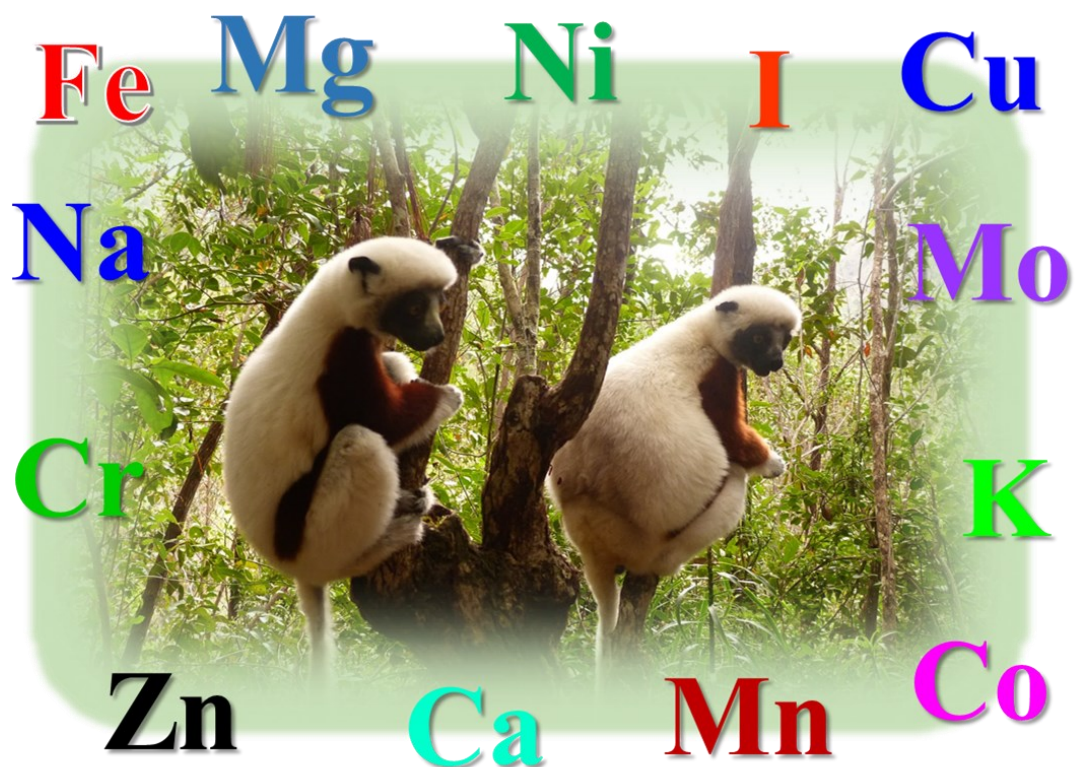


# La vida des d'una perspectiva inorgànica

*Fonaments de Bioinorgànica*

Montserrat Corbella





## INDEX

1. INTRODUCCIO A LA BIOINORGÀNICA	5
1.1 Història de la química bioinorgànica	5
1.2 Què estudia la Bioinorgànica?	6
1.3 Metodologia d'estudi	7
1.4 Paper dels ions metàl·lics en biologia	7
1.5 Element essencial i element tòxic	9
1.6 Selecció dels elements essencials	10
1.8 Elements amb interès mèdic o farmacològic	15
1.9 Mapa general dels camps d'estudi de la bioinorgànica	15
2. MOLÈCULES BIOLÒGIQUES QUE PODEN ACTUAR COM A LLIGANDS	17
2.1 Les proteïnes i el centre actiu	17
2.2 Estructura de les proteïnes	18
2.3 Altres lligands	20
2.4 Nucleòtids i polinucleòtids	21
2.5 La cèl·lula	23
3. TÈCNiques MÉS UTILITZADES EN EL CONEIXEMENT DEL CENTRE ACTIU	24
3.1 Una breu introducció a la química de coordinació	24
3.2 Tècniques de raigs X	25
3.3 Espectroscòpia de Ressonància d'espín electrònic (RSE)	26
3.5 Espectroscòpia Mössbauer	29
3.6 Espectroscòpia vibracional	30
3.7 Propietats magnètiques	31
3.9 Resum de les tècniques més emprades per cada metall o molècula	32
4. SISTEMES DE TRANSPORT DE IONS	33

<b>4.1 Transport de ions a través de membranes</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Iònòfors</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Sideròfors</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Bomba Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> : Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPasa</b>	<b>36</b>
<b>4.5 Transferrina</b>	<b>40</b>
<b>4.6 Metal·lotioneïna (MT)</b>	<b>41</b>
<b>4.7 Resum dels sistemes de transport</b>	<b>42</b>
<b>5. BIOMINERALS</b>	<b>43</b>
<b>5.1 Introducció als biominerals</b>	<b>43</b>
<b>5.2 Emmagatzematge de ferro: ferritina</b>	<b>44</b>
<b>5.3 Sensors magnètics i gravitacionals</b>	<b>46</b>
<b>6. PROTEÏNES DE TRANSPORT D'ELECTRONS</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Breu introducció al transport d'electrons en els sistemes biològics</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Proteïnes Fe-S</b>	<b>50</b>
<b>6.3 Citocroms</b>	<b>54</b>
<b>6.4 Proteïnes blaves de coure</b>	<b>56</b>
<b>7. PROTEÏNES DE TRANSPORT D'OXIGEN</b>	<b>58</b>
<b>7.1 Introducció: efecte de la presència d'oxigen en la vida</b>	<b>58</b>
<b>7.1 Hemoglobina i mioglobina</b>	<b>58</b>
<b>7.2 Hemeritrina (Hr)</b>	<b>64</b>
<b>7.3 Hemocianina (Hc)</b>	<b>66</b>
<b>7.4 Comparativa entre els diferents sistemes de transport d'oxigen</b>	<b>67</b>
<b>8. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'OXIGEN</b>	<b>68</b>
<b>8.1 Introducció a l'activació de la molècula d'oxigen</b>	<b>68</b>
<b>8.2 Monooxigenases</b>	<b>68</b>
<b>8.3 Oxidases Blaves: lacasa (Lac)</b>	<b>74</b>
<b>8.4 Citocrom c oxidasa</b>	<b>76</b>
<b>9. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA DE NITROGEN</b>	<b>80</b>

