Un acercamiento teórico a la titulación isotérmica calorimétrica y sus potenciales usos en el campo farmacéutico: el análisis termodinámico en la formación de complejos e interacciones proteína-ligando equimolares.

Sergio Leandro Cardenas Ospitia [1] & Mónica del Pilar Muñoz Cárdenas [2]

1 slcardenaso@unbosque.edu.co
2 mdmunozc@unbosque.edu.co

Resumen: La técnica calorimétrica insignia para la obtención de parámetros termodinámicos como la constante de afinidad (Ka), la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) de un proceso, es la titulación isotérmica calorimétrica (TIC). Las principales aplicaciones de la TIC en el estudio de interacciones proteína ligando y la formación de complejos equimolares de inclusión y de coordinación, son la evaluación de la estabilidad frente a diferentes condiciones de reacción, la selección de inhibidores, estimación del efecto terapéutico, estimación de la actividad enzimática, y estudio de la espontaneidad de los procesos. Además exhibe ventajas como la obtención de los parámetros termodinámicos en un solo experimento, no es totalmente destructiva, no requiere modificación (pretratamiento) de las muestras, y es útil en matrices turbias. De otro lado, las desventajas de la TIC están ligadas a una sensibilidad a la presencia de impurezas, tiempos de experimentación relativamente largos (>30 min) y a la compleja aplicación de modelos matemáticos para obtener los resultados termodinámicos. No obstante, se concluye la gran relevancia de la técnica en la farmacia por lo que se debe incentivar el entendimiento de los fundamentos fisicoquímicos y técnicos de la TIC para el uso provechoso de esta y otras técnicas analíticas similares.

Palabras clave: Titulación isotérmica calorimétrica; parámetros termodinámicos; fármacos; proteína-ligando, calor, temperatura, entalpía, entropía, energía libre de Gibbs.

1. Introducción.

Dentro de la formación conceptual que fundamenta el quehacer del químico farmacéutico, se encuentra el estudio de los principios de la termodinámica; rama del saber con poca acogida o cierto grado de reticencia por su nivel de complejidad [1]. Sin embargo, esta aversión ocasiona que los estudiantes de pregrado subestimen la importancia y aplicabilidad de esta área, dejando de lado la posibilidad de entender los parámetros termodinámicos que describen procesos químicos y físicos de asociación, ya sea de naturaleza inorgánica como las entidades de coordinación, bioquímica como los complejos de inclusión o los sistemas tipo proteína-ligando equimolares [2].

Los parámetros termodinámicos, como el cambio en la energía libre de Gibbs o en la entalpía, son variables cuantitativas que permiten describir el comportamiento energético de un sistema y proporcionan información esencial sobre la espontaneidad; o la liberación o absorción de calor durante el proceso [3]. Además, esta información es útil para entender la naturaleza de los procesos químicos y físicos de asociación, mediados por interacciones intermoleculares, o la formación - ruptura de enlaces, lo que permite optimizar las condiciones experimentales para favorecer un resultado deseado, o incluso comparar la estabilidad de los sistemas [4].

La medición de tales parámetros termodinámicos se hace a través de la estimación del calor intercambiado durante un proceso, a través de dispositivos sensibles y eficientes para cuantificar estas variaciones: los calorímetros [5]. Estos dispositivos miden señales analíticas, como la temperatura o la potencia, que son valores cuantificables obtenidos como respuesta a un estímulo aplicado [5]. Las técnicas analíticas enfocadas en cuantificar el calor asociado a un proceso dependiendo de las condiciones de operación, magnitud de medida, y metodología a seguir se les conoce como calorimetrías a presión o volumen constante, de inmersión, diferencial de barrido, etc. La calorimetría estándar para la obtención de todos los parámetros termodinámicos en un solo experimento, a presión constante, es la titulación isotérmica calorimétrica (TIC) [6].

La TIC es una técnica que permite medir directamente, en un solo experimento, los intercambios de calor generados por interacciones moleculares, sin la necesidad de modificaciones en las moléculas de estudio, y con esto, permite la obtención directa de parámetros termodinámicos como la constante de asociación (Ka), la relación estequiométrica de la reacción (n), los cambios en la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs (ΔG) [7].

El estudio de la formación de sistemas proteína-ligando y entidades de coordinación son fundamentales en farmacia, ya que estos procesos determinan la eficacia, selectividad y estabilidad de fármacos [8]. Muchos medicamentos actúan al modular la actividad proteica por medio de interacciones intermoleculares, lo que influye en su biodisponibilidad y mecanismo de acción. Un ejemplo relevante es la unión de inhibidores (reversibles) de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), utilizada en el tratamiento de la hipertensión, donde la estabilidad del complejo proteína-fármaco es necesaria para evaluar la efectividad [9]. Asimismo, los complejos metálicos, como el cisplatino, dependen de los enlaces de coordinación con biomoléculas para ejercer su actividad antitumoral [10].

La mayor parte de la literatura enfocada en el estudio de interacciones proteína-ligando y la formación de compuestos equimolares, evidencia el uso de la TIC para la determinación de los parámetros termodinámicos de los procesos de asociación, lo que la convierte en una técnica valiosa para el campo de la farmacia. La interpretación de estos valores se ha utilizado en la caracterización y reconocimiento molecular, desarrollo de sistemas de liberación y la optimización de algunas propiedades biofarmacéuticas [11]. Como en el caso de la clorpropamida, un antidiabético, que al formar complejos de inclusión con ciclodextrinas mejora ampliamente su solubilidad [12].

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo busca exponer los fundamentos de la TIC, su uso en el estudio de la formación de complejos equimolares (de inclusión y coordinación) e interacciones proteína-ligando equimolares permitiendo el acercamiento de estudiantes de pregrado en ciencias y otros lectores hacia los fundamentos teóricos y la utilidad del análisis termodinámico resultante del empleo de esta técnica.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

- Exponer los fundamentos teóricos relacionados con la titulación isotérmica calorimétrica permitiendo establecer las aplicaciones potenciales en el campo de la farmacia, a través del estudio termodinámico de la formación de complejos e interacciones proteína-ligando equimolares, todo esto mediante la

búsqueda, lectura, organización y análisis de la información obtenida de distintas fuentes bibliográficas de elevado rigor científico.

1.1.2 Objetivo específicos

- Explicar los fundamentos teóricos, matemáticos y termodinámicos de la titulación isotérmica calorimétrica mediante la consulta de diferentes fuentes bibliográficas.
- Establecer las aplicaciones más relevantes de la titulación isotérmica calorimétrica en el campo de la farmacia a través del estudio termodinámico de la formación de complejos e interacciones proteína-ligando equimolares.
- Identificar las ventajas y desventajas de la titulación isotérmica calorimétrica como método directo frente a otras técnicas indirectas empleadas para la determinación del perfil termodinámico de interacciones intermoleculares en la formación de complejos y sistemas proteína-ligando equimolares.

2. Materiales y métodos

Para cumplir con los objetivos propuestos se realizó una búsqueda sistemática para la recopilación de artículos con la siguiente ecuación de búsqueda ("Isothermal titration calorimetric") AND (Protein OR Ligand OR Complex) AND (Drug) AND (thermodynamic) AND (Enthalpy OR Entropy) AND (Heat). Se emplearon bases de datos como Science Direct, ResearchGate, Springer Nature Link, American Chemical Society y PubMed NIH con las cuales se obtuvieron alrededor de 272 artículos.

Sobre los artículos recuperados se aplicaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- Idiomas restringidos a español e inglés
- Fecha de publicación no anterior a 2003
- Un número mínimo de cinco citaciones previas por parte de otras fuentes académicas.
- Tipo de documento limitado a: Artículos científicos, capítulos de libro, protocolos o material académico equivalente y relevante.

Para el proceso de revisión y cribado de los artículos, se utilizó la herramienta Rayyan [13], lo cual permitió realizar una evaluación sistemática de los títulos y resúmenes, así como identificar y eliminar duplicados de manera eficiente. Posteriormente se seleccionaron 55 documentos que sirvieron como base bibliográfica y se clasificaron en cinco grupos de información:

- Fundamentos teóricos (33)
- Funcionamiento (15)
- Instrumentación (4)
- Aplicaciones (30)
- Ventajas y desventajas (10)

3. Resultados

3.1 Fundamentos de la termodinámica

La termodinámica es una ciencia, proveniente de una rama de la física, encargada del estudio de la energía, y cómo esta se manifiesta y transfiere en forma de calor y trabajo. [14]. Los sistemas en termodinámica se definen como una porción específica en el universo que es el objeto de estudio. Existen tres tipos de sistemas termodinámicos: abierto, cerrado y aislado. Un sistema abierto permite tanto el intercambio de energía como de materia con el entorno. Un sistema cerrado concede el intercambio de energía, pero no de materia y,

por último, un sistema aislado no permite el intercambio ni de energía ni de materia con los alrededores. La existencia de estos tres tipos de sistemas está ligado al concepto de pared/límite o frontera, el cual hace referencia a la "envoltura" o borde que delimita al sistema de su entorno; si ésta permite el intercambio de energía se denomina pared diatérmica, pero sí no lo hace, se conoce como adiabática. [6,14,15].

Un ejemplo para entender estos conceptos es el sistema tipo pistón adiabático, que consiste en una gran cámara cilíndrica cerrada, similar a una jeringa, separada por una pared móvil que divide dos gases. Si uno de los gases ejerce una mayor presión, debido al trabajo de expansión, podrá mover la pared, pero no habrá transferencia de energía en forma de calor al otro gas. En cambio, si la pared es diatérmica, permitirá la transferencia de calor entre ambos gases [16].

La termodinámica centra su atención en el flujo de energía, pero ¿qué es la energía? Desde la física mecánica es la capacidad que tiene un sistema para efectuar un trabajo ($w = F * x * \cos\theta$), donde la fuerza (F) aplicada sobre el objeto debe generar un desplazamiento (x) en la misma dirección que la fuerza [17]. La definición anterior es muy limitada, por lo que se hace necesario concebir al trabajo como energía transferida de manera ordenada y coordinada en un sistema que ocasiona un movimiento direccionado de las partículas constituyentes [18]. Un ejemplo de trabajo es la expansión de un gas dentro de un pistón móvil que sostiene un cuerpo, ya que el aumento de volumen del gas puede trasladar un émbolo de una posición inicial a una final, generando un movimiento de dicha masa. Otro ejemplo es una reacción química que produce una corriente eléctrica y se transporta a través de una resistencia, el trabajo generado por la reacción genera un movimiento ordenado de electrones a través de una fuerza que se le opone [15].

Adicionalmente al trabajo, el calor (q) es otra manera de transferir energía, pero involucrando un movimiento caótico/desordenado de las partículas y aunque éste obedece a la existencia de un gradiente de temperatura, cumple con la direccionalidad de flujo que va desde el punto de mayor hacia el de menor temperatura hasta alcanzar el equilibrio térmico [19]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que no todos los procesos que implican intercambio de calor son consecuencia de cambios en la temperatura del sistema. Por ejemplo, los cambios de estado son de carácter isotérmico, es decir, ocurren a temperatura constante [20]. Esto se debe a que la temperatura no representa la cantidad de energía, sino un indicador del estado térmico del sistema [20].

Hacer mención del equilibrio térmico implica definir equilibrio, el cual es un estado en el cual todos los intercambios, flujos o fuerzas entre dos sistemas se contrarrestan entre sí, anulando o compensándose mutuamente, resultando en una ausencia de cambios netos en los sistemas, por lo tanto, el equilibrio térmico hace referencia a la condición en donde todos los cuerpos que constituyen un sistema se encuentran a la misma temperatura [21]; este también se conoce como principio cero de la termodinámica [22].

La primera ley de la termodinámica establece el concepto de energía como una magnitud conservativa ya que esta no se crea ni se destruye, solo se transforma [23]. Se define matemáticamente como $\Delta U = q + w$ donde ΔU representa el cambio en la energía interna del sistema y se considera como la suma de todos los tipos de energía. [24]. A diferencia del calor y el trabajo, la energía interna ΔU (así como la entalpía ΔH, y la energía libre de Gibbs, ΔG), sí es una función de estado por lo que su valor solo depende del estado inicial y final del sistema, y no del camino que se siga para llegar de un estado a otro [25].

