija mogu se odrediti i drugim analitičkim metodama, iz ovisnosti konstante ravnoteže o temperaturi, što zahtijeva izvedbu većeg broja eksperimenata. Velika osjetljivost titracijskih kalorimetara i direktno određivanje termodinamičkih parametara reakcije čine izotermnu kalorimetriju često korištenom metodom u kemiji i biologiji.

Toplina izmjerena nakon  $i$ -tog dodatka titransa odgovara promjeni entalpije sustava i direktno je povezana s promjenom doseg reakcije i reakcijskom entalpijom

$$q_{p,i} = \Delta H_i = \Delta \xi_i \Delta_r H \quad (2.47)$$

Ukoliko se promjena doseg za navedenu reakciju izrazi pomoću promjene koncentracije nastalog kompleksa ML dobiva se jednadžba

$$q_p = \Delta \xi_i \Delta_r H = ([ML]_i - [ML]_{i-1}) V \Delta_r H \quad (2.48)$$

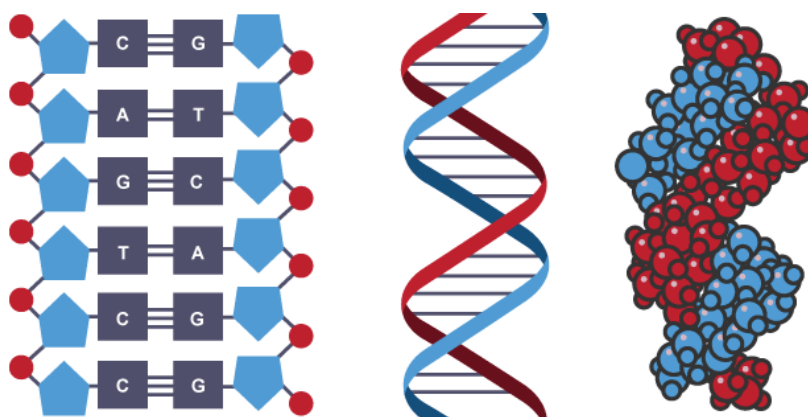
pri čemu je  $[ML]_i$  ravnotežna koncentracija kompleksa nakon dodatka titransa,  $[ML]_{i-1}$  ravnotežna koncentracija kompleksa prije dodatka, a  $V$  je volumen sustava. Uvrštavanjem tvarne bilance u izraz za koncentracijsku konstantu ravnoteže, uz pretpostavljenu vrijednost konstante ravnoteže, lako je izračunati ravnotežne koncentracije sudionika ravnoteže. Nakon toga se pomoću iz izmjerenih toplina i izračunatih ravnotežnih koncentracija dolazi do vrijednosti reakcijske entalpije, a potom i do vrijednosti reakcijske entropije.

Kod određivanja topline titracijskim kalorimetrom treba koristiti modificirani oblik jednadžbe (1.10) u koju se na desnu stranu dodaje član  $\frac{(\xi_{n-1} + \xi_n) \Delta V_n}{2V_0} \Delta_r H$ . U tom članu  $\xi_{n-1}$  označava ravnotežni doseg od početka titracije do trenutka prije dodatka titransa,  $\xi_n$

ravnotežni doseg od početka titracije do uspostave ravnoteže nakon dodatka, a  $\Delta V_n$  je volumen n-tog dodatka. Dodatni član odgovara toplini koja se oslobodila izvan reakcijske ćelije, u prostoru u kojem nema toplinskih senzora kalorimetra.<sup>4</sup>

## 2.6. Primjena kalorimetrije na sustave molekule DNA

Deoksiribonukleinska kiseline (DNA) odgovorna je za prijenos genetičke informacije u živim organizmima. Molekula DNA je biopolimer nukleotida (šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i dušične baze) te pri fiziološkim uvjetima tvori dvostruku zavojnicu. Dva antiparalelna lanca nukleotida omataju se oko zamišljene osi i tvore desnu zavojnicu koja je stabilizirana vodikovim vezama ostvarenim između parova dušičnih baza (timina i adenina, citozina i gvanina), te hidrofobnim *stacking* interakcijama između aromatskih sustava dušičnih baza. Na slici 18 prikazana je struktura molekule DNA.<sup>26</sup>