9.1 Nitrogenasa	80
10. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'HIDRÒGEN	84
10.1 Hidrogenases	84
11. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'AIGUA PER FORMAR OXIGEN	86
11.1 Fotosíntesi	86
11.2 Centre d'oxidació de l'aigua (COA)	90
12. METAL·LOENZIMS QUE PARTICIPEN EN EL SISTEMA DE DEFENSA CEL·LULAR	92
12.2 Superòxido dismutasa (SOD)	94
12.3 Catalases i peroxidases Fe-hemo	95
12.4 Glutatió peroxidasa	97
13. METAL·LOENZIMS QUE PARTICIPEN EN PROCESOS D'ISOMERITZACIÓ	98
13.1 El sistema B <sub>12</sub>	98
13.2 Reaccions de reordenament o isomerització: coenzim B <sub>12</sub>	99
13.3 Reaccions de transferència de grups metil: Me-B <sub>12</sub>	101
14. METAL·LOENZIMS QUE CATALITZEN REACCIONS ÀCID-BASE	102
14.1 Carboxipeptidasa A	103
14.2 Ureasa	104
14.3 Anhidrasa carbònica	106
14.4 Alcohol deshidrogenasa (ADH)	107
15. OXOTRANSFERASES DE MOLIBDÈ I TUNGSTÈ	110
15.1 Centre actiu	110
15.2 Nitrato reductasa	111
15.3 Sulfito oxidasa	112
15.4 Xantina oxidasa	113
15.5 Oxotransferases de Tungstè	113
16. IONS METÀL·LICS QUE TENEN UN PAPER ESTRUTURAL	115
16.1 Telòmers de l'ADN	115

16.2 Dits de zinc	115
16.2 Cromodulina	117
16.3 Proteïnes de calci en forma de ma EF	118
16.4 Paper del calci en la coagulació de la sang	120
17. MISSATGERS CEL·LULARS	122
17.1 Proteïnes de calci	122
17.2 Molècula de NO	122
17.3 Paper del iode	125
18. TOXICITAT	127
18.1 Introducció	127
18.2 Mecanismes de toxicitat	128
18.3 Sistemes de defensa	129
18.4 Efecte tòxic dels elements essencials	130
18.5 Toxicitat de cations durs (Li, Be, Al)	132
18.6 Toxicitat de cations tous (Hg, Pb, Cd, Tl)	134
18.7 Efecte dels elements radioactius	138
19. PAPER DELS IONS METÀL·LICS EN MEDICINA	141
19.1 Breu introducció històrica i alguns fàrmacs inorgànics	141
19.2 Fàrmacs d'or (crisoteràpia)	143
19.3 Fàrmacs de platí	144
19.4 Agents de contrast	149
19.5 Radiofàrmacs	151
20. BIBLIOGRAFIA	154

# 1. INTRODUCCIO A LA BIOINORGÀNICA

## 1.1 Història de la química bioinorgànica

La química bioinorgànica com a disciplina és relativament recent. Hi va haver alguns fets claus que van propiciar el naixement d'aquesta ciència. Un d'ells va ser descobrir la presència de ferro en la sang i també descobrir que hi havia processos fisiològics que depenien del coure i del zinc.

L'any 1960 es publicava la resolució estructural per difracció de raigs X de l'hemoglobina i de la mioglobina. Això va desencadenar un seguit de reunions entre químics inorgànics interessats en el tema del paper dels ions metàl·lics en la vida.

Fruit d'aquestes reunions va ser la publicació de la revista *Journal of Inorganic Biochemistry* que va aparèixer al mercat l'any 1971. L'any 1973 la revista *Progress in Inorganic Chemistry* va dedicar un volum a la bioinorgànica.

El primer congrés internacional de Bioinorgànica, ICBIC (*International Conference on Bioinorganic Chemistry*) es va fer a Florència l'any 1983. I el primer congrés europeu d'aquesta temàtica, EUROBIC (*European Biological Inorganic Chemistry Conference*) va tenir lloc a Newcastle (Regne Unit) l'any 1992.

L'any 1995 es va fundar la *Society of Biological Inorganic Chemistry* i un any més tard apareixia una nova publicació: *Journal of Biological Inorganic Chemistry*.

Al nostre país la *Asociación Española de Bioinorgánica* (AEBIN) es va fundar l'any 2002 i el mateix any a França es creava el *Club Metalloprotéines et Modèles*, que més tard, en el 2013, es va convertir en el *Group Français de Chimie Bio-Inorganique* (FrenchBIC). Portugal també té una associació que reuneix als grups que treballen en aquesta temàtica, BIOIN Portugal.

Per tant, la Bioinorgànica és una branca de la ciència que té prop de 60 anys de vida, i en aquest temps ha evolucionat moltíssim. El ventall de camps on intervé s'ha anat obrint i el nombre de grups dedicats a la recerca en aquesta disciplina ha augmentat significativament. Això ha comportat un increment important en el nombre de publicacions.

Abans de continuar cal veure a què ens referim quan parlem de Bioinorgànica. El seu nom es bastant clar: Biologia i Inorgànica, la fusió d'aquestes dues disciplines, el punt d'intersecció entre elles.

Des de l'antiguitat s'havia associat la vida a la química orgànica (la química del C, N, H, O) i el món mineral a la química inorgànica (la química de la resta dels elements de la taula periòdica). El descobriment de que alguns ions metàl·lics són fonamentals pel bon funcionament dels organismes va ser una abans i un després en aquesta visió del món, ja que demostrava que no hi ha una línia divisòria tant clara entre aquests dos mons (el món dels éssers vius i el món inanimat).