El cambio de entalpía (ΔH) representa una medida cuantitativa de la cantidad de energía en forma de calor intercambiada en un sistema a presión constante, por lo tanto, $\Delta H = q_p$ [1]. En una reacción química efectuada isobáricamente, el cambio de energía involucrado en la formación de un mol de compuesto a partir de sus elementos se conoce como entalpía de formación (ΔH_f). Así mismo existen otros tipos de entalpía como la de disolución (ΔH_{dis}), neutralización, combustión, etc [25]. El signo del cambio de entalpía permite evaluar si un proceso es de carácter endotérmico o exotérmico, a presión constante [14,25], sin embargo, este valor no es suficiente, por sí mismo, para explicar por qué algunas reacciones se llevan a cabo espontáneamente a una temperatura específica, por lo cual se hace necesario involucrar el concepto de la entropía, abordado desde la segunda ley de la termodinámica.

La entropía se puede entender como una medida del desorden, aleatoriedad o dispersión de la energía de un sistema. Está asociada al número de microestados posibles en los que se puede organizar un sistema y depende de la cantidad de energía en forma de calor que se cede o se obtiene, en relación con la temperatura absoluta. Matemáticamente, se expresa como $S = {}^{q}/_{T}$ en los sistemas más simples. Un ejemplo para entender el concepto de entropía es la fusión del hielo en un vaso de agua caliente; inicialmente, las moléculas de agua en el hielo están ordenadas en una red cristalina (baja entropía) pero al darse el cambio de estado, las moléculas se dispersan, aumentando el desorden y el número de microestados accesibles, generando un cambio positivo en la entropía del sistema (ΔS>0) [26].

La segunda ley de la termodinámica establece que la entropía en un proceso aislado siempre tiende a aumentar con el tiempo, por lo tanto, los procesos que ocurren espontáneamente, es decir, que ocurren sin la intervención de alguna magnitud externa, tenderán a migrar hacia un estado de mayor desorden [25]. Sin embargo, para comprender completamente este concepto es necesario considerar su valor en condiciones de orden molecular extremo. El cero absoluto es un punto teórico donde hay una ausencia casi total de energía cinética, por lo cual el movimiento molecular es casi nulo, allí la entropía de una sustancia cristalina perfecta, es decir, una estructura con el máximo orden y libertad mínima de movimientos a nivel atómico es cero, como dicta la tercera ley de la termodinámica [14]. En este orden de ideas, el valor numérico del cambio en la entropía permite predecir de alguna manera sí un proceso será espontáneo bajo ciertas condiciones al considerar que su valor sea positivo, es decir que incremente con el tiempo [26].

Otra función de estado termodinámica que da cuenta de la espontaneidad de un proceso es la energía libre de Gibbs (ΔG), que está relacionada con la cantidad de energía disponible en un sistema para realizar un trabajo, a una presión constante y a una temperatura determinada. En el contexto de la química, esta función describe la cantidad de energía útil por mol de sustancia y depende de la temperatura junto con el cambio de la entropía y la entalpía, como lo indica la siguiente ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ [27]. Si ΔG>0 el proceso no es espontáneo a esas condiciones de presión y temperatura; si ΔG<0 el proceso es espontáneo, y si ΔG=0 el sistema se encuentra en equilibrio [28]. Un ejemplo para entender el concepto de energía libre de Gibbs es un sistema donde se disuelve NaCl en un vaso de agua, la disolución se da de manera espontánea porque la entropía del sistema aumenta considerablemente debido a la disociación de los iones de sodio y cloruro en el agua, sin embargo, en este proceso la entalpía no cambia significativamente por lo cual el proceso es espontáneo porque está impulsado entrópicamente [28].

La descripción del comportamiento térmico de un sistema es importante para comprender su espontaneidad, estabilidad y naturaleza de la interacción [3]. Sin embargo, los parámetros termodinámicos no pueden medirse directamente, pero se pueden inferir

a partir de cambios del calor calculado a través de la medición de la potencia. En este sentido es esencial el uso de técnicas experimentales que permitan cuantificar el calor intercambiado, y así obtener los valores de la entalpía, entropía, energía libre de Gibbs y demás parámetros termodinámicos de un proceso [29]. Entre estas técnicas, la TIC es considerada el método por elección para la determinación de los parámetros termodinámicos en procesos químicos y físicos de naturaleza bioquímica e inorgánica como la formación de complejos de inclusión o entidades de coordinación [30].

3.2 Definición de la titulación isotérmica calorimétrica

La titulación isotérmica calorimétrica (TIC) es una de las técnicas calorimétricas a presión constante que se basa en la detección de fluctuaciones extremadamente pequeñas de señales eléctricas, como corriente, voltaje o potencia (vatios), que están correlacionadas directamente con la cantidad de calor intercambiado durante un proceso. Gracias a su alta sensibilidad, la TIC permite determinar parámetros termodinámicos fundamentales, como la constante de afinidad (Ka), los cambios en la energía libre de Gibbs (ΔG), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), junto a la relación estequiométrica (n). Lo que la convierte en una herramienta valiosa en el estudio de sistemas proteína-ligando y la investigación en la formación de complejos (Inclusión y coordinación) [5,30,31].

El término "isotérmica" se debe a que el experimento se lleva a cabo a temperatura constante, esto significa que cualquier cambio en la señal calorimétrica se debe exclusivamente a los procesos químicos o físicos que ocurren en la solución, y no a fluctuaciones de temperatura externa. Para garantizar esta isotermicidad, el calorímetro TIC está diseñado con un sistema de control térmico altamente preciso que mantiene al mínimo la diferencia de temperaturas entre una celda de referencia y la celda de estudio [5]. Para garantizar el equilibrio térmico, el instrumento proporciona o retira energía en forma de potencia térmica mediante una resistencia calefactora controlada por corriente eléctrica [17].

La palabra titulación se debe a que la metodología para llevar a cabo el experimento se asemeja a una titulación clásica, donde la interacción dentro del calorímetro se controla a través de pequeñas adiciones de agente titulante a un volumen conocido de analito, y cuando esto sucede ocurre un intercambio de energía en forma de calor, que genera una señal proporcional (cambio en la corriente) similar a la respuesta del cambio de color de un indicador o una señal detectada por un instrumento de medida como un potenciómetro [32].

3.3 Instrumentación del equipo TIC

Existen diferentes tipos de dispositivos TIC sin embargo la estructura básica del equipo se compone de las siguientes partes:

- **Celda de muestra (o estudio):** Contiene la solución del analito (por ejemplo, una proteína) y es donde se lleva a cabo directamente la titulación [29].
- **Celda de referencia:** Llena con un solvente inerte, se utiliza para equilibrar las variaciones térmicas y garantizar una medición precisa [29].
- **Sistema de inyección:** También conocido como microinyector, contiene la sustancia que funciona como ligando y adiciona los volúmenes exactos a la celda de muestra que están en el rango de los microlitros (μL) [33].
- **Paredes adiabáticas:** Impiden el intercambio de energía con el entorno, evitando la pérdida de energía al exterior, además aseguran que las reacciones ocurran a presión constante. Las paredes están en su mayoría construidas con materiales aislantes como cerámicas o polímeros [33].

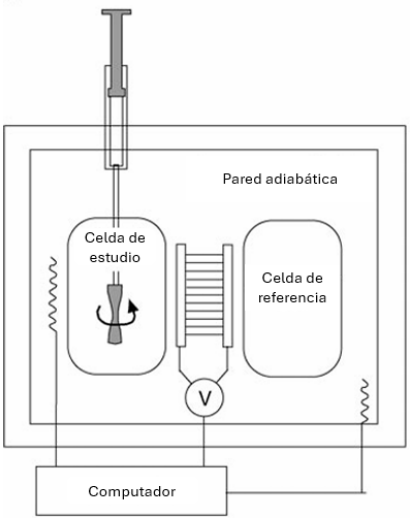


Figura 1. Estructura básica de un dispositivo TIC [7].

Además, estas celdas cuentan con diferentes tipos de sensores que permiten detectar mínimas diferencias de temperatura entre las dos celdas; por otro lado, el equipo dispone de sistemas de control térmico que permiten mantener la diferencia de temperaturas entre la celda de estudio y de referencia lo más cercana posible a cero [34].

Sensores de temperatura: Existen tres tipos de sensores utilizados generalmente en los dispositivos TIC y son capaces de medir temperaturas en el rango de micro kelvin.

- **Los termopares**: Los cuales funcionan gracias al efecto Seebeck, fenómeno termoeléctrico que genera una diferencia de voltaje cuando hay una diferencia de temperatura entre dos uniones de materiales conductores o semiconductores diferentes y donde precisamente ese voltaje es proporcional a la diferencia de temperatura [34]
- **Los detectores de temperatura por resistencia (RTD):** Funcionan a partir de una propiedad de metales como el platino, en la que la resistencia eléctrica aumenta proporcionalmente con el incremento de la temperatura [34].
- **Los termistores:** Elaborados de materiales semiconductores (componentes con conductividad eléctrica intermedia) cuya resistencia eléctrica varía con la temperatura de manera específica [34].

Sistemas de control térmico: Son los mecanismos que aseguran que las mediciones de calor sean precisas minimizando las fluctuaciones no deseadas de temperatura. Su función principal es mantener la celda de referencia y la celda de muestra en equilibrio térmico, compensando cualquier cambio inducido por la reacción química en la celda de muestra. Existen dos sistemas que son:

- **Sistemas con efecto Peltier:** Relacionado al efecto Seebeck, genera un enfriamiento de uno de los metales al aplicar una corriente eléctrica, [34].
- **Las resistencias** Funcionan incrementando su temperatura en función del flujo de corriente eléctrica que las atraviesa. Este calentamiento ocurre porque los electrones chocan con los átomos del material, transfiriendo parte de su energía cinética. [17].

Los sistemas de control térmico en la TIC aseguran que cualquier cambio de temperatura detectado sea exclusivamente consecuencia de la interacción proteína-

ligando o de la formación de complejos, permitiendo mediciones termodinámicas confiables que serán procesadas por la unidad de análisis de datos

- **Unidad de análisis de datos:** Convierte las señales térmicas en curvas de calor liberado o absorbido, permitiendo calcular parámetros termodinámicos como, la afinidad de unión (Ka), la estequiometría (n) de la reacción, y los cambios en la entalpía la entalpía (ΔH), la entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs (ΔG) [33].

3.4 Funcionamiento del equipo TIC

Para el funcionamiento de la TIC generalmente se debe seguir el siguiente proceso [31].

1. **Planeación del experimento:** Se define la concentración exacta a emplear del analito (Proteína o compuesto de interés), ya que los cálculos termodinámicos dependen directamente de la relación estequiométrica entre los componentes en solución. Una concentración incorrecta puede afectar la determinación precisa de parámetros como Ka, ΔH y ΔG [31]. Además, concentraciones inadecuadas pueden llevar a señales térmicas demasiado débiles para ser detectadas o, por el contrario, a una saturación temprana del sistema, impidiendo la correcta interpretación del proceso [35].
2. **Planeación de la titulación:** Se determina la concentración del agente titulante que actuará como "ligando", además de definir los intervalos de tiempo entre inyecciones y volúmenes a adicionar que suelen estar entre 2 - 100 μL [3].
3. **Llenado de contenedores:** Se llena la celda de muestra con el analito de interés (por ejemplo, una proteína), la celda de referencia con el mismo solvente de la celda de interés (sin la proteína), y la jeringa con el agente titulante (el ligando), posteriormente se inicia con la titulación [3].
4. **Medición de la variación térmica:** Se inicia la titulación, el equipo aplica un trabajo constante (Voltaje) para mantener al mínimo la diferencia de temperaturas entre las dos celdas; con el tiempo la temperatura empieza a variar debido a los intercambios de energía dentro de la celda de estudio, por lo que el dispositivo ajusta la cantidad de corriente eléctrica para compensar estas fluctuaciones [17].
5. **Generación de la curva de calorimetría:** Los picos se van registrando en una curva calorimétrica, que relaciona las fluctuaciones de la potencia (μJ/s o μcal/s) en función del tiempo como se observa en la figura 2. En la curva se evidencian tres etapas principales.