Slika 18. Shematski prikaz strukture molekule DNA.<sup>27</sup>

Kako bi stanica mogla sintetizirati molekule i tvoriti supramolekulske komplekse te strukture potrebne za funkcionalan i neometan rad stanice, informacije pohranjene u DNA moraju se moći interpretirati. Molekula se DNA u procesima zvanim transkripcija i translacija redom čita i prevodi u polipeptide, koji se u otopini smataju u molekule proteina. Procese transkripcije i translacije omogućuje mnoštvo različitih enzima i ostalih proteina, pa stoga ne čudi da se za detaljno istraživanje mehanizama staničnih procesa vezanih za molekule DNA istražuju funkcije i svojstva molekula koje se na nju vežu, primarno su to proteini. Istraživanja takvog tipa ne samo da omogućuju detaljnije poznavanje staničnih mehanizama, već uvelike doprinose razvoju i dizajnu lijekova.

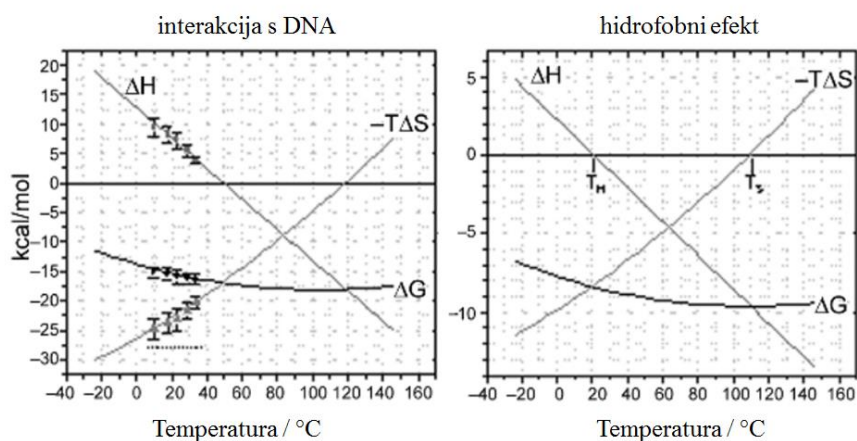
Kalorimetrijskim metodama, ponajviše razlikovnom pretražnom kalorimetrijom i izotermnom titracijskom kalorimetrijom, moguće je pratiti vezanje proteina na molekulu DNA. Iz rezultata kalorimetrijskih mjerenja te podataka dobivenih strukturnom analizom kompleksa protein-DNA, moguće je povezati strukturu kompleksa i supramolekulske interakcije do kojih dolazi tijekom vezanja s funkcijom nastalog kompleksa u stanici.<sup>28</sup>

### 2.6.1. Termodinamička karakterizacija interakcija između molekula DNA te proteina

Budući da tijekom supramolekulskih interakcija između molekula može doći i do dodatnih efekata koji doprinose promjeni Gibbsove energije, kao što su konformacijske promjene ili promjene u solvataciji sudionika reakcije, potrebno je prikupiti mnoštvo informacija dobivenih na modelnim sustavima kako bi se što točnije interpretirali izmjereni podaci.

Hidrofobni efekt<sup>28</sup> vezan je uz solvataciju nepolarne tvari u vodi, a opaža se prilikom prijelaza nepolarne tvari iz vode u nepolarno otapalo. Praćen je velikom negativnom promjenom toplinskog kapaciteta, a termodinamički profil hidrofobnog efekta pokazuje da porastom temperature dolazi do smanjenja u entalpijskom doprinosu te do porasta u entropijskom doprinosu Gibbsovoj energiji solvatacije. Hidrofobni efekt javlja se kod procesa kao što su dehidratacija, stvaranja šupljina u vodi ili promjena u rasporedu vodikovih veza između molekula vode prilikom solvatacije nepolarne tvari. Istraživanja pokazuju da hidrofobni efekt može znatno doprinijeti procesu supramolekulskog raspoznavanja.<sup>29</sup>

Izotermnom titracijskom kalorimetrijom praćena je interakcija DNA-vezne domene glukokortikoidnog receptora (GR DBD) s veznim mjestima na molekuli DNA različitog sastava dušičnih baza.<sup>30</sup> Termodinamički profili (slika 19) dobiveni kalorimetrijskim mjerenjima za sustave u kojem se receptor veže na vezno mjesto molekule DNA uspoređeni su s termodinamičkim profilom za prijelaz molekule cikloheksana iz vodene faze u cikloheksansku. Zaključeno je da hidrofobni efekt može imati dominantnu ulogu u supramolekulskoj interakciji proteina i DNA što se objašnjava izuzetnom strukturnom komplementarnošću molekule receptora i veznog mjesta na molekuli DNA. Zbog te strukturne karakteristike reaktanata dolazi do desolvatacije obiju molekula odnosno otpuštanja molekula vode.