El progrés en la tecnologia, en tècniques d'anàlisi, els diversos mètodes espectroscòpics ha permès detectar elements que es poden trobar en els éssers vius en quantitats molt petites i que antigament havien passat desapercibuts.

Per altra banda, quan parlem de la vida, ens referim a un ampli espectre d'espècies, ja que hi ha molts tipus d'essers vius, des de els microorganismes fins a les plantes i els animals superiors. I per exemple en els mamífers, no tots els òrgans i teixits dels cos tenen les mateixes funcions, per tant, no tenen perquè tenir la mateixa composició.

S'han identificat uns 2 milions d'espècies de plantes, animals i microorganismes a la terra, però de ben segur que encara n'hi ha milions que no es coneixen. Cada any es descobreixen un munt de noves espècies vives, moltes d'elles són insectes. Rarament, tot i que pot passar i passa, es descobreix algun

nou animal superior que habita en regions remotes que no s'havien explorat abans.

Així doncs, els avenços tecnològics i la descoberta de noves espècies d'éssers vius porta a una evolució constant de la Bioinorgànica. Pot ser que es trobin nous elements en alguna espècie que no s'havien trobat fins ara.

Així doncs, tenim diferents espècies, diferents tipus de teixits i òrgans, per tant una gran diversitat de mostres per analitzar i veure quins elements contenen. I això porta a trobar un bon nombre d'elements de la taula periòdica que formen part d'aquestes mostres. Ara be, tots els elements que es troben en la mostra analitzada son realment necessaris o son contaminants que han entrat en aquell ésser viu?

## 1.2 Què estudia la Bioinorgànica?

Com ja s'ha comentat, el ventall del que entra dins del concepte bioinorgànica s'ha anat ampliant. En realitat és, com es diu en el títol, analitzar la vida amb una mirada inorgànica, des de la perspectiva de la inorgànica, i en molts casos, de la química de coordinació.

Un dels primers reptes d'aquesta branca de la ciència és esbrinar quins elements de la taula periòdica son essencials per la vida i quins, encara que es trobin els éssers vius, no són necessaris. O sigui introdueix el concepte d'element essencial.

Per tant, en línies generals podem englobar l'estudi en diferents blocs:

El paper dels ions metàl·lics i de determinats elements considerats típicament inorgànics, en els processos biològics.

Per conèixer el paper que juguen cal saber quina funció tenen. Cal conèixer l'estructura del centre actiu, l'estat d'oxidació que presenta el centre metàl·lic, si està involucrat en alguna reacció cal saber quina és aquesta reacció, quin és el seu mecanisme.

Una part molt àmplia de la bioinorgànica estudia el paper dels ions metàl·lics en els processos biològics. Aquests ions es troben generalment formant complexos o compostos de coordinació amb lligands biològics. El lloc on s'ubica l'ió metàl·lic s'anomena centre actiu. Tot i que de forma rigorosa només s'hauria de referir d'aquesta forma quan és el centre de reacció, en general ho aplicarem a l'entorn de l'ió metàl·lic tant si està involucrat en una reacció com si no ho està.

Un altre repte de la bioinorgànica és determinar l'efecte que tenen els agents externs (compostos inorgànics o compostos que contenen ions metàl·lics) en els éssers vius.

Cal conèixer quins ions són tòxics i perquè, quina és la raó per la que afecten de forma negativa als processos biològics.

Cal conèixer també com s'incorporen aquestes espècies que poden ser perjudicials i com afecta la presència de contaminants en l'entorn a la qualitat de vida.

El coneixement dels efectes tòxics d'alguns compostos pot ajudar en la formulació de fàrmacs. Es poden aprofitar les propietats de determinats elements i compostos, per exemple per destruir cèl·lules tumorals.

Ara be tant si son elements essencials com elements tòxics cal conèixer molt be els intervals de concentració en que son idonis o en que són tòxics. Cal conèixer l'efecte de la concentració dels elements, per poder avaluar els efectes beneficiosos o tòxics.

I encara hi ha un altre camp de treball important en el que podem destacar les diferents tècniques de diagnòstic, els biomaterials, les molècules que poden transportar fàrmacs, etc.

Vist això podem dir que la bioinorgànica està relacionada amb diferents branques de la ciència. Per una banda, hi ha una estreta relació entre la química (inorgànica i orgànica) i les "bio" (biologia i

bioquímica). Per altra banda, les branques de la química que permeten obtenir informació sobre els centres actius són essencialment tècniques analítiques i espectroscòpiques.

I de forma indirecta, els coneixements de l'efecte d'agents externs en la vida poden ser útils en farmacologia i medicina així com en toxicologia. Però també poden incidir en el camp de la nutrició, l'agricultura, l'ecologia, o be en el món dels materials.

### 1.3 Metodologia d'estudi

Un dels problemes que es presenta quan volem conèixer el paper d'un ió metàl·lic en un determinat procés és que cal conèixer l'estructura del centre actiu i això molts cops no és senzill. Un cop més, els avanços tecnològics han ajudat molt i actualment hi ha molts centres actius dels que s'ha pogut resoldre l'estructura cristal·lina amb suficient precisió. Però si l'element en qüestió participa en una reacció, molts cops es fa difícil establir un mecanisme ja que no coneixem l'estructura del centre actiu en totes les etapes del procés.

Això porta al concepte de compost model o biomimètic. És un compost de coordinació, d'estructura coneguda, i per tant del que es coneix el seu entorn i l'estat d'oxidació del metall. Aquest compost es pot estudiar espectroscòpicament i comparar les dades amb les del centre actiu.

És a dir que es fa l'estudi del centre actiu i es compara amb l'estudi d'un compost model per obtenir informació sobre el centre actiu: tipus de lligands en el seu entorn, estat d'oxidació, etc.

Hi ha casos en els que el centre actiu està format per un ió metàl·lic que no es pot estudiar emprant les tècniques espectroscòpiques habituals, com per exemple el zinc. L'ió  $Zn^{2+}$  en ser un ió amb configuració electrònica  $d^{10}$  no presenta espectre visible, ni espectre RSE. Això dificulta la caracterització del seu entorn biològic. Una forma de resoldre el problema és substituir-lo per un ió similar en radi i característiques químiques però que no tingui els orbitals  $d$  totalment ocupats, el que permet utilitzar més diversitat de tècniques per extreure informació sobre el centre actiu.