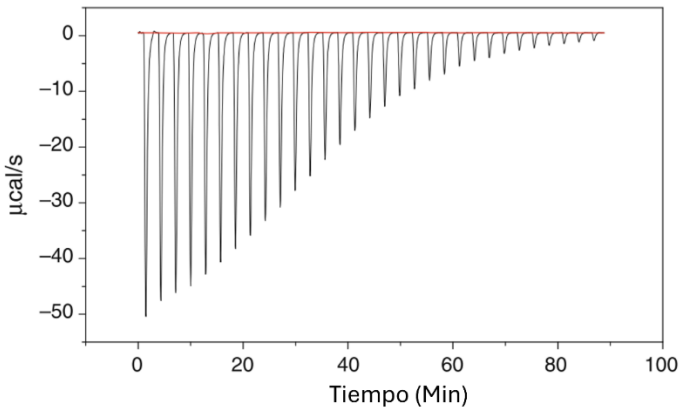


Figura 2. Ilustración general de una curva calorimétrica obtenida de un experimento TIC. [36]

- **Etapa 1:** Se mantiene una línea base estable que corresponde al trabajo constante que mantiene el equipo, como las dos celdas se encuentran en equilibrio térmico, no hay transferencias de energía y por ende no hay diferencias de temperatura [29].
- **Etapa 2:** Posteriormente se registran los primeros picos de calor, intensos debido a la gran disponibilidad de sitios de unión del analito, además, a medida que se registran más picos, se observa una tendencia a disminuir, debido a la saturación del analito [29].
- **Etapa 3:** Por último, cuando se saturan por completo los sitios de unión del analito, las inyecciones subsecuentes de titulante no generan señales significativas, por lo cual la curva vuelve a la línea base [29,30].

Ya que el equipo no discrimina entre las diferentes fuentes de variación de calor que puedan alterar la temperatura de la celda de estudio, se debe asegurar que los intercambios de energía dentro del experimento sean producto de la interacción del agente titulante con el analito, siendo necesario determinar las diferentes fuentes externas de calor y reducirlas. Una de estas fuentes es el calor de dilución, presente cuando los solutos entran en contacto con el solvente al iniciar la titulación; para minimizar este valor es necesario asegurar que ambas moléculas compartan el mismo solvente, evitando al máximo las impurezas; además estimar dichos calores de dilución (tanto para el analito, el agente titulante y el solvente) por medio de experimentos separados, permitiendo obtener el calor del blanco. Una vez obtenidos, el equipo corrige los calores intercambiados por medio de una simple ecuación $q_{corregido} = q_{calculado} - q_{Dis-ligando} - q_{Dis-Proteína} - q_{Blanco}$ [5,35].

Con lo anterior, los picos de potencia obtenidos actuarán como indicador de la ejecución de la interacción o reacción de interés.

3.5 Tratamiento de datos obtenidos por la TIC

En la Figura 2 se ilustran los picos de potencia térmica obtenidos con cada inyección de ligando al analito. El concepto de potencia (P) se refiere a la tasa a la cual se libera o absorbe calor en una interacción entre moléculas. Para determinar el calor neto involucrado en cada uno de los picos de potencia, se usa la siguiente ecuación $q = \int P * dt$, es decir se integra la potencia respecto al tiempo, lo que permite calcular el calor del proceso [5]. En términos prácticos, esto significa que el área bajo la curva de un pico en una gráfica de potencia vs tiempo representa el calor total involucrado en dicha interacción.

Al conocer el volumen de agente titulante añadido, es posible determinar su cantidad en moles, estos se pueden relacionar con el calor por inyección (q/mol). Es importante aclarar que este valor no es el cambio en la entalpía del sistema (ΔH) porque no todo el ligando inyectado se une a la proteína, este valor sólo refleja el calor por mol inyectado del agente titulante. La entalpía de unión, es decir el calor producido por las moles de complejo ligando-proteína, se calcula posteriormente a través del gráfico [7].

Luego los calores netos obtenidos son graficados en una nueva curva calorimétrica en función de la relación molar entre agente titulante y analito como se ve en la parte inferior (B) de la figura 3 [29].

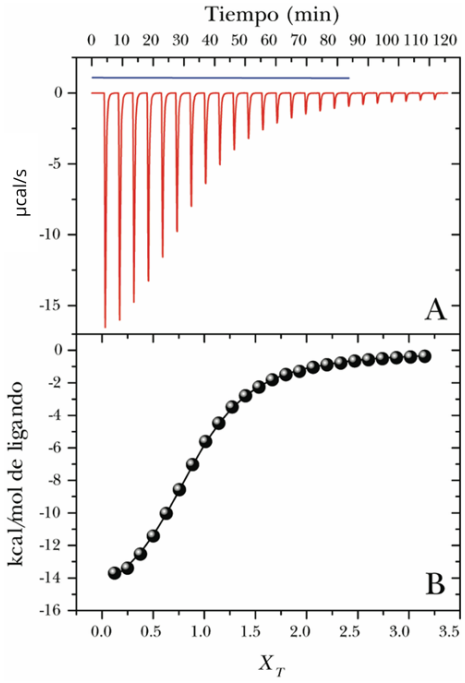


Figura 3. Ilustración general de curvas calorimétricas combinadas obtenidas en un experimento TIC. [7].

Para interpretar los datos obtenidos a partir del experimento y obtener los parámetros de ΔH y K, es necesario usar un modelo matemático de unión, que permite ajustar los datos a la curva obtenida a través de una regresión no lineal [29]. Todos los modelos parten de la ecuación química general $[Proteina] + [Ligando] \leftrightarrow [Complejo]$, a partir de esta ecuación se hace referencia a la expresión matemática de constante de equilibrio $\frac{[Complejo]}{[Proteina][Ligando]} = \frac{[PL]}{[P][L]}$. Existen diferentes modelos de unión que pueden ser utilizados por el sistema TIC, algunos de estos son:

- **Unión secuencial:** Utilizados cuando el agente titulante (Ligando) puede unirse a múltiples sitios en la molécula de analito (Proteína) y la unión de una molécula de agente titulante altera la afinidad de los siguientes sitios de unión. Este modelo de interacción genera constantes de equilibrio (o disociación) diferentes en cada etapa de la unión en el analito $K_1 = \frac{[PL]_1}{[P][L]}, K_j = \frac{[PL]_j}{[PL]_{j-1}[L]}$ donde "j" corresponde al siguiente sitio de unión [5,37].
- **Unión independiente:** Utilizados cuando el ligando puede unirse de manera independiente a múltiples sitios en la proteína, por lo cual cada sitio cuenta

con su propia constante de afinidad, y por ende con su propia fracción de sitios de unión a proteína ocupada por el ligando "θ" [5,37].

- **Un solo sitio de unión (o sitios idénticos):** Utilizado cuando una única molécula de agente titulante (Ligando) interactúa con una de analito (Proteína), modelo ideal para las interacciones proteína ligando equimolares [31].

Cabe resaltar que los dispositivos TIC cuentan con softwares especializados, como el MicroCal PEAQ-ITC, que pueden utilizar diferentes modelos que permitan ajustar los parámetros termodinámicos a los valores reales [31].

Para un modelo 1:1 con un solo sitio de unión entre ligando y proteína se parte de la siguiente ecuación $Lt = [L] + Mt(n\theta)$ (1) que permite calcular la concentración total de ligando en la celda de estudio "Lt" al sumar la concentración de ligando libre en la celda "[L]" y la concentración de ligando unida a la proteína. Para determinar este valor mencionado se relaciona la concentración total de proteína "Mt" (independientemente de que esté libre o unida al ligando); con el número de sitios de unión disponibles en la molécula "n" (único sitio de unión = 1); y con la fracción de proteína ocupada por el ligando "θ" [5].

Para determinar la fracción de proteína ocupada por el ligando en la i-ésima inyección, que es la proporción de proteína unida al ligando en relación con la proteína total, se utiliza la ecuación $\theta = \frac{[PL]}{[P]+[PL]}$ que al reemplazar $[PL] = K[P][L]$, da como resultado $\theta = \frac{K[P][L]}{[P]+K[P][L]}$ la cual se reajusta para obtener la ecuación $\theta_i = \frac{[L]ik}{1+[L]ik}$ (2). Esta ecuación se reemplaza en la (1), obteniendo $Lt = [L] + Mt(n)\left(\frac{[L]k}{1+[L]k}\right)$ donde su variación para cada inyección es $Lt_i = [L]_i + Mt(n)\left(\frac{[L]_i k}{1+[L]_i k}\right)$ (3). Para calcular "Lt" se multiplica el volumen de inyección "V_i" por la concentración inicial de ligando en el inyector "$[Lo]$" obteniendo las moles inyectadas de ligando en la celda, luego estas moles se dividen por el volumen inicial de la celda "V_o". Para las siguientes inyecciones se deben sumar las moles previamente inyectadas en la celda, calculadas a través de la multiplicación de concentración previa total de ligando en la celda de estudio "Lt_{i-1}" y el volumen corregido a través de $V_o - V_i$. Esta corrección se hace con la finalidad de compensar el aumento de volumen que supone la adición de ligando. Toda la operación para da como resultado la siguiente ecuación $Lt_i = \frac{[Lo]*V_i+Lt_{i-1}*(V_o-V_i)}{V_o}$ (4) [37].

El calor obtenido por cada inyección de ligando "qi" depende de las moles de ligando que se unen a la proteína en esa inyección. A su vez, estas moles dependen de la concentración de proteína que se unió al ligando en esa inyección, obtenida al multiplicar la "Mt" por "θ_i" y por "n". Una vez calculada esta concentración se multiplica por el "V_o" para calcular el número de moles. Por último, estas moles se multiplican por "ΔH" para obtener "qi". Toda esta operación se resume en la siguiente ecuación $qi = \Delta H * Vo * Mt * \theta_i * n$ (5). Por último, los calores netos por cada inyección se obtienen a través de $\Delta q_i = q_i - q_{i-1}$ (6). En este punto se hace el ajuste de la curva (regresión no lineal) ya que las ecuaciones 2, 3 y 5 tienen dos incógnitas, para resolverlas se asumen valores de K y ΔH, luego el modelo calcula valores de $[L]$ por medio de la ecuación 3, después se calcula θ_i por medio de la ecuación 2, posteriormente se calcula qi a través de la ecuación 5, y por los calores netos se obtienen por medio de la ecuación 6. Los valores de qi netos calculados se comparan con los experimentales, ajustando K y ΔH y repitiendo nuevamente el proceso hasta que la curva generada se ajuste a la curva experimental [37].

El valor K obtenido es la constante de equilibrio, que describe la relación entre las concentraciones de productos y reactivos en un proceso en equilibrio. En términos generales, es un valor numérico que indica la tendencia de las sustancias a permanecer juntas (Unión) o separarse (Disociación) ($K = \frac{[PL]}{[P][L]}$) en un proceso químico o físico de asociación en equilibrio. Dependiendo si se considera la formación o la separación del complejo puede interpretarse como la constante de asociación (Ka) o disociación (Kd), siempre que se tenga en cuenta que ambas están inversamente relacionadas ($Ka = {}^{1}/_{Kd}$) [21].

Para determinar la relación cuantitativa entre la proteína, el ligando y el producto (estequiometría de la reacción), se utiliza la curva calorimétrica inferior de la Figura 3 (B) [3]. El cual, por su forma, se asemeja a una curva de titulación potenciométrica. Con el método de la primera y segunda derivada se puede calcular el punto de equivalencia, punto en que la gran mayoría de sitios de acción de la proteína (analito) en solución han interactuado con el ligando (agente titulante) formando el producto (complejo proteína-ligando) [38]. Gráficamente este punto es donde se observa que se da el mayor cambio de calor frente a la relación molar del agente titulante (Ligando) y el analito (Proteína) [39]. En interacciones equimolares este punto debe estar en 1 o ser cercano a este valor.

La constante de equilibrio permite calcular la energía libre de Gibbs por medio de la ecuación $\Delta G = \Delta G° + RTLn\frac{[Productos]}{[Reactivos]}$ (7) donde R es la constante universal de los gases ideales en unidades de J/mol*κ. Teniendo en cuenta que el valor del cambio en la energía libre de Gibbs es 0 en procesos en equilibrio, se despeja la ecuación obteniendo que $\Delta G° = -RT\ln K$. Para el cálculo de ΔG se deben calcular las concentraciones de reactivos y producto teniendo en cuenta que ΔG describe el estado actual de un proceso químico o físico en comparación con el equilibrio, esto se puede hacer a través de la ecuación $\frac{[Productos]}{[Reactivos]} = \frac{[L]}{Kd}$ (8) [28] algunos autores utilizan $\Delta G°$ para el cálculo de los demás parámetros termodinámicos como se verá en el estudio de caso.