Slika 19. Usporedba termodinamičkih profila sustava proteina i DNA (lijevo) i cikloheksana i vode (desno).<sup>28</sup>

Kalorimetrijskim metodama moguće je razlikovati pojedine vrste interakcija koje doprinose vezanju molekula. Tako je primjerice, izotermnom titracijskom kalorimetrijom, moguće odrediti utjecaj ionske jakosti i pH na entalpiju vezanja proteina na DNA usporedbom veznih izoterma. Izmjerena entalpija vezanja proteina glukokortikoidnog receptora na DNA linearno ovisi o ionizacijskoj entalpiji pufera u kojem se nalazi.<sup>28</sup> Stvaranjem protein-DNA kompleksa dolazi do promjene  $pK_a$  vrijednosti nekoliko bočnih ogranaka ili skupina na proteinu te na molekuli DNA. Samim time, stvaranje kompleksa je spregnuto s vezanjem ili otpuštanjem protona na molekule pufera što je vidljivo iz izraza koji povezuje kalorimetrijsku vrijednost entalpije kompleksiranja s onim za entalpiju ionizacije pufera:

$$\Delta H_{cal} = \Delta H_{bind} + \Delta n_H \Delta H_{ion}. \quad (2.49)$$

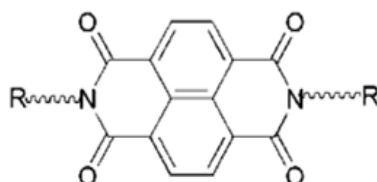
Vrijednosti toplinskog kapaciteta dobivene izotermnom titracijskom kalorimetrijom nisu pouzdane u smislu da one mogu biti posljedica više procesa, a ne isključivo vezanja proteina na molekulu DNA. Svaki od tih procesa doprinosi ukupnoj promjeni toplinskog kapaciteta koja se računa iz eksperimentalnih podataka. Metoda kojom je moguće izbjeći takve komplikacije je razlikovna pretražna kalorimetrija. Tako se primjerice upotrebom razlikovne pretražne kalorimetrije može pratiti stabilnost dvostruke zavojnice DNA kombinacijom s rezultatima ITC mjerenja. U tom slučaju metodom razlikovne pretražne

kalorimetrije analiziraju se zasebno proteini, molekula DNA, te DNA-proteinski kompleksi, što omogućava precizniju karakterizaciju interakcija.<sup>28</sup>

Od otkrića strukture molekule DNA 1950tih godina istražuje se terapijsko djelovanje molekula koje se vežu za DNA nekovalentnim interakcijama.<sup>31</sup> Rezultati višegodišnjih istraživanja pokazali su da mnogo molekula koje interagiraju s DNA djeluju kao antitumorski ili antipatogeni lijekovi.<sup>31</sup> Kako bi se smanjile nuspojave brojnih lijekova i razumjeli mehanizmi djelovanja, potrebno je prikupiti termodinamičke profile različitih DNA-lijek kompleksa. Najčešće korištena metoda analize takvih kompleksa je izotermna titracijska kalorimetrija.

Jedan od modalnih sustava korišten za analizu interakcija DNA–lijek su spojevi naftalenskih diimida (NDI)<sup>31</sup>, čija je struktura prikazana na slici 20. NDI je molekula simetrične strukture koja se veže na strukturu DNA na način da jedan bočni ogranak ostvaruje interakcije s malim, dok drugi s velikim utorom zavojnice DNA. Osim vezanja za dvostruku zavojnicu, neki derivati molekula NDI vežu se na nestandardne forme DNA poput tripleksa ili kvadrupleksa.