### 1.4 Paper dels ions metàl·lics en biologia

A partir de l'anàlisi de mostres de diferents organismes, diferents òrgans i teixits s'ha determinat quins elements de la taula periòdica (T. P.) es troben en els sers vius. S'ha pogut veure que hi ha elements que es troben en totes les mostres estudiades, mentre que d'altres es troben tan sols en un nombre reduït d'espècies. També s'ha observat que la concentració no és la mateixa per tots els elements ni en totes les mostres estudiades.

Per altra banda, com ja hem comentat, cada any es descobreixen noves espècies, unes 18,000 cada any. Hi ha zones remotes en les que en el passat no s'hi havia pogut accedir o recollir mostres i ara sí.

En zones abissals dels oceans, a més de 1,000 metres de fondària s'hi poden trobar animals; hi ha espècies que poden viure a 4,000 o 5,000 metres de fondària. Allà no hi arriba la llum solar, per això no hi podem trobar organismes fotosintètics, com les plantes, però sí que hi poden viure algunes espècies animals. S'han adaptat a les condicions de vida; han de ser resistents a la pressió de l'aigua que tenen a sobre, han de poder viure amb molt poc oxigen, ja que són regions molt allunyades de la superfície i per tant del contacte amb l'aire. Com que no hi ha llum solar no sintetitzen vitamina D. Per tant, les condicions de vida d'aquests animals són molt diferents als que viuen en altres regions marines, així que poden presentar diferències en els elements que es troben en els centres actius.

Per això la bioinorgànica és una ciència dinàmica. Pot ser que es trobi que aquestes espècies presentin altres elements que fins ara no es consideraven essencials.



En la Figura 1.1 es pot veure la T. P. dels elements que es troben a la natura. Es destaquen els elements que es troben en els éssers vius. Com ja hem dit, la proporció varia i podem classificar-los en diferents grups.

- Hi ha 4 elements que es troben en tots els sers vius i que son els **majoritaris: H, C, N, O**. En el cos humà el 99% dels àtoms són d'aquests elements.

No és d'estranyar que aquests siguin els elements majoritaris ja que són la base de les proteïnes i de l'aigua que abunda en qualsevol ésser viu.

- Els següents 7 elements que es troben en major concentració son: **Na, Mg, Ca, P, S, Cl**. En el cos humà corresponen al 0,9% dels àtoms. Així que 99,9% dels àtoms que tenim al cos corresponen a aquests 11 elements.

*El cas del sodi és particular*, ja que hi ha algunes plantes que tenen un baix contingut en sodi. Així que alguns terrenys de pastura son pobres en sodi, i als animals herbívors cal complementar-los-hi la dieta amb clorur de sodi. Això ja s'havia descobert cap a l'any 1800.

Els herbívors que viuen en zones càlides en suar perden sals i necessiten incorporar més NaCl. En regions desèrtiques en les que hi ha salines, es pot veure als camells llepant la sal, per tal de mantenir la concentració de idònia de sodi.

H																			He
Li	Be												B	C	N	O	F		Ne
Na	Mg												Al	Si	P	S	Cl		Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo		Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi					

*Figura 1.1 Elements essencials (groc i verd) i possibles essencials (rosa). Els elements més abundants son els que tenen el fons groc; el símbol en vermell indica que dins d'aquest grup són els de major concentració. El fons verd intens indica els elements que es troben en la majoria d'essers vius. El fons en color verd pàl·lid correspon als elements que es troben tan sols en alguns organismes.*

- Hi ha 10 elements més que es troben **en la majoria de sers vius: Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Mo, B, Si, Se**. En aquest grup tenim 7 metalls i tres no metalls. Entre els metalls cal destacar que la majoria son de la primera sèrie de transició i Fe, Cu i Zn són els que es troben en major concentració i formen part de més centres actius diferents.

- Hi ha 8 elements que es troben tan sols **en alguns organismes: Sr, Ba, V, Cr, W, F, Br, I**. Podem observar que la majoria d'elements metàl·lics pesats (2<sup>a</sup> i 3<sup>a</sup> sèrie de transició) no tenen un paper essencial en els éssers vius.

- Per últim hi ha alguns elements que s'han trobat en mostres analitzades però que encara no està clar si son necessaris o no.

## 1.5 Element essencial i element tòxic

Això ens porta a definir com decidim quins elements estan considerats essencials. Hi ha tres condicions que ha de complir un element per ser considerat element essencial:

- Quan s'elimina de la dieta apareixen deficiències fisiològiques.
- Quan es torna a administrar es recupera el bon funcionament de l'organisme.
- Té una funció bioquímica específica.

En la Figura 1.2 es representa de forma esquemàtica la resposta fisiològica en funció de la concentració d'un determinat element en funció de si és essencial o és tòxic. Un element essencial sempre té una resposta positiva en els organismes i hi ha un interval de concentracions que és l'idoni, on hi ha millor qualitat de vida (zona 3). Un excés o un defecte ja comporta una disminució en la resposta fisiològica positiva. Com més allunada estigui la concentració del rang òptim menor és la resposta positiva. Si la concentració d'un element essencial és molt baixa, (zona 1) és el límit de la supervivència, mentre que si la concentració està propera a la idònia (zona 2) l'organisme presenta deficiències. En ambdós casos l'administració de l'element en qüestió permet recuperar la bona resposta fisiològica.

Per altra banda, tot i ser un element essencial si hi ha més concentració de la necessària també presenta problemes, ja que, per exemple, pot competir amb altres elements essencials. Si l'excés és lleu s'observa un problema d'intoxicació (zona 4) mentre que si l'excés és elevat pot arribar a ser letal (zona 5).