Una vez obtenido ΔG junto con ΔH (determinado en la regresión no lineal para ajustar los valores de calor de cada inyección a los reales) es posible calcular el cambio en la entropía del proceso (ΔS), a través de un despeje de la ecuación $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ dando como resultado $\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$. [26].

3.6 Estudio de caso: Termodinámica del complejo 18-crown-6 y Ba^{2+} a través de un experimento TIC

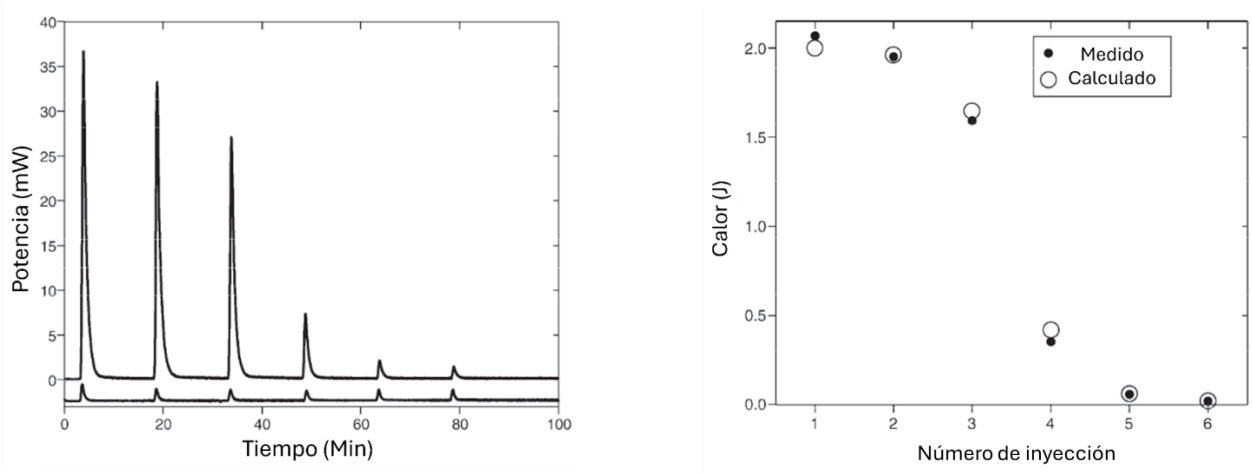
La TIC ayuda a comprender la forma en que ciertos macrociclos pueden interactuar con iones metálicos esenciales o tóxicos en el organismo. El diseño de fármacos quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético dependen de su capacidad para unirse a iones metálicos en caso de intoxicación de metales pesados [40]. Existen estudios en los que los macrociclos, como los éteres de corona, se utilizan como sistemas de liberación controlada de iones metálicos en tejidos específicos. Además, también se pueden utilizar como detectores de iones, necesarios en las terapias basadas en la regulación como la regeneración ósea. En ese sentido, los éteres corona, como el 18-crown-6, tienen la capacidad de formar complejos altamente selectivos con cationes metálicos como el Ba^{2+} por lo cual su utilidad principal es como sistema de estudio en el ámbito investigativo para moléculas transportadoras, detectoras o para estudio en la simulación de procesos de quelación de metales [41]. La presente monografía empleará ese sistema, debido a su relevancia en el campo de la investigación, para explicar el funcionamiento de la TIC [41].

La siguiente tabla corresponde a las condiciones de ejecución del experimento TIC en el artículo de Wadsö.

Tabla 1. Variables y condiciones reportadas del experimento del sistema Ba^{2+} y 18-crown-6. [41].

Sistema	Ba^{2+} y 18-crown-6
Medio	Agua
Calorímetro	Calorímetro de conducción térmica manual
[$BaCl_2$] "[Lo]"	1,000 M (En inyector)
[18-crown-6] " [Mt]"	2,000 × 10^{-2} M (En celda)
Tiempo entre inyecciones	15 minutos (No automáticas)
Temperatura "T"	295,15 K
Volumen inicial celda "Vo"	10 mL
# Inyecciones	6
Volumen de inyección "Vi"	65,5 µL

La Figura 4 (**a**) y (**b**) presenta a las curvas calorimétricas obtenidas en el estudio del complejo Ba^{2+} y 18-crown-6. Los valores en la curva 4.(**b**) están tabulados en la Tabla 2.



(a) (**b**)

Figura 4. Curvas calorimétricas obtenidas en experimento del sistema Ba^{2+} y 18-crown-6. [41]. (**a**) Los picos observados corresponden a los valores de potencia con respecto al tiempo, los picos de señal inferior corresponden a los picos de potencia generados por la dilución, mientras que la superior corresponde a los obtenidos de la formación del complejo sin corregir. (**b**) Los valores de calor corresponden a los obtenidos por la integración de la potencia donde los puntos ● corresponden al valor medido por el equipo TIC, mientras que los puntos O corresponden a los valores calculados a través de un modelo matemático aplicado en el estudio.

Tabla 2. Valores de calor reportados en el experimento TIC del sistema Ba^{2+} y 18-crown-6 [41].

Inyección	Calor de titulación experimental* (J)	Calor de dilución (J)	Calor experimental corregido** (J)
1	2,135	0,087	2,048
2	2,073	0,061	2,012
3	1,661	0,056	1,605
4	0,434	0,052	0,382
5	0,118	0,054	0,064
6	0,080	0,054	0,026

* Liberación de energía. ** Este valor corresponde a la resta del calor experimental con el calor de dilución.

El valor de "Lt" se calcula a través de la ecuación $Lt_i = \frac{[Lo]*V_i+Lt_{i-1}*(V_o-V_i)}{V_o}$, posteriormente se despeja $Lt = [L] + Mt\left(\frac{[L]k}{1+[L]k}\right)$ en términos de "$[L]$" donde se obtiene la siguiente ecuación $[L]^2K + [L](MtK + 1 - LtK) - Lt = 0$ en este proceso se obtiene una ecuación cuadrática de la forma $a[L]^2 + b[L] + c = 0$ donde: $a = k;\ b= (MtK + 1 - LtK);\ y\ c = -Lt$. Dado lo anterior se resuelve la ecuación cuadrática $[L] = \frac{-b\pm\sqrt{b^2-4ac}}{2a}$ para obtener el resultado de la concentración de ligando libre en la celda en cada inyección [31]. Posteriormente se usa las ecuaciones $\theta_i = \frac{[L]ik}{1+[L]ik}$; $qi = \Delta H * Vo * Mt * \theta_i * n$; y $\Delta q_i = q_i - q_{i-1}$ para obtener los valores de calor por inyección.

Tabla 3. Resultados de las variables obtenidas con el modelo de estudio aplicado en TIC del presente estudio de caso [41].

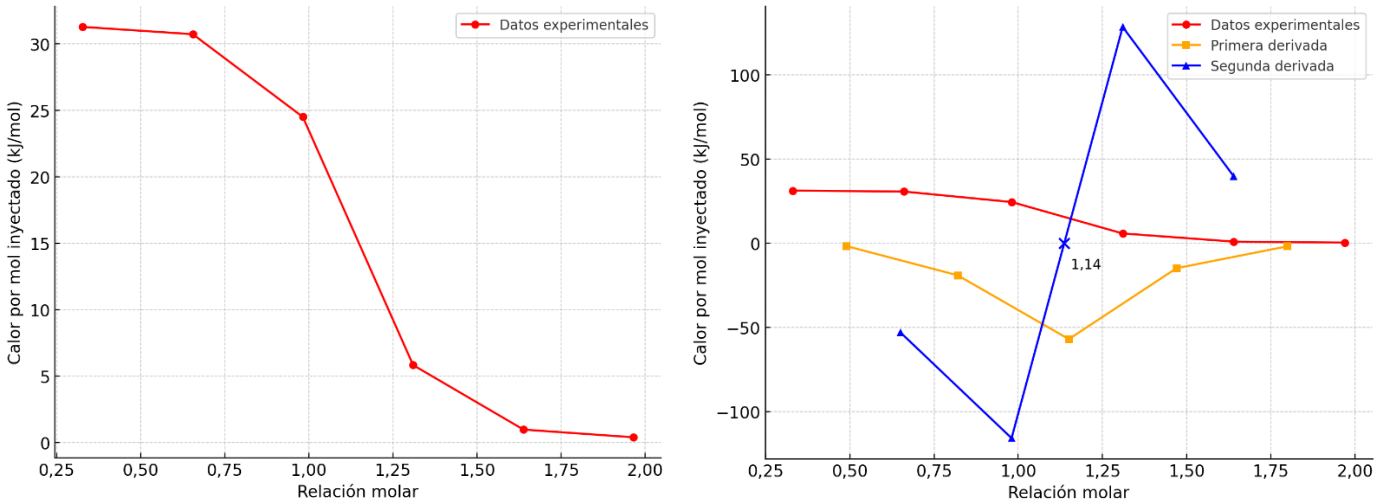
Inyección	Concentración total de ligando en la celda Lt (M)	Concentración de ligando libre [L] (M)	Fracción de proteína ligada θ	Calor liberado acumulado qi (J)	Δq_i Calor simulado (J)	Calor experimental corregido (J)
1	6,55x10^{-3}	6,78x10^{-5}	0,324	2,003	2,003	2,048
2	1,31x10^{-2}	2,52x10^{-4}	0,640	3,957	1,954	2,012
3	1,95x10^{-2}	1,38x10^{-3}	0,907	5,606	1,649	1,605
4	2,59x10^{-2}	6,38x10^{-3}	0,978	6,046	0,440	0,382
5	3,23x10^{-2}	1,25x10^{-2}	0,989	6,111	0,065	0,064
6	3,87x10^{-2}	1,88x10^{-2}	0,993	6,134	0,023	0,026

Como se puede observar en las dos últimas columnas de la Tabla 3, los calores obtenidos por ambas estrategias (Simulada y experimental) son similares ya que mantienen la forma sigmoidal de la curva (como la de la Figura 3 (B)), lo cual sugiere que la interacción de estudio reportada en el artículo corresponde a una de unión 1:1 con un solo sitio de unión.

Debido a que el artículo no incluye la gráfica que relaciona los valores de calor experimentales por mol inyectadas de agente titulante en función de la relación molar entre agente titulante y analito, se calcularon las moles de ligando acumulados en cada inyección (teniendo en cuenta que las moles inyectadas en cada inyección fueron de 6,55x10^{-5} mol) y los moles iniciales de proteína (2,00 x10^{-4} mol) la construcción de las Figura 5 (**a**) y (**b**) de autoría propia junto a la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados calculados para la curva calorimétrica utilizada para la obtención del punto de equivalencia [41].

Inyección	Calor de titulación (J)	Moles de ligando acumuladas (mol)	Calor por mol de ligando inyectado (No acumulado) (kJ/mol)	Relación molar (Ligando acumulado/Iniciales de proteína)
1	2,048	6,55x10^{-5}	31,27	0,327
2	2,012	1,31x10^{-4}	30,72	0,655
3	1,605	1,96x10^{-4}	24,50	0,982
4	0,382	2,62x10^{-4}	5,83	1,310
5	0,064	3,27x10^{-4}	0,98	1,638
6	0,026	3,93x10^{-4}	0,40	1,965



(**a**) (**b**)

Figura 5. (**a**) Curva calorimétrica obtenida a través de los resultados experimentales del sistema Ba^{2+} y 18-crown-6. (**b**) Gráficas de primera y segunda derivada obtenidas a partir de la curva calorimétrica con el punto de equivalencia "n" [41].

Los parámetros termodinámicos obtenidos se encuentran calculados en la Tabla 5 que describen el comportamiento energético del sistema.

Tabla 5. Resultados de los parámetros termodinámicos de la formación del complejo Ba^{2+} y 18-crown-6 [41].