Mjerenjima izotermnom titracijskom kalorimetrijom može se okarakterizirati specifičan slijed nukleotida na koji se veže za serija NDI derivata uspoređujući vezne izoterme za te derivate s onima za otprije poznate spojeve za koje su poznata karakteristična vezna mjesta. Variranjem bočnih ogranaka derivata također se proučavao i utjecaj tih promjena na način vezanja NDI derivata na molekule DNA, te na stabilnost nastalih kompleksa.



R = etil- ili propil-bočni ogranak aminokiseline

Slika 20. Shematski prikaz strukture općenitih spojeva naftalenskih diimida NDI.<sup>31</sup>



Kako bi se odredilo preferentno mjesto vezanja naftalenskih diimida na molekulu DNA, najprije su izotermnom titracijskom kalorimetrijom određeni vezni afiniteti i mjesto vezanja (A–T ili C–G bogata regija DNA) za četiri spoja koja se na DNA vežu na karakterističan i poznat način. U tu svrhu korišteni su spojevi distamicin A i berenil koji se na molekulu DNA vežu interakcijama s malim utorom zavojnice te etidijev bromid i daunomicin koji se interkaliraju u zavojnicu DNA. Dok spojevi koji ostvaruju interakciju s malim utorom molekule DNA preferentno ostvaruju interakcije s A–T bogatom regijom DNA, interkalirajući spojevi imaju podjednake vezne afinitete za obje regije DNA. Usporedbom kalorimetrijskih podataka za derivate NDI s podacima dobivenim za karakteristične spojeve zaključeno je da se derivati NDI za DNA vežu interkalirajući.

Ispitivanja strukturnih utjecaja na način vezanja molekule NDI na zavojnicu DNA pokazala su da ciklički (ne-aromatski) supstituenti na krajevima bočnih ogranaka imaju ključnu ulogu u ostvarenju interakcije molekule NDI i zavojnice DNA jer su odgovorni za interkalaciju. Budući da veći prstenovi kao supstituenti s molekulom DNA ostvaruju sterički nepovoljne interakcije, vezni afinitet takvih derivata na DNA je manji. Također, zaključeno je da promjena duljine lanca bočnog ogranaka molekule NDI ima veliku ulogu u afinitetu vezanja alifatskih derivata NDI na molekulu DNA. Ukoliko je derivat NDI s etilnim bočnim ogranakom tada je njegov afinitet za vezanje na molekulu DNA tisuću puta veći nego u slučaju da je bočni ogranak propilna skupina.

## 2.7. Primjena kalorimetrije u dizajnu lijekova

Dizajn i istraživanje svojstava tvari koje bi mogle biti potencijalni lijekovi dugotrajan je proces koji se odvija u mnogo koraka. Svaki sustav u kojemu se ispituje djelovanje određene tvari na aktivnost druge nužno traži prisutnost molekule čije se djelovanje ispituje (ligand), te molekulu čiju aktivnost se želi promijeniti (meta)<sup>32</sup>. Budući da su najčešće mete lijekova enzimi, za ispitivanje biološke aktivnosti u sustavu potrebna je prisutnost supstrata tog enzima.

Biološka aktivnost svakog potencijalnog lijeka ne ovisi samo o ostvarenim interakcijama s metom već ovisi i o svim ostalim interakcijama koje molekula lijeka ostvaruje s ostalim proteinima i drugim molekulama u organizmu. Kako bi se okarakterizirala uspješnost lijeka potrebno je proučiti raznovrsnost interakcija koje molekula ostvaruje, afinitet za vezanje na metu te mehanizam djelovanja. Metoda koja pruža mnogo informacija o utjecaju molekule liganda na aktivnost spoja od interesa je izotermna titracijska kalorimetrija (ITC). Ovom kalorimetrijskom metodom izravno se mjere entalpije vezanja liganda na metu. U tipičnom mjerenju, proteinska meta nalazi se u termički izoliranom kalorimetru dok se molekule liganda dodaju u alikvotima malih volumena. Prilikom svakog dodatka alikvota mjeri se izmjenjena toplina iz koje se može onda odrediti konstanta asocijacije, standardna entalpija vezanja i stehiometrija vezanja.