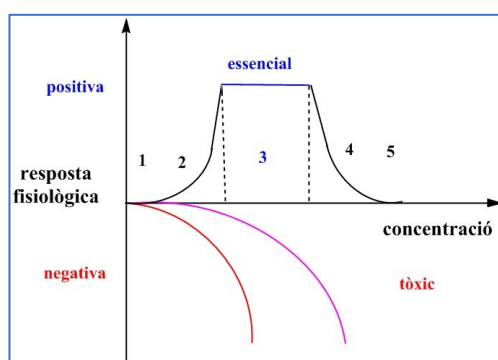


Figura 1.2 Resposta fisiològica d'un element en funció de la concentració. En negre, element essencial, en vermell element tòxic i en fucsia element tòxic a partir d'una determinada concentració.

Per altra banda, un element tòxic ho és a qualsevol concentració. Per molt petita que sigui la concentració sempre dona una resposta fisiològica negativa. No obstant, hi ha elements que es poden trobar en petita quantitat i no presentar efectes perjudicials. És la zona de tolerància. Pot ser degut a que l'organisme s'adapta o el seu sistema de defensa l'immobilitza de forma que no resulti tòxic.

L'interval de concentració idoni dels elements essencials no és el mateix per tots ells. Això és lògic ja que hi ha elements que realitzen poques funcions o es troben en pocs centres actius i en canvi n'hi ha d'altres que participen en molts processos diferents. Així per exemple si comparem el seleni i el fluor, pel seleni la ingesta de seleni idònia és  $\Delta[\text{Se}] = 0,05 - 0,2 \text{ mg /dia}$ , mentre que pel fluor és de  $\Delta[\text{F}] = 2 - 10 \text{ mg /dia}$ .

Com podem veure en el cas del seleni l'interval de concentració per tenir una resposta positiva idònia és molt petit. Així que durant anys se'l considerava un element altament tòxic i cancerigen. Va ser en els inicis de la bioinorgànica que es va veure que era un element essencial i actualment se sap que intervé en el sistema de defensa de les cèl·lules.

En realitat els éssers vius s'adapten al medi i un element podia ser tòxic en el passat, però que hi hagi organismes que s'hi adaptin, que acabi sent una impuresa tolerable i finalment que l'utilitzin i passi a formar part dels elements essencials.

En la T. P. que es mostra en la Figura 1.3 es poden veure els elements essencials (groc i verd) i en vermell els elements tòxics.

H																			He
Li	Be											B	C	N	O	F			Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl			Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br			Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo		Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I			Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi					

tòxics
Tòxic o essencial?
Tòxic??

Figura 1.3 Taula periòdica dels elements essencials (en groc i en verd) i tòxics (vermell).

En línies generals podem dir que els elements metàl·lics essencials són de la primera sèrie de transició, mentre que els tòxics són els més pesats, cations amb caràcter àcid de Lewis tou i per tant que presenten molta afinitat per unir-se a sofre.

Dels metalls lleugers cal destacar el beril·li, que està proper en la T. P. a elements essencials i per tant pot competir amb ells. Pel mateix motiu, des del punt de vista de propietats químiques, l'alumini també pot ser potencialment tòxic, ja que tots dos són cations durs, amb molta afinitat per interaccionar amb oxígens. De totes formes no es coneix cap intoxicació massiva que es pugui atribuir a l'alumini.

Parlar d'elements essencials i tòxics no és del tot correcte, ja que hi ha elements que en un dels seus estats d'oxidació és essencial, per exemple el  $\text{Cr}^{\text{III}}$  i en un altre és tòxic, com pot ser el  $\text{Cr}^{\text{VI}}$ .

El cas de l'arsènic i el cadmi no està clar si son essencials o no. En el cas de l'arsènic, el  $\text{As}^{\text{III}}$  és tòxic per mamífers però en la forma  $\text{As}^{\text{V}}$  sembla que podria ser essencial, ja que compleix els dos primers requisits d'un element essencial però no es coneix encara quina seria la seva funció.

## 1.6 Selecció dels elements essencials

La pregunta que ens podem fer ara és: perquè tan sols la meitat dels elements que es troben en la natura formen part d'alguns dels éssers vius? Hi ha uns 40 elements que tot hi estar presents en el nostre planeta no se sap que formin part de cap espècie viva.

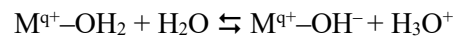
En la **selecció** dels elements que formen part de les espècies vives, sigui del tipus que sigui, hi intervenen diferents factors, com són la funció a realitzar l'abundància en l'entorn i la via d'incorporació.

a) **Funció a realitzar**. Quan parlem dels elements metàl·lics la selecció d'un o altre ió metàl·lic depèn de la funció que hagi de realitzar. Els ions metàl·lics quan formen part d'un centre actiu (enzim o proteïna) poden participar en diferents tipus de reaccions: redox, àcid-base o precipitació.

- **Redox**: calen ions metàl·lics amb al menys dos estats d'oxidació possibles, i que puguin passar amb

certa facilitat d'un a l'altre. Els elements idonis són els metalls de transició (metalls del bloc d amb els orbitals parcialment ocupats).

- **Àcid-Base:** aquest concepte inclou aspectes diverses. La idea general és que el centre actiu està format per un catió metàl·lic amb orbitals buits (àcid de Lewis) i al seu voltant s'hi coordinen lligands, àtoms amb al menys un parell d'electrons solitari (base de Lewis). Quan aquest catió metàl·lic coordina una molècula d'aigua pot afavorir la seva desprotonació, o sigui convertir-la en una espècie més àcida. Aquesta reacció la propicien els ions metàl·lics amb cert poder polaritzant (relació q/r gran).



Moltes reaccions que es donen en les cèl·lules requereixen de la formació de l'espècie  $M^{q+}-OH^-$  i les podem classificar com reaccions tipus àcid-base, en el sentit més ampli del concepte.

Els cations metàl·lics idonis per formar aquesta espècie bàsica són cations que no puguin donar reaccions redox, que siguin petits i tinguin una càrrega 2+ o 3+ (així la relació q/r és gran). El més emprat en els éssers vius és el  $Zn^{2+}$ .