Parámetro termodinámico	Resultado	Cálculo
n	1,14	Método de la primera y segunda derivada
K	7070	Obtenida por la regresión no lineal de los puntos de calores teóricos ajustados a los experimentales, confirmación: $\theta_i = \frac{[L]ik}{1+[L]ik} \rightarrow K = \frac{\theta_i}{(1-\theta_i)*[L]i} \rightarrow K = \frac{0{,}324}{(1-0{,}324)*6{,}78x10^{-5}M} \rightarrow K = 7069$
ΔH°	-30,9 kJ/mol	Obtenida por la regresión no lineal de los puntos de calores teóricos ajustados a los experimentales, confirmación: $qi = \Delta H° * Vo * Mt * \theta_i * n \rightarrow \Delta H° = \frac{qi}{Vo * Mt * \theta_i * n}$ $\Delta H° = \frac{2{,}003\,J}{0{,}01\,L * 0{,}020M * 0{,}324 * 1} \rightarrow \Delta H° = 30910J/mol \sim 30{,}9kJ/mol$
ΔG°	-22,0 kJ/mol	$\Delta G° = -RTlnK \rightarrow \Delta G° = -\left(8{,}3145\frac{J}{mol \cdot K}\right)(295{,}15\,K)\,ln\,7070$ $\Delta G° = -21752\,J/mol \sim 22{,}0kJ/mol$
ΔS°	-0,030 kJ/mol·K	$\Delta S° = \frac{\Delta H° - \Delta G°}{T} \rightarrow \Delta S° = \frac{-30{,}9\frac{kJ}{mol} - \left(-22{,}0\frac{kJ}{mol}\right)}{295{,}15\,K} \rightarrow \Delta S° = -0{,}030\,{}^{kJ}/_{mol \cdot K}$

La relación estequiométrica del proceso de asociación (1,14) confirma que el sistema 18-crown-6 y Ba^{2+} presenta una relación equimolar, además refleja las desviaciones experimentales típicas en cualquier experimento analítico como imprecisiones en la concentración, preparación de soluciones o ajuste de datos [41]. El valor elevado de K indica que, en el equilibrio, la formación de complejo 18-crown-6 y Ba^{2+} esta favorecido, evidenciando una unión fuerte y específica mediada por enlaces de coordinación. Esto sugiere que derivados de 18-crown-6, capaces de mantener una afinidad similar a metales pesados, y que generen procesos de asociación espontáneos; podrían considerarse como candidatos prometedores en el diseño de fármacos [42].

Los parámetros termodinámicos calculados son indicativos de reacciones de formación de complejos de coordinación, dado que el valor de ΔH° indica que el proceso es muy exotérmico, a diferencia de las interacciones intermoleculares, que, aunque sean de carácter exotérmico, son mucho menos intensas. Valores negativos de ΔS° indican un aumento en el orden del sistema asociado a la formación del enlaces, reflejando una ligera pérdida de libertad, mientras que, en las interacciones intermoleculares ΔS° puede ser tanto positivo como negativo [43]. Corroborar la formación de enlaces es esencial en el desarrollo de matrices de transporte de fármacos, ya que son más estables frente a los cambios de ambientes fisiológicos. Además, que la asociación sea espontánea es ideal para fármacos quelantes, ya que indica que estos pueden unirse al metal de interés sin la necesidad de aportes externos de energía, en las condiciones adecuadas [40].

3.7 Aplicaciones de la TIC en el estudio de interacciones Proteína-Ligando equimolares

Las interacciones proteína-ligando comprenden diferentes sistemas, como los fármacos con su diana terapéutica, las hormonas con su receptor, e incluso sistemas proteína – proteína. Los parámetros termodinámicos permiten inferir información clave sobre el comportamiento de los sistemas proteína – ligando, dependiendo del contexto del experimento. Se debe tener en consideración si la asociación se da por interacciones intermoleculares (como puentes de hidrógeno o fuerzas de fuerzas de van der Waals), o se da por la formación y ruptura de enlaces [4]. Por ejemplo, la formación de enlaces covalentes es típico de procesos de unión irreversible, mientras que la asociación por interacciones intermoleculares es característica de uniones reversibles [40]. La tabla 6 corresponde a un resumen de diferentes artículos, donde se muestran la utilidad de los parámetros termodinámicos obtenidos por TIC en diferentes sistemas proteína-ligando.

Tabla 6. Aplicaciones de los parámetros termodinámicos obtenidos por TIC en el estudio de interacciones proteína-ligando equimolares.

Nombre del estudio	Sistemas	Parámetro Termodinámico	Utilidad	Ref.
Label-free determination of protein-ligand binding constants using mass spectrometry and validation using surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry	Sulfanilamida (Sul) – hCAI Etoxzolamida (Eto) - hCAI	Kd = 146 Kd = 0,0073	Las evaluación de fuerza de unión a través de la Kd permite definir las dosis y potencia del fármaco al calcular la concentración necesaria para que este se una a la mitad de hCAI. Kd más pequeñas, como el de "Eto", indican menos cantidad de fármaco para para lograr el efecto, es decir, una mayor potencia.	[8]
Gibbs Free Energy and Enthalpy–Entropy Compensation in Protein–Ligand Interactions	Transferrina – Estradiol Anhidrasa carbónica II - Acetazolamida α-Cristalina HS - Histonas	ΔG° = −44,3 kJ/mol ΔG° = −43,3 kJ/mol ΔG° = −43,0 kJ/mol	Los compuestos con un valor más negativo de ΔG suelen formar interacciones más estables, característica importante para el estudio de transportes alternativos de hormonas como Transferrina-Estradiol, en este contexto es un sistema ligeramente más estable lo cual lo haría la mejor opción para determinar sistemas de entrega de hormonas.	[44]
Extreme entropy-enthalpy compensation in a drug-resistant variant of HIV-1 protease	VIH-1 (WT) – Darunavir VIH-1 (Act) - Darunavir VIH-1 (Flap+) - Darunavir	ΔG° = −15,0 kcal/mol ΔH° = −12,1 kcal/mol -TΔS° = −3,1 kcal/mol ΔG° = −13,4 kcal/mol ΔH° = −10,0 kcal/mol -TΔS° = −3,7 kcal/mol ΔG° = −14,0 kcal/mol ΔH° = 2,0 kcal/mol -TΔS° = −16,2 kcal/mol	En el diseño racional de fármacos la comparación de diferentes parámetros termodinámicos permite evaluar cómo las mutaciones en el sitio activo de VIH-1 afectan la interacción con un mismo inhibidor. La variante (Flap+), al igual que las demás, es espontánea (ΔG°<0) sin embargo es mediada mayormente por -TΔS (Termino entálpico de la entropía), dado lo	[45]

			anterior darunavir es un fármaco que puede aprovechar cambios entrópicos para ejercer su efecto inhibitorio.	
Isothermal Titration Calorimetry Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry	Tripsina pancreática porcina (TPP) - Inhibidor de soya ITS (pH 4,5) Tripsina pancreática porcina (TPP) - Inhibidor de soya ITS (pH 8,0)	$Ka = 1,5 \times 10^6$ $\Delta H° = -8,4$ kcal/mol n = 1,26 $Ka \sim 10^{10}$	Los valores altos de Ka permiten identificar la actividad enzimática de un mismo sistema con un inhibidor a diferentes condiciones, como los cambios de pH. Valores demasiado grandes, como el obtenido a pH 8, indican un fallo en la inhibición, es decir sobre actividad enzimática, la cual incluso no permite el cálculo de los demás parámetros.	[30]
Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions	Epigallocatequina galato (EGCG) - β-Amiloide (Aβ42) (NaCl 0 a 200 mM)	$\Delta G = -22,96$ a $-19,75$ kJ/mol $\Delta H = -30,78$ a $-13,58$ kJ/mol $-T\Delta S = 8,68$ a $-6,17$ kJ/mol	Los diferentes parámetros termodinámicos permiten evaluar la estabilidad del sistema en diferentes condiciones de fuerza iónica. A mayor fuerza iónica, la estabilidad se mantiene relativamente constante según ΔG espontáneo, gracias a la contribución entrópica. Por lo cual EGCG sería un candidato adecuado ya que es robusto frente a los diferentes cambios de fuerza iónica del entorno fisiológico.	[7]
Impact of protein and ligand impurities on ITC-derived protein–ligand thermodynamics	ARNt-Guanina transglicolizada (TGT) – Inhibidor puro (lin-benzoguaninas) ARNt-Guanina transglicolizada (TGT) – Inhibidor impuro (lin-benzoguaninas)	n = 0,88 $\Delta G = -42,2$ kJ/mol $\Delta H = -78,3$ kJ/mol $-T\Delta S = 36,1$ kJ/mol n = 2,23 $\Delta G = -42,4$ kJ/mol $\Delta H = -27,3$ kJ/mol $-T\Delta S = -15,1$ kJ/mol	El cálculo de todos los parámetros termodinámicos permite detectar la presencia de impurezas y contaminación en fármacos, ya que a pesar de que los valores de ΔG son similares, el valor "n" en sistemas equimolares siempre debe ser cercano a 1; además variaciones muy grandes de ΔH y -TΔS en las mismas condiciones indican diferentes mecanismos de asociación y por ende la presencia de otros compuestos en el inhibidor.	[46]
Isothermal titration calorimetry for characterization of recombinant proteins	Inhibidor 17-AAG - Hsp90α (chaperona) (Plegamiento A) Inhibidor 17-AAG - Hsp90α (chaperona) (Plegamiento B)	$Ka = 10^8$ n ~ 1,0 $\Delta H = -54,0$ kJ/mol $Ka = 10^6$ n ~ 1,0 $\Delta H = -36,5$ kJ/mol	El estudio de como el plegamiento de proteínas afecta su actividad es clave en la efectividad de los fármacos, a pesar de que ambas proteínas exhiben comportamientos equimolares (n ~ 1,0) el plegamiento A el valor de Ka se incrementa debido a una mayor fuerza de unión y una mayor liberación de energía (ΔH) producto de la formación de enlaces. Por lo cual el inhibidor I17-AAG será más efectivo con el plegamiento A que con el B.	[32]

3.8 Aplicaciones de la TIC en el estudio de la formación de complejos equimolares

En los complejos equimolares se contempla la presencia de diferentes tipos, como aquellos formados por interacciones intermoleculares como los complejos de inclusión, y aquellos que involucran la formación de enlaces de coordinación, como las entidades de coordinación [36,42]. Esta diferenciación es importante ya que algunos medicamentos antitumorales dependen de la formación de enlaces de coordinación para generar su efecto terapéutico [10]. Mientras que la inclusión de medicamentos con ciclodextrinas puede mejorar sus propiedades biofarmacéuticas como la solubilidad [12]. En este contexto, los parámetros termodinámicos pueden brindar información en los dos tipos de procesos químicos y físicos de asociación. La tabla 7 corresponde a un resumen de

diferentes artículos, donde se muestran la utilidad de los parámetros termodinámicos obtenidos por TIC en la formación de diferentes complejos.

Tabla 7. Aplicaciones de los parámetros termodinámicos obtenidos por TIC en el estudio de formación de complejos de inclusión y entidades de coordinación equimolares.