Toplinski efekti prilikom titracije zbroj su topline nastanka kompleksa meta-ligand, topline razrjeđenja proteina, topline razrjeđenja liganda te topline miješanja. Zbog toga, paralelno s mjerenjem potrebno je provesti i kontrolne titracije. Također, izotermnom titracijskom kalorimetrijom moguće je odrediti mehanizam biološke aktivnosti liganda te reakciju kinetički opisati.<sup>32</sup>

## § 3. Literaturna vrela

1. P. Atkins i J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2006, str. 28-135.
2. W. Zielenkiewicz i E. Margas, *Theory of calorimetry*, Kluwer Academic, Dordrecht, 2002.
3. <https://en.wikipedia.org/wiki/Calorimetry> (preuzeto 30. lipnja 2016. god)
4. G. Horvat, *Reakcijska kalorimetrija*, Zagreb
5. V. Tomišić, T. Preočanin i N. Kallay, *Osnove fizikalne kemije*, Zagreb, 2009., str. 1-50.
6. L. Wadsö, A. L. Smith, H. Shirazi, S. R. Mulligan i T. Hofelich, *J. Chem. Ed.* **78** (2001) 1080-1086.
7. G. Horvat, V. Stilinović, T. Hrenar, B. Kaitner, L. Frkanec, V. Tomišić, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 6264–6278.
8. J. E. Ladbury i M. L. Doyle (ur.), *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004, str. 37-78.
9. [http://ttktamop.elte.hu/online-tananyagok/introduction\\_to\\_practical\\_biochemistry/ch08s07.html](http://ttktamop.elte.hu/online-tananyagok/introduction_to_practical_biochemistry/ch08s07.html) (preuzeto 9. srpnja 2016. god)
10. J. E. Ladbury i M. L. Doyle (ur.), *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004, str. 21-30.
11. G. W. Höhne, W. F. Hemminger i H. -J. Flammersheim, *Differential scanning calorimetry*, Springer, Berlin, 2004, str. 18.
12. D. Lőrinczy (ur.), *The Nature of Biological Systems as revealed by Thermal methods*, Springer Science, Dordrecht, 2004.
13. A. A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Cotext – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, Rijeka, 2013, str. 185-197.
14. <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/microcalorimetry/>
15. J. M. Lehn, *Science*, **260** (1993) 1762-1763.
16. [http://www.periodni.com/gallery/fazni\\_dijagram.png](http://www.periodni.com/gallery/fazni_dijagram.png) (preuzeto 9. srpnja 2016. god)
17. M. M. Cox i D. L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman and company, New York, 2012, str. 357-385.

18. [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c6/Phospholipids\\_aqueous\\_solution\\_structures.svg/300px-Phospholipids\\_aqueous\\_solution\\_structures.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c6/Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg/300px-Phospholipids_aqueous_solution_structures.svg.png) (preuzeto 9. srpnja 2016. god)
19. <https://en.wikipedia.org/wiki/Lipid> (preuzeto 9. srpnja 2016. god)
20. R. B. Kemp (ur.), *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, Volume 4, From macromolecules to man*, Elsevier Science, Amsterdam, 1999, str. 109 – 173.
21. M. M. Cox i D. L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman and company, New York, 2012, str. 157-189.
22. B. Kemp (ur.), *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry, Volume 4, From macromolecules to man*, Elsevier Science, Amsterdam, 1999, str. 63– 108.
23. A. A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Cotext – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, Rijeka, 2013, str. 185-197.
24. A. A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Cotext – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, Rijeka, 2013, str. 73-105.
25. I. Jelesarov i H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **12** (1999) 3-18.
26. M. M. Cox i D. L. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman and company, New York, 2012, str. 281-313, 1009-1057.
27. <http://www.bbc.co.uk/education/guides/z36mmp3/revision> (preuzeto 9. srpnja 2016. god)
28. J. E. Ladbury i M. L. Doyle (ur.), *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004, str. 81-90, 189-202.
29. Chandler D., *Nature*, **417** (2002) 491.
30. Lundbaück T. i Häürd T., *Proc. Natl Acad. Sci.*, **93** (1996) 4754–4759.
31. A. A. Elkordy, *Applications of Calorimetry in a Wide Cotext – Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, InTech, Rijeka, 2013, str. 129-152.
32. J. E. Ladbury i M. L. Doyle (ur.), *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004, str. 59-78.
33. J. E. Ladbury i M. L. Doyle (ur.), *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2004, str. 203-212.