- **Precipitació:** la formació de les estructures sòlides dels éssers vius segueix les mateixes pautes generals que quan obtenim sòlids al laboratori. La formació del sòlid depèn de la constant de solubilitat. I en línies generals per precipitar anions voluminosos s'utilitzen cations voluminosos. Per això el catió metàl·lic més emprat en la formació de biominerals és el  $Ca^{2+}$ .

b) **Abundància de l'element en l'entorn.** Si hi ha dos elements que poden realitzar la mateixa reacció química, el que surt més rentable és utilitzar el que és més abundant. Si n'hi ha més concentració es desplaça més fàcilment l'equilibri i s'afavoreix la seva incorporació.

c) **Via d'incorporació.** Un element pot ser molt abundant en el medi on viu l'organisme però pot ser que no trobi una via per entrar a la cèl·lula.

La selecció dels elements en la incorporació als éssers vius depèn dels tres factors. I en realitat el punt clau és l'inici de la vida i el procés evolutiu. Hi ha elements que es van incorporar en les primeres etapes del procés evolutiu, mentre que d'altres ho van fer més tard.

La vida es va originar en el mar, quan encara no hi havia la capa d'ozó. La capa d'ozó filtra la radiació solar de més energia, i per això quan encara no s'havia format la vida no es podia originar a la terra, sinó que ho va fer en el mar, on la capa d'aigua protegia de la radiació. Per tant, els elements que es van incorporar a les primeres cèl·lules es van seleccionar dels que hi havia disponibles en els primers oceans. La composició dels oceans ha canviat al llarg del procés evolutiu.

A continuació fem un repàs de l'evolució del nostre planeta abans de l'aparició dels humans. Parlem de milions d'anys abans de l'home (Taula 1.1).<sup>1-3</sup> Els primers organismes que es van formar s'anomenen metanogènics, ja que generaven metà. S'han trobat fòssils d'organismes procariotes que situen l'aparició de la vida prop dels 3,500 milions d'anys abans de la presència de l'home. Eren organismes unicel·lulars i poc estructurats.

Els primers bacteris que realitzaven la fotosíntesi feien servir sulfurs i no generaven oxigen. Va ser més tard que els cianobacteris van començar a realitzar la fotosíntesi en la que s'oxidava l'aigua a oxigen. Això va provocar el que es coneix com la crisi de l'oxigen: l'aparició de bacteris aeròbics, que utilitzaven aquest oxigen per respirar i la formació de l'atmosfera d'oxigen.

És en aquestes primeres etapes de la presència d'oxigen a l'atmosfera que se situen els fòssils de les cèl·lules eucariotes (ja tenen nucli). Els sistemes vius es van estructurant cada cop més i uns milions d'anys més tard les cèl·lules ja tenen, a més del nucli, els mitocondris i en algunes cèl·lules els cloroplasts.

L'aparició de les primeres espècies multicel·lulars es dona aproximadament uns 1,500 milions abans de l'aparició dels humans. Aquestes primeres espècies eren les algues vermelles i verdes. La concentració d'oxigen a l'atmosfera va anar augmentant i van aparèixer els primers animals.

L'altre gran canvi en el procés evolutiu va ser el que es coneix com l'explosió cambriana. La diversificació dels organismes multicel·lulars va portar a l'aparició de la vida animal i la de les plantes terrestres.

*Taula 1.1 Procés evolutiu en el nostre planeta, abans de l'aparició dels humans.*

<b>Milions d'anys abans</b>	
5000 – 4000	Formació de la terra
4000	Formació d'oceans i continents
3500	Aparició dels organismes metanogènics: (organismes que produeixen metà).
3000	Primers fòssils procariotes son d'aquesta època. Per tant indica l'inici de la vida. Bacteris que realitzen la fotosíntesi amb sulfur, no es genera O <sub>2</sub> Cianobacteris fotosíntesi que genera O <sub>2</sub> .
2500 crisi de l'oxigen	Respiració de bacteris aeròbics Atmosfera O <sub>2</sub>
2000	Fòssils més antic eucariotes (amb nucli)
1500	Formació dels mitocondris i després dels cloroplasts Algues vermelles i verdes (eucariotes multicel·lulars)
1000	[O <sub>2</sub> ] entre 5-18%
540 explosió cambriana	Animals fòssils més antics Diversificació dels eucariotes multicel·lulars vida animal Plantes terrestres
0	Home 21% O <sub>2</sub>

En els primers estadis del procés evolutiu els gasos majoritaris eren CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O, i en menor quantitat hi havia H<sub>2</sub>, CO, COS, H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub> i CH<sub>4</sub>. Els sediments en el fons marí eren rics en Fe, Si i S. Abans de l'aparició de l'oxigen, quan l'atmosfera no era oxidant, el ferro es trobava en forma de Fe(II) i en un medi ric en sulfurs, es podia formar la pirita, FeS<sub>2</sub>. Hi ha alguns sistemes en els sers vius que contenen ferro unit a sulfurs, com per exemple les proteïnes Fe-S. Es pensa que aquestes metal·loproteïnes son de les primeres que es devien formar.

L'oxidació parcial del sulfur i el HS<sup>-</sup> va comportar la reducció d'espècies de carboni, donant lloc a la fixació del carboni i la síntesi dels compostos orgànics.

Les primeres cèl·lules fotosintètiques es van formar en el mar, en aigües profundes. Quan va començar a generar-se oxigen en una primera etapa quedava dissolt en l'aigua. A mesura que va anar augmentant la concentració va començar a saturar el fons marí d'oxigen i per tant afectava a l'estat d'oxidació dels metalls que formaven els minerals. Quan tant l'aigua com el sol estaven saturats d'oxigen l'excés d'aquest gas s'alliberava i va passar a l'atmosfera, canviant així la composició dels gasos en l'atmosfera.