Nombre del estudio	Complejos	Parámetro termodinámico	Utilidad	Ref.
Measuring benzohydroxamate complexation with Mg2+, Mn2+, Co2+, and Ni2+ using isothermal titration calorimetry	Benzohidroxamato (BzH) - Mg^{2+}	Ka = 83 ΔH = 1,24 kcal/mol ΔS = 0,6 cal/mol ·K	Desarrollo de fármacos inhibidores selectivos de metaloenzimas, ya que la Ka, varía en función del ion, por lo cual es posible determinar inhibidores con valores altos de Ka que serán más selectivos por ejemplo al Ni^2, ión metálico utilizado por metaloenzimas de microorganismos patógenos. Además de observar que dichos complejos son de carácter endotérmico, sin embargo, el gran aumento en ΔS puede contribuir a la formación de la asociación a pesar del aumento positivo ΔH que es desfavorable para la asociación.	[42]
	Benzoylfosfonato (BzP) - Ni^{2+}	Ka = 515 ΔH = 7,3 kcal/mol ΔS = 377 cal/mol ·K		
Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with drugs	β-Ciclodextrina (β-CD) - Bromfeniramina	Ka = 1,44× 10^3 ΔH = −3,70 kcal/mol -TΔS = -0,61 kcal/mol	Los valores relativamente altos de Ka pueden ser aprovechados para generar sistemas de liberación controlada con ciclodextrinas. Además, la característica exotérmica (ΔH<0) es indicativo de una fuerte interacción que puede ser clave en que el fármaco pueda soportar las variaciones del medio fisiológico. A su vez valores de -TΔS negativos indican la tendencia al desorden del sistema, por lo cual los cambios en las condiciones pueden aprovecharse para aumentar el desorden y estimular la liberación del complejo de Bromfeniramina.	[36]
	β-Ciclodextrina (β-CD) - Ciclopentolato	Ka = 2,04× 10^3 ΔH = -6,56 kcal/mol -TΔS = 2,05 kcal/mol		
Isothermal titration calorimetry method for determination of cyclodextrin complexation thermodynamics between artemisinin and naproxen under varying environmental conditions	Naproxeno (pH 2 a 25 °C) –HPBCD	Ka = 6521 ΔG° = −5205 cal/mol ΔH° = −3185 cal/mol ΔS° = 6,76 cal/mol·K	Los parámetros termodinámicos pueden ser utilizados para evaluar la estabilidad de complejos según si su forma neutra o ionizada donde el Ka más alto es un indicio de dicha estabilidad, por lo cual el complejo más estable es el naproxeno. Además de que es el complejo más exotérmico, más espontáneo, aunque tiende menos al desorden por la formación de interacciones.	[47]
	Naproxenoato (pH 10 a 25 °C) – HPBCD	Ka = 1033 ΔG° = −4110 cal/mol ΔH° = −1498 cal/mol ΔS° = 8,76 cal/mol·K		
Calorimetric studies of ternary complexes of Ni(II) and Cu(II) nitrilotriacetic acid and N-acetyloligohistidines	Ni^{2+} nitrilotriacetato (NTA) – N-acetilhexahistidina (His_6)	n = 0,91 ΔG = −23,66 kJ/mol ΔH = −28,53 kJ/mol ΔS = −16,3 J/mol ·K	Los valores de n cercanos a 1, ΔH muy negativos y ΔS negativos son característicos de enlaces específicos dirigidos en formación de complejos de coordinación. Estas características son útiles para el estudio de bioensamblajes mediado por metales para el diseño de sistemas de diagnóstico y terapia (Teranósticos) ya que se basan en la formación de complejos de coordinación.	[48]
	Cu^{2+} nitrilotriacetato (NTA) – N-acetilhexahistidina (His_6)	n = 0,92 ΔG = −25,91 kJ/mol ΔH = −47,23 kJ/mol ΔS = −71,5 J/mol·K		
Perfil termodinámico del sistema metformina-vanadilo por calorimetría de titulación isotérmica	Metformina (Mtf) - Ion vanadilo (VO^{2+})	logKa = 3,52 ΔG° = −4,81 kcal/mol ΔH° = −0,20 kcal/mol -TΔS° = -4,61 kcal/mol	En el proceso de mejora de la actividad biológica de fármacos a través de la complejación con iones de metales, es importante determinar los parámetros	[49]

			termodinámicos para entender la naturaleza de formación del complejo, que en este caso es espontánea (ΔG°<0), y más favorecida entrópicamente que entálpicamente (-TΔS° <0), que muestra las intensidad en Ka típica un enlace de coordinación.	
Estudio de la inclusión de diflunisal en 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina	Diflunisal aniónico (Dif^-) – 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (2HP-βCD)	ΔG° = −5,24 kcal/mol ΔH° = −3,14 kcal/mol -TΔS° = -2,20 kcal/mol	Análisis de la espontaneidad (ΔG<0) en formación de complejos de inclusión para la mejora de propiedades biofarmacéuticas. Favorecida tanto entrópica (ΔH°<0) como entalpicamente (-TΔS°<0) lo cual es ideal en procesos de producción ya que el proceso será más robusto frente a la variación en las condiciones, facilitando que sea escalable y reproducible.	[50]
Thermodynamic determination of the binding constants of angiotensin-converting enzyme inhibitors by a displacement method	s-ECA – Enalapril (293,8 K) s-ECA – Captopril (293,8 K)	Ka = 6,2 × 10^8 ΔG = −49,2 kJ/mol ΔH = 32,9 kJ/mol ΔS = 279,4 J/mol·K Ka = 7,5 × 10^7 ΔG = −44,0 kJ/mol ΔH = 31,7 kJ/mol ΔS = 258,4 J/mol·K	Estudio de la efectividad terapéutica entre fármacos, en este caso enalapril sería más efectivo ya que su unión con s-ECA es más espontánea (ΔG) y cuenta con una mayor afinidad (Ka), un mayor impulso para unirse debido al desorden (ΔS) teniendo en cuenta que ambos sistemas son endotérmicos (ΔH).	[9]
Cisplatin Destabilizes RNA : DNA Hybrid Structures and Inhibits RNA Function in a CRISPR Model System	ARN - ADN de 12 pares de bases sin cisplatino ARN - ADN de 12 pares de bases con cisplatino	Ka = 6,96 × 10^7 Kd = 14,4 Ka = 2,30 × 10^7 Kd = 43,5	Otra manera de evaluar la efectividad, especialmente en medicamentos antitumorales, es comparar cómo los pares de bases de ADN se unen al ARN en presencia del fármaco, al aumentar la Kd, aumenta ligeramente la tendencia del complejo a disociarse, efecto deseable con el cisplatino.	[10]

3.9 Comparación de la TIC frente a técnicas calorimétricas

Una de las principales técnicas con las que suele compararse la TIC en el análisis de interacciones moleculares y formación de compuestos es la calorimetría diferencial de barrido (CDB). Esta última técnica permite detectar transiciones térmicas como la fusión, cristalización, etc; A través de estas transiciones se puede obtener datos como la entalpia y temperatura de transición, o la pureza y estabilidad de sustancias [6]. Funciona al calentar compuestos a una tasa de temperatura controlada, permitiendo asociar el calor intercambiado con la transición térmica de, por ejemplo, una proteína. Al igual que la TIC, la CDB emplea dos celdas para comparar la muestra con una referencia; sin embargo, su principal diferencia radica en que requiere calentar ambas celdas de manera uniforme, detectando así las variaciones de calor provocadas por cambios de estado [51].

Aunque ambas técnicas suministran energía para equilibrar las diferencias de temperatura entre las celdas, la TIC no necesita aplicar un calentamiento continuo, lo que le permite operar con una instrumentación más sencilla y precisa, capaz de detectar y corregir pequeñas variaciones térmicas durante el experimento [52]. Además de las diferencias instrumentales entre la TIC y la CDB, se tiene que los parámetros que se pueden obtener de cada una son distintos. Por ejemplo, la CDB permite determinar la temperatura y entalpía de desnaturalización de una molécula, información valiosa en estudios de estabilidad térmica. Por su parte, la TIC no brinda estos parámetros, pero sí tiene la ventaja de determinar directamente la constante de afinidad y ΔH, en un solo experimento; además de calcular con bastante exactitud el valor de la ΔS, lo que permite

estudiar interacciones moleculares específicas y diferenciar tipos de enlace o interacción, lo cual no puede lograrse directamente mediante la CDB [35]. No obstante, uno de los inconvenientes de la TIC es el uso de modelos matemáticos más complejos para interpretar los datos, a diferencia de la CDB, que se basa en el análisis de picos de calor en función del aumento de temperatura, lo cual simplifica su tratamiento de los datos [51].

Otra técnica útil de comparación con la TIC, que puede ser considerada como su "predecesora", es la microcalorimetría en solución (MCS). Esta técnica mide el calor asociado a una reacción o mezcla en solución, pero sin realizar una titulación como tal que controle la interacción [53].Dado lo anterior, la TIC cuenta con varias ventajas respecto a la MCS. Una de las principales es la determinación de todos los parámetros termodinámicos en un solo experimento. Por su parte la MSC no cuenta con una metodología para el cálculo de la relación estequiométrica de la interacción, además la MSC requiere múltiples experimentos a distintas concentraciones para estimar la constante de afinidad, y además debe asumir modelos de unión simples (como 1:1) para calcular ΔG y ΔS, lo que puede limitar su precisión. Por el contrario, la TIC permite determinar estos modelos de manera directa [52]. En contraparte se debe mencionar que la MCS cuenta con una instrumentación aún más sencilla que la TIC ya que solo requiere una cámara adiabática y sensores térmicos para detectar el calor liberado o absorbido durante la interacción. Esta simplicidad ha permitido el desarrollo de calorímetros con sensores altamente sensibles, capaces de detectar cambios mínimos de energía. Además, su diseño experimental es más fácil de implementar en comparación con los protocolos que exige la TIC [53].

3.10 Comparación de la TIC frente a técnicas no calorimétricas

La TIC es una técnica de medición directa de los parámetros termodinámicos, lo que le da la ventaja de obtener resultados más relevantes, debido al mínimo uso de formalismos y a su enfoque de intercambio de calor. Por ejemplo, técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN), pueden estimar la relación estequiométrica de la asociación observando el punto de saturación de los desplazamientos químicos (Shift) [52]. Dichos desplazamientos reflejan el entorno químico del núcleo (^{1}H o ^{13}C), por lo que al añadir ligando se altera el ambiente electrónico de los núcleos cercanos, esto se registra en ppm; al continuar con la adición de ligando eventualmente se llega a un punto de saturación donde las señales en ppm se mantienen constantes, por lo cual, si se conocen las moles adicionadas de ligando y las iniciales de proteína, se puede hacer una relación molar para determinar el valor de n. Sin embargo, este valor no llega a alcanzar el nivel de precisión y exactitud que ofrece la TIC [7].

La TIC es una técnica con alta sensibilidad, incluso en procesos con constantes de afinidad bajas, ya que es capaz de detectar los mínimos cambios de temperatura involucrados y cuantificar así los parámetros termodinámicos de la interacción [54]. Esto es especialmente útil dado que los intercambios de calor generados en muchas interacciones de interés bioquímico son mínimos y los intervalos de temperatura que se pueden explorar también son reducidos [52]. En tales casos, los métodos espectroscópicos como la fluorescencia pueden no ser adecuados ya que, para determinar constantes de equilibrio o entalpías, se requieren experimentos a distintas temperaturas, además aplicar modelos matemáticos adicionales como la ecuación de van't Hoff [52].

Además, la TIC ofrece una ventaja significativa al permitir el análisis de matrices turbias, como matrices celulares, donde métodos ópticos como la espectroscopía de fluorescencia (EF) fallan debido a la interferencia [55]. En contraste, la flexibilidad de la TIC permite estudiar interacciones moleculares en condiciones que representan

adecuadamente a las fisiológicas, logrando resultados más representativos [55]. Otra ventaja importante de la TIC es que no requiere una modificación previa de las moléculas a analizar a diferencia de otras técnicas como la RMN, que exige el marcado isotópico con ^{13}C, o la microscopía de fuerza atómica (MFA), que requiere inmovilizar las proteínas sobre superficies sólidas como placas de metales. Estas modificaciones alteran las propiedades moleculares y pueden afectar las interacciones reales y derivar en resultados poco fiables [7]. No obstante, es importante señalar que la TIC no busca sustituir a los ensayos biológicos tradicionales. Algunos procesos moleculares, como la glicosilación, pueden no generar un cambio detectable en el calor de interacción, aunque sí alteren otras propiedades clave como la estabilidad, inmunogenicidad o biodisponibilidad del compuesto, aspectos relevantes en el desarrollo de medicamentos [32]. Por lo tanto, el valor de la TIC radica en ser una técnica complementaria a los ensayos biológicos y técnicas analíticas más complejas como RMN, especialmente útil en etapas preclínicas para la caracterización termodinámica de compuestos que han sido modificados para mejorar sus propiedades [7].

3.11 Limitaciones de la TIC

Una de las limitaciones más notorias de la TIC es que se debe tener precaución con la presencia de interferentes que puedan generar variaciones indeseables en el calor medido, como la entalpía de mezcla o de disociación. Aun así, es posible estimar y corregir estas contribuciones durante el análisis mediante los ajustes adecuados dentro del software del equipo [5,35].Por otro lado los largos tiempos de agitación a ciertas temperaturas pueden generar inestabilidad en compuestos sensibles, como las proteínas, alterando los resultados. Por ello, no se recomienda el uso de TIC en sistemas que contienen proteínas fácilmente degradables, además, se deben evitar reacciones indeseadas como las de oxidación-reducción que puedan producirse en el medio, que alteren los datos obtenidos [32].