Quan el fons marí es va anar impregnant d'oxigen els ions metàl·lics que poden presentar més d'un estat d'oxidació es van oxidar. Els dos canvis més importants eren el del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i el del  $\text{Cu}^{\text{I}}$  a  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . Per altra banda l'aparició del oxigen va comportar el canvi d'un medi ric en sulfurs ( $\text{S}^{2-}$  i  $\text{HS}^-$ ) en el que els ions metàl·lics estaven retinguts en els sols en forma de sulfurs, a un medi ric en oxigen i per tant on era més favorable la formació dels òxids. Aquests dos factors junts van comportar canvis significatius en la solubilitat i disponibilitat per part de les cèl·lules dels ions metàl·lics.

Cal recordar que el  $\text{S}^{2-}$  és una base tova i té afinitat per cations tous, o sigui per metalls en estat d'oxidació baix. En canvi el  $\text{O}^{2-}$  té caràcter dur i per tant major afinitat per ions metàl·lics en estat d'oxidació més elevat.

Aquests canvis devien comportar també variacions en el pH del medi, fet que també va contribuir a modificar la solubilitat de determinats minerals. El resultat de tot això és que la formació de l'oxigen va comportar un canvi significatiu en la concentració d'alguns ions metàl·lics presents en l'aigua de mar. Els metalls que es van veure més afectats van ser el Cu, el Zn i el Cd. En el cas del coure el canvi va ser degut al fet de passar de  $\text{Cu}^{\text{I}}$  a  $\text{Cu}^{\text{II}}$  mentre que en el cas de Zn i Cd al fet de que els sulfurs eren més insolubles que els òxids.

Per tant, el coure només va començar a estar accessible per les cèl·lules quan va aparèixer l'oxigen en el medi. I per això tots els sistemes que contenen coure estan relacionats amb l'oxigen. En canvi el ferro, ja estava en solució quan l'atmosfera era reductora, en forma de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i tenia tendència a formar espècies polinuclears amb lligands  $\text{S}^{2-}$  pont. Com ja s'ha comentat, es pensa que les proteïnes Fe-S són de les més antigues en la cadena evolutiva.

Així doncs la vida es va formar al mar, i per tant les cèl·lules van incorporar els ions metàl·lics que tenien a disposició en l'aigua de mar. Hi ha elements que poden ser abundants en l'escorça de la terra però que formen compostos molt insolubles i no s'han pogut incorporar als éssers vius, o en molt poca quantitat. Un exemple és el silici, els sols són rics en silicats, però generalment són molt insolubles. El mateix passa amb el titani, que es troba en forma de  $\text{TiO}_2$ . L'alumini també és un element molt abundant a l'escorça de la terra, però també forma compostos insolubles. No obstant, si hi ha canvis en el pH dels sols es pot solubilitzar i incorporar a les cèl·lules, per exemple en plantes provoca alteracions en el seu creixement.

La proporció dels diferents elements essencials en el cos humà varia molt. En la taula 1.2 es mostren uns valors aproximats, en els que el més important és la diferència de magnitud. Els elements que formen l'aigua, les estructures de proteïnes i àcids nucleics, els biominerals o sòlids, i els electrolits ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) són els que es troben en major proporció. De la resta d'elements del que n'hi ha major quantitat és el ferro, i aquest element és el que el trobem formant part de més metal·loproteïnes (proteïnes que contenen ions metàl·lics). En força menor proporció el segueixen el zinc i el coure. La resta d'elements es troben en quantitats molt petites, i en general participen en menys processos diferents.

Els tres elements metàl·lics del bloc d més abundants, Fe, Cu i Zn, presenten una distribució força diferent en el cos humà:

**Ferro:** aproximadament el 70% es troba dedicat al transport i emmagatzematge d'oxigen. Prop del 30% es troba emmagatzemat, com a reserva per quan se'l requereix. I tan sols un 1% forma part d'altres metal·loproteïnes i enzims amb altres funcions.

**Zinc:** aproximadament el 85% es troba en els músculs i els ossos. Un 11% està localitzat en la pell i el fetge. De la resta, altres dos punts on es localitza és a la pròstata i als ulls. És un dels metalls traça més abundants en el cervell, sent més abundant en la matèria gris que en la blanca. Hi ha determinades neurones que tenen una major concentració de zinc.

**Coure:** un 42% es troba localitzat als ossos, un 24% en el teixit muscular, un 9% en el fetge, un 8% en

el cervell i aproximadament un 6% en la sang.

Tot i que són elements essencials, aquests tres ions estan involucrats en malalties neurodegeneratives.

*Taula 1.2 Relació aproximada de la quantitat de cada element essencial present en el cos humà, per una persona d'uns 68 kg. (Adaptat de <sup>4</sup>).*

Oxigen	44 Kg	Ferro	5 g
Carboni	1,6 Kg	Zinc	1,8 g
Hidrogen	6,6 kg	Coure	280 mg
Nitrogen	1,8 kg	Brom	140 mg
Fòsfor	680 g	Manganès	70 mg
Potassi	250 g	Iode	70 mg
Clor	115 g	Molibdè	14 mg
Sofre	100 g	Bor	14 mg
Magnesi	42 g	Cobalt	~3 mg
		Crom	~3 mg
		Seleni	~2 mg
		Liti	~2 mg
		Vanadi	~2 mg

### 1.7 Centre actiu i química de coordinació

En els éssers vius hi ha més d'un terç de les proteïnes que contenen algun ió metàl·lic coordinat als aminoàcids que la formen. A aquestes proteïnes se les anomena metal·loproteïnes. L'entorn de l'ió metàl·lic en aquestes proteïnes és el que anomenem centre actiu.

El centre actiu en una metal·loproteïna és similar a un compost de coordinació o complex. És a dir que podem aplicar molts dels models i conceptes emprats en la química de coordinació al centre actiu.

La formació i estabilitat del centre actiu depèn de l'afinitat que hi hagi entre el catió metàl·lic i els lligands biològics. La coordinació de l'ió metàl·lic a la proteïna ha de ser més favorable que la coordinació de les molècules d'aigua. I això es pot explicar segons el model àcid-base de Pearson. Segons aquest model un catió dur té afinitat per una base dura, mentre que un catió tou la té per una base tova.