Los costos de mantenimiento y adquisición de un instrumento TIC son un poco más altos en comparación con técnicas como la MCS o la EF debido al grado de sensibilidad que deben alcanzar los sensores y la complejidad del sistema de análisis de datos [33]. Sin embargo, representa un menor costo frente a equipos más complejos como la RMN. Finalmente, ya que la TIC y la CBD cuentan con una instrumentación parecida, los costos tienden a ser similares [40]. Frente a la dificultad general de manejo, la TIC es una de las técnicas más complejas debido a los conocimientos previos que se deben tener para la interpretación de los resultados, así como su manejo adecuado ya que la única técnica que llega a igualar su complejidad es la RMN, mientras que técnicas como la CDB, EF o MCS son más sencillas en cuanto a su manejo, obtención e interpretación de datos [40,53].

Tabla 8. Resumen general de la comparación de TIC frente a otras técnicas calorimétricas y no calorimétricas.

	Nombre de la técnica				
Parámetro	**Titulación isotérmica calorimétrica (TIC)**	**Calorimetría diferencial de barrido (CDB)**	**Microcalorimetría en solución (MCS)**	**Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**	**Espectroscopía de fluorescencia (EF)**
Señal	Potencia térmica	Diferencia de flujos de calor	Flujo de calor entre la muestra y el entorno	Intensidad de la magnetización inducida en función del desplazamiento químico (δ).	Intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de emisión
Ka/Kd	Directa	Indirecta (Multiexperimento)	Indirecta (Multiexperimento)	Indirecta (Multiexperimento)	Indirecta (Multiexperimento)

Rangos de valores de afinidad	1 nM – 100 μM	No aplica	1 μM – 1 mM	1 μM – 10 mM	nM – μM
ΔH, ΔS, ΔG	Directa (ΔH, ΔS, ΔG)	Directa (ΔH)	Directa (ΔH) de transición	Indirecta (ΔH, ΔS, ΔG) (Multiexperimento)	Indirecta (ΔH, ΔS, ΔG) (Multiexperimento)
Estequiometria (n)	Directa	No medida	No medida	Indirecta	No medida
Aplicación principal	Perfil termodinámico de la interacción	Estabilidad térmica de moléculas	Análisis superficial de interacción	Análisis estructural de moléculas	Cribado de moléculas y cambios conformacionales
Unidad de análisis de datos	Software especializado para la obtención de los parámetros termodinámicos	Software que interpreta transiciones térmicas	Software limitado o interpretación manual	Software avanzado para la asignación de señales y picos.	software de adquisición y análisis espectral.
Tiempo de experimento	30 – 60 min	30 – 90 min	10 – 30 min	< 15 min	< 10 min
Complejidad de interpretación	Compleja	Simple	Simple	Compleja	Simple
Modificación de la muestra	No requerido	No requerido	No requerido	Requerido	Requerido
Efectividad en análisis de matrices turbias	Adecuado	Adecuado	Adecuado	No adecuado	No adecuado
Posibilidad de recuperación de la muestra	Si	No	Si	No	No
Costos de adquisición (COP)*	$331.939.200 – $622.386.000	$248.954.400 – $497.908.800	$165.969.600 – $373.431.600	>$2.074.620.000	$82.984.800 – $248.954.400
Costos de mantenimiento mensual (COP)*	$20.746.200 – $41.492.400	$12.447.720 – $29.044.680	$4.149.240 – $12.447.720	$62.238.600 – $124.477.200	$2.074.620 – $8.298.480

* La información de los costos fue obtenida de los artículos revisados manuales y páginas de adquisición de equipos como Malvern Panalytical (MicroCal) [56], Oxford Instruments NMR [57], Thermo Fisher Fluorescence Instruments [58].

3.12 Aplicaciones innovadoras de la TIC en farmacia

La TIC se utiliza para la evaluación de similitud de biosimilares, en un estudio para evaluar el Trastuzumab, un medicamento biosimilar, con su producto de referencia a través de los parámetros termodinámicos. Esto es de suma importancia ya que la actividad biológica de este anticuerpo depende de su capacidad de reconocer y unirse a ciertos receptores Fcy [32]. El proceso de elaboración de este tipo de biológicos es exhaustivo, debido a la complejidad de las proteínas, por lo que es difícil asegurar la repetibilidad en su producción [44].

En el campo de la nanotecnología farmacéutica la TIC ha desempeñado un papel importante en el estudio de la afinidad entre fármacos y nanopartículas, para mejorar el reconocimiento por receptores presentes en membranas celulares [11]. En un experimento se evaluó la interacción entre dextrano y doxorrubicina en el tratamiento del cáncer, mientras que en otro se estudió la interacción de liposomas con xantano y galactomanano para la liberación sostenida de factor de crecimiento epidérmico. Los valores de entalpía obtenidos permiten concluir que las moléculas de xantano son atraídas con mayor fuerza a los liposomas, debido a la diferencia de cargas entre ambas superficies [59].

La investigación de nuevos sistemas inteligentes de liberación involucra a la TIC. En un estudio donde se desarrolló un complejo supramolecular, la TIC permitió examinar la formación y disociación reversible del complejo bajo diferentes condiciones de pH [48]. Gracias a estos datos, es posible diseñar fármacos con capacidad de activarse o inactivarse según el entorno químico, lo que reduce su toxicidad y mejora su selectividad. [60]. Por otro lado, las ciclodextrinas están siendo utilizadas como complejos de inclusión para el ácido ferúlico, aditivo alimentario antioxidante – antimicrobiano e ingrediente de alimentos funcionales. Se hizo la descripción del comportamiento termodinámico de este complejo a pesar de tener una constante de unión baja que limitaba la aplicación de otras técnicas [54].

4. Conclusiones

La titulación isotérmica calorimétrica (TIC) se consolida como una técnica versátil y relativamente sencilla de aplicar en el estudio de interacciones moleculares, particularmente en el análisis de sistemas proteína-ligando y en la formación de complejos (de coordinación o inclusión) equimolares. Sin embargo, se requiere una comprensión muy detallada de cada uno de los temas establecidos en los fundamentos, ya que términos como calor o temperatura pueden llegar a confundirse con facilidad; además, conceptos como la entropía pueden llegar a ser difíciles de comprender sin el uso de ejemplos prácticos, generando posibles errores al momento de interpretar los parámetros termodinámicos. Por otro lado, a través del estudio de caso se evidenció el funcionamiento de la TIC, la relevancia de los modelos matemáticos y la importancia de los softwares asociados para la obtención de los datos. Aunque todos los modelos derivan de estudios matemáticos rigurosos, comprender su funcionamiento representa una de las principales barreras por las cuales los estudiantes pueden generar conflictos que no les permitan entender la técnica. La termodinámica, si bien es una herramienta clave en la química farmacéutica, se recomienda proponer enfoques prácticos que faciliten su enseñanza y eviten la aversión común hacia estos conceptos, al tiempo que estimule la curiosidad científica del lector.

Uno de los aportes más importantes de este trabajo es la demostración del potencial de la TIC como herramienta complementaria y de apoyo en diversas áreas de la química farmacéutica, ya que, si bien valores como la Ka pueden ser utilizados para evaluar la afinidad de una molécula por su diana terapéutica, los resultados deben complementarse con otros estudios en áreas del conocimiento como la farmacocinética o la farmacodinamia para definir con certeza dosis adecuadas de medicamento. En el estudio de la estabilidad de los complejos formados, los parámetros termodinámicos son necesarios para evaluar la estabilidad inicial del compuesto, pero estos deben ser complemento de los ensayos a largo plazo, imprescindibles para demostrar la eficacia y la seguridad de fármacos. La caracterización de la naturaleza de las asociaciones de diferentes sistemas es el punto más fuerte de la TIC, y para que sea relevante en el campo de la química farmacéutica se recomienda enfocar los diferentes experimentos a cómo estos procesos de asociación afectan, por ejemplo, la efectividad del medicamento. Por lo tanto, TIC representa una técnica con alto valor científico, cuyo uso extendido en el campo de la química farmacéutica genera avances significativos en el entendimiento y control de las interacciones moleculares, por lo cual se deben seguir explorando otras áreas, como la nanotecnología en farmacia, que puedan sacar ventaja de la utilidad de la TIC.

La versatilidad y sensibilidad de la TIC para detectar variaciones térmicas mínimas les brinda ventajas importantes frente a métodos como la calorimetría diferencial de barrido (CDB) o la resonancia magnética nuclear (RMN), a pesar de los retos técnicos y la complejidad en la interpretación de sus resultados. No obstante, es importante señalar

que la TIC no pretende sustituir a otras técnicas analíticas, sino complementarlas. Su verdadera fortaleza radica en su capacidad para integrarse con otras metodologías, enriqueciendo el análisis de sistemas proteína-ligando y formación de complejos, proporcionando información relevante, gracias a los valores precisos derivados de mediciones calorimétricas, sobre los mecanismos moleculares involucrados en la asociación de moléculas. Debido a lo anterior, se recomienda fomentar avances tecnológicos que permitan mejorar la accesibilidad y los costos relacionados a este tipo de técnicas, lo cual impulse su implementación en otros estudios que sean relevantes para la química farmacéutica.

Referencias

1. Nilsson, T.; Niedderer, H. Undergraduate Students' Conceptions of Enthalpy, Enthalpy Change and Related Concepts. *Chemistry Education Research and Practice* **2014**, *15*, 336–353, doi:10.1039/c2rp20135f.
2. Shedlosky-Shoemaker, R.; Fautch, J.M. Who Leaves, Who Stays? Psychological Predictors of Undergraduate Chemistry Students' Persistence. *J Chem Educ* **2015**, *92*, 408–414, doi:10.1021/ed500571j.
3. Keller, S.; Vargas, C.; Zhao, H.; Piszczek, G.; Brautigam, C.A.; Schuck, P. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Anal Chem* **2012**, *84*, 5066–5073, doi:10.1021/ac3007522.
4. Shriver, J.W.; Edmondson, S.P. Ligand-Binding Interactions and Stability. *Methods Mol Biol* **2008**, *490*, 135–164, doi:10.1007/978-1-59745-367-7_6.
5. Freyer, M.W.; Lewis, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol* **2008**, *84*, 79–113, doi:10.1016/S0091-679X(07)84004-0.
6. Sarge, S.M.; Höhne, G.W.H.; Hemminger, W. *Calorimetry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*; 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2014;
7. Callies, O.; Hernández Daranas, A. Application of Isothermal Titration Calorimetry as a Tool to Study Natural Product Interactions. *Nat Prod Rep* **2016**, *33*, 881–904, doi:10.1039/C5NP00094G.
8. Jecklin, M.C.; Schauer, S.; Dumelin, C.E.; Zenobi, R. Label-Free Determination of Protein-Ligand Binding Constants Using Mass Spectrometry and Validation Using Surface Plasmon Resonance and Isothermal Titration Calorimetry. *J Mol Recognit* **2009**, *22*, 319–329, doi:10.1002/JMR.951.
9. Andújar-Sánchez, M.; Jara-Pérez, V.; Cámara-Artigas, A. Thermodynamic Determination of the Binding Constants of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors by a Displacement Method. *FEBS Lett* **2007**, *581*, 3449–3454, doi:10.1016/J.FEBSLET.2007.06.048.
10. Jain, S.; Ratnikov, D.; Omi, F.; Al-Rubaiye, H.; Fallah, A.; Saccomanno, S. Cisplatin Destabilizes RNA : DNA Hybrid Structures and Inhibits RNA Function in a CRISPR Model System. *ChemistrySelect* **2023**, *8*, doi:10.1002/slct.202303928.
11. Falconer, R.J.; Schuur, B.; Mittermaier, A.K. Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Pure and Applied Research from 2016 to 2020. *Journal of Molecular Recognition* 2021, *34*.
12. González-Barbosa, J.; Hipólito-Nájera, A.R.; Gómez-Balderas, R.; Rodríguez-Laguna, N.; Moya-Hernández, R. Termodinámica de La Inclusión Entre Clorpropamida y α-Ciclodextrina. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI* **2023**, *11*, 36–39, doi:10.29057/icbi.v11iespecial.10228.
13. Ouzzani, M.; Hammady, H.; Fedorowicz, Z.; Elmagarmid, A. Rayyan-a Web and Mobile App for Systematic Reviews. *Syst Rev* **2016**, *5*, doi:10.1186/S13643-016-0384-4.
14. Chang, R.; Goldsby, K. *Química*; 12ed ed.; McGraw-Hill Education: New York, USA, 2017;
15. Atkins, P.; De Paula, J. *Atkins Química Física*; 8va ed.; Oxford University Press: Oxford, Reino Unido, 2008;
16. Brey, J.J.; Khalil, N. An Adiabatic Piston in a Temperature Gradient. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* **2012**, *2012*, doi:10.1088/1742-5468/2012/11/P11012.
17. Stephen T. Thornton, A.R. *Modern Physics: For Scientists and Engineers*; 3ª edición, Ed.; Brooks/Cole–Thomson.; Belmont, California, USA, 2009;
18. Hanlon, R.T. The 1st Law of Thermodynamics. *Block by Block: The Historical and Theoretical Foundations of Thermodynamics* **2020**, 261–269, doi:10.1093/OSO/9780198851547.003.0022.
19. Beretta, G.P.; Gyftopoulos, E.P. What Is Heat? *Journal of Energy Resources Technology, Transactions of the ASME* **2015**, *137*, doi:10.1115/1.4026382/372874.
20. White, D.R. Hot and Cold: Defining and Measuring Temperature. **2021**, doi:10.1080/00107514.2021.1896132.
21. Pathare, S.; Huli, S.; Nachane, M.; Ladage, S.; Pradhan, H. Understanding Thermal Equilibrium through Activities. *Phys Educ* **2015**, *50*, 146, doi:10.1088/0031-9120/50/2/146.
22. Evans, D.J.; Williams, S.R.; Rondoni, L. A Mathematical Proof of the Zeroth "Law" of Thermodynamics and the Nonlinear Fourier "Law" for Heat Flow. *J Chem Phys* **2012**, *137*, doi:10.1063/1.4766734.
23. Starzak, M.E. The First Law of Thermodynamics. *Energy and Entropy* **2010**, 1–21, doi:10.1007/978-0-387-77823-5_1.
24. Nandagopal, P.N.S. Conservation of Energy and First Law of Thermodynamics. *Fluid and Thermal Sciences* **2022**, 341–369, doi:10.1007/978-3-030-93940-3_14.
25. Keifer, D. Enthalpy and the Second Law of Thermodynamics. *J Chem Educ* **2019**, *96*, 1407–1411, doi:10.1021/acs.jchemed.9b00326.
26. Swendsen, R.H. The Definition of the Thermodynamic Entropy in Statistical Mechanics. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **2017**, *467*, 67–73, doi:10.1016/J.PHYSA.2016.10.032.
27. Sinko, P.J. *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences - Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences*; 2011; Vol. 53;.
28. Cheng, B.; Ceriotti, M. Computing the Absolute Gibbs Free Energy in Atomistic Simulations: Applications to Defects in Solids. *Phys Rev B* **2017**, *97*, doi:10.1103/PhysRevB.97.054102.
29. Brautigam, C.A.; Zhao, H.; Vargas, C.; Keller, S.; Schuck, P. Integration and Global Analysis of Isothermal Titration Calorimetry Data for Studying Macromolecular Interactions. *Nat Protoc* **2016**, *11*, 882–894, doi:10.1038/nprot.2016.044.

30. Velazquez-Campoy, A.; Leavitt, S.A.; Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. In *Drug–Protein Interaction*; Edward Pfefferkorn, Ed.; Humana Press: Totowa, New Jersey, USA, 2015; pp. 35–54.
31. Lewis, E.A.; Murphy, K.P. Isothermal Titration Calorimetry. *Methods Mol Biol* **2005**, *305*, 1–15, doi:10.1385/1-59259-912-5:001.
32. Baranauskiene, L.; Kuo, T.-C.; Chen, W.-Y.; Matulis, D. Isothermal Titration Calorimetry for Characterization of Recombinant Proteins. *Curr Opin Biotechnol* **2019**, *55*, 9–15, doi:https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.06.003.
33. Scheuermann, T.H.; Brautigam, C.A. High-Precision, Automated Integration of Multiple Isothermal Titration Calorimetric Thermograms: New Features of NITPIC. *Methods* **2015**, *76*, 87–98, doi:10.1016/J.YMETH.2014.11.024.
34. Hansen, L.D.; Transtrum, M.K.; Quinn, C.F. Related Topics in Calorimetry. In *Titration Calorimetry: From Concept to Application*; Hansen, L.D., Transtrum, M.K., Quinn, C.F., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 39–40 ISBN 978-3-319-78250-8.
35. Damian, L. Isothermal Titration Calorimetry for Studying Protein-Ligand Interactions. *Methods in Molecular Biology* **2013**, *1008*, 103–118, doi:10.1007/978-1-62703-398-5_4.
36. Wszelaka-Rylik, M.; Gierycz, P. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) Study of Natural Cyclodextrins Inclusion Complexes with Drugs. *J Therm Anal Calorim* **2013**, *111*, 2029–2035, doi:10.1007/S10973-012-2251-4/TABLES/4.
37. Le, V.H.; Buscaglia, R.; Chaires, J.B.; Lewis, E.A. Modeling Complex Equilibria in Isothermal Titration Calorimetry Experiments: Thermodynamic Parameters Estimation for a Three-Binding-Site Model. *Anal Biochem* **2013**, *434*, 233–241, doi:10.1016/J.AB.2012.11.030.
38. Wyrzykowski, D.; Zarzeczańska, D.; Jacewicz, D.; Chmurzyński, L. Investigation of Copper(II) Complexation by Glycylglycine Using Isothermal Titration Calorimetry. *J Therm Anal Calorim* **2011**, *105*, 1043–1047, doi:10.1007/s10973-011-1426-8.
39. Tesmar, A.; Wyrzykowski, D.; Jacewicz, D.; Żamojć, K.; Pranczk, J.; Chmurzyński, L. Buffer Contribution to Formation Enthalpy of Copper(II)–Bicine Complex Determined by Isothermal Titration Calorimetry Method. *J Therm Anal Calorim* **2016**, *126*, 97–102, doi:10.1007/s10973-016-5313-1.
40. Freire, E. Isothermal Titration Calorimetry: Controlling Binding Forces in Lead Optimization. *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1*, 295–299, doi:10.1016/J.DDTEC.2004.11.016.
41. Wadsö, L.; Li, Y.; Li, X. Isothermal Titration Calorimetry in the Student Laboratory. *J Chem Educ* **2011**, *88*, 101–105, doi:10.1021/ed100649e.
42. Harty, M.; Bearne, S.L. Measuring Benzohydroxamate Complexation with Mg2+, Mn2+, Co2+, and Ni2+ Using Isothermal Titration Calorimetry. *J Therm Anal Calorim* **2016**, *123*, 2573–2582, doi:10.1007/S10973-016-5290-4/FIGURES/4.
43. Wyrzykowski, D.; Pilarski, B.; Jacewicz, D.; Chmurzyński, L. Investigation of Metal–Buffer Interactions Using Isothermal Titration Calorimetry. *J Therm Anal Calorim* **2013**, *111*, 1829–1836, doi:10.1007/s10973-012-2593-y.
44. Jiménez, J.S.; Benítez, M.J. Gibbs Free Energy and Enthalpy–Entropy Compensation in Protein–Ligand Interactions. *Biophysica* **2024**, *4*, 298–309, doi:10.3390/BIOPHYSICA4020021.
45. King, N.M.; Prabu-Jeyabalan, M.; Bandaranayake, R.M.; Nalam, M.N.L.; Nalivaika, E.A.; Özen, A.; Haliloğlu, T.; Yilmaz, N.K.; Schiffer, C.A. Extreme Entropy-Enthalpy Compensation in a Drug-Resistant Variant of HIV-1 Protease. *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 1536–1546, doi:10.1021/CB300191K.
46. Grüner, S.; Neeb, M.; Barandun, L.J.; Sielaff, F.; Hohn, C.; Kojima, S.; Steinmetzer, T.; Diederich, F.; Klebe, G. Impact of Protein and Ligand Impurities on ITC-Derived Protein–Ligand Thermodynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2014**, *1840*, 2843–2850, doi:10.1016/J.BBAGEN.2014.04.018.
47. Illapakurthy, A.C.; Wyandt, C.M.; Stodghill, S.P. Isothermal Titration Calorimetry Method for Determination of Cyclodextrin Complexation Thermodynamics between Artemisinin and Naproxen under Varying Environmental Conditions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, *59*, 325–332, doi:10.1016/J.EJPB.2004.08.006.
48. Mehlenbacher, M.R.; Bou-Abdallah, F.; Liu, X.X.; Melman, A. Calorimetric Studies of Ternary Complexes of Ni(II) and Cu(II) Nitrilotriacetic Acid and N-Acetyloligohistidines. *Inorganica Chim Acta* **2015**, *437*, 152–158, doi:10.1016/J.ICA.2015.08.009.
49. Rodríguez-Laguna, N.; Manrique-Buendía, Y.T.; Gómez-Balderas, R.; Moya-Hernández, R.; González-Barbosa, J. Perfil Termodinámico Del Sistema Metformina-Vanadilo Por Calorimetría de Titulación Isotérmica. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI* **2023**, *11*, 54–57, doi:10.29057/ICBI.V11IESPECIAL.10353.
50. Gómez-Balderas, R.; Ponce-Pérez, L.D.; González-Barbosa, J.; Rodríguez-Laguna, N. Estudio de La Inclusión de Diflunisal En 2-Hidroxipropil-β-Ciclodextrina. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI* **2023**, *11*, 64–67, doi:10.29057/icbi.v11iespecial.10361.
51. Holdgate, G. Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry. In *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery: Methods and Protocols*; Roque, A.C.A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; pp. 101–133 ISBN 978-1-60761-244-5.
52. Córsico, B.; Lockhart, L.J.F.; Franchini, G.R.; Scaglia, N. *Análisis Estructural y Funcional de Macromoléculas*; Primera.; EDULP – Editorial de la Universidad Nacional de La Plata: La Plata, Argentina, 2013; ISBN 9789503410578.
53. Wang, B.; Jia, Y.; Lin, Q. A Microfabrication-Based Approach to Quantitative Isothermal Titration Calorimetry. *Biosens Bioelectron* **2016**, *78*, 438–446, doi:10.1016/J.BIOS.2015.11.069.
54. Shakeel, F.; Salem-Bekhet, M.; Hqa, N.; Siddiqui, N. Solubility and Thermodynamics of Ferulic Acid in Different Neat Solvents: Measurement, Correlation and Molecular Interactions. *J Mol Liq* **2017**, *236*, doi:10.1016/j.molliq.2017.04.014.
55. Weber, P.C.; Salemme, F.R. Applications of Calorimetric Methods to Drug Discovery and the Study of Protein Interactions. *Curr Opin Struct Biol* **2003**, *13*, 115–121, doi:10.1016/S0959-440X(03)00003-4.
56. Microcalorímetros MicroCal | Malvern Panalytical Available online: https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/microcal-range (accessed on 8 January 2025).
57. Magnetic Resonance Spectroscopy | NMR Solutions Available online: https://nmr.oxinst.com/ (accessed on 8 January 2025).
58. Thermo Fisher Scientific - CO Available online: https://www.thermofisher.com/co/en/home.html (accessed on 8 January 2025).
59. Dillion, I.; Cavalcanti, L.; Humberto, F.; Junior, X.; Stela, N.; Magalhães, S.; Cajubá De Britto, M.; Nogueira, L. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) as a Promising Tool in Pharmaceutical Nanotechnology. *Int J Pharm* **2023**, *641*, 123063, doi:10.1016/j.ijpharm.2023.123063.
60. Del Rosso, M.G.; Ciesielski, A.; Colella, S.; Harrowfield, J.M.; Samori, P. Isothermal Titration Calorimetry Study of a Bistable Supramolecular System: Reversible Complexation of Cryptand[2.2.2] with Potassium Ions. *Chemphyschem* **2014**, *15*, 2743–2748, doi:10.1002/CPHC.201402296.