Per altra banda, algunes propietats dels compostos de coordinació es poden explicar molt bé aplicant la teoria del camp cristal·lí. Això és vàlid pels ions del bloc d de la primera sèrie de transició, que són la majoria dels metalls involucrats en els processos biològics.

Els cinc orbitals 3d no tenen tots la mateixa energia, no estan degenerats, sinó que hi ha el que es coneix com el desdoblament del camp cristal·lí. Segons la geometria al voltant del catió metàl·lic i el tipus de lligand tenim diferent tipus de desdoblament. Per tant l'estabilitat, geometria i reactivitat del centre actiu depèn, en part, de l'estabilització deguda als lligands.

Ara bé, en el cas del  $Zn^{2+}$ , que és un metall del bloc d però que té una configuració electrònica  $d^{10}$  tots els orbitals d estan ocupats, per tant l'energia d'estabilització deguda al camp cristal·lí és nul·la. Això comporta que aquest ió tingui més versatilitat a nivell de geometria al seu voltant, i la preferència per una determinada geometria depèn més d'efectes estèrics que d'efectes electrònics.

## 1.8 Elements amb interès mèdic o farmacològic

La química bioinorgànica també estudia els elements que es poden emprar amb finalitats terapèutiques o com agents de diagnòstic. Alguns d'aquests elements són essencials però altres no. A la Figura 1.4 es poden veure els elements que s'utilitzen com agents de contrast en proves de diagnòstic i els que s'empren com a fàrmacs.

H																	He																												
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne																												
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar																												
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr																												
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe																												
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi																															
<table border="1"> <tr> <td>Ce</td> <td>Pr</td> <td>Nd</td> <td>Pm</td> <td>Sm</td> <td>Eu</td> <td>Gd</td> <td>Tb</td> <td>Dy</td> <td>Ho</td> <td>Er</td> <td>Tm</td> <td>Yb</td> <td>Lu</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>																		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu														
Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu																																
Agent de contrast						fàrmacs																																							

Figura 1.4 Elements de la taula periòdica que tenen aplicació en farmacologia i medicina. En blau els elements que es fan servir en la preparació d'agents de contrast en proves diagnòstiques i en fucsia els que es fan servir en l'elaboració de fàrmacs.

## 1.9 Mapa general dels camps d'estudi de la bioinorgànica

Com ja s'ha comentat en els seus inicis la Bioinorgànica es centrava fonamentalment en el paper dels ions metàl·lics essencials, però poc a poc s'ha anat ampliant i ara engloba tres aspectes ben diferenciats:

- El paper dels elements essencials.
- El paper d'agents externs. Dins d'aquest grup s'ha de diferenciar entre els que són elements tòxics i els que s'utilitzen en farmacologia.

La Figura 1.5 presenta de forma esquemàtica els diferents temes que s'aborden en aquest text.



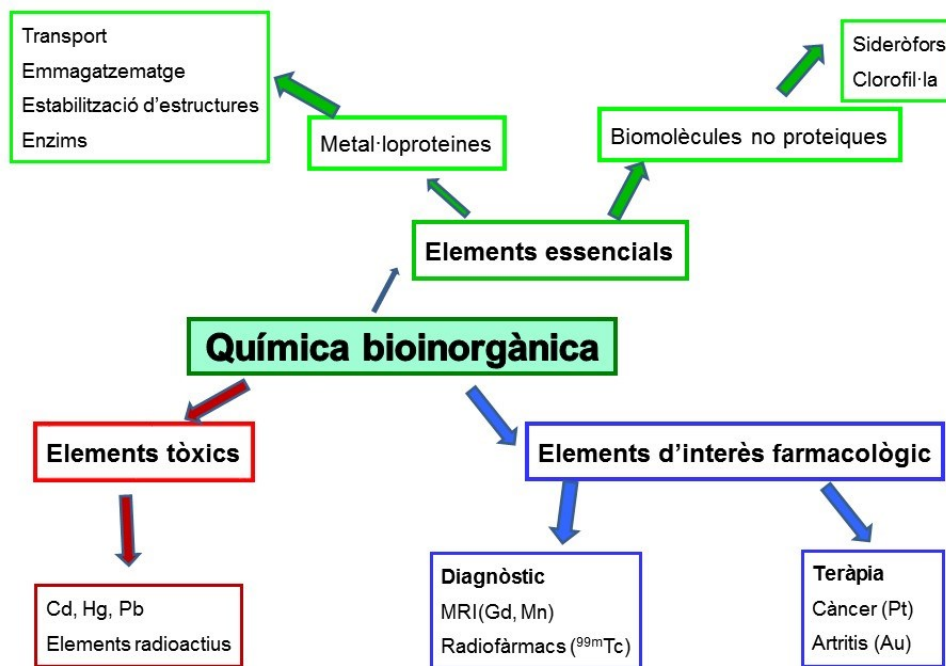


Figura 1.5 Mapa general de les branques que estudia la química bioinorgànica i alguns casos concrets.

## 2. MOLÈCULES BIOLÒGIQUES QUE PODEN ACTUAR COM A LLIGANDS

### 2.1 Les proteïnes i el centre actiu

La majoria de ions metàl·lics en els sistemes biològics es troben formant part de metal·loproteïnes en el que es coneix com centre actiu, que és el lloc on es coordina.

Les proteïnes estan formades per aminoàcids units covalentment entre si per l'enllaç peptídic. El que diferencia als aminoàcids és el grup R (Figura 2.1). Es coneixen uns 200 aminoàcids naturals, però n'hi ha una vintena que són els que formen les proteïnes i s'anomenen aminoàcids comuns; altres aminoàcids que es troben en les proteïnes poden derivar d'aquests 20.

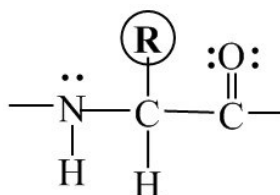


Figura 2.1 Enllaç peptídic entre aminoàcids.

El grup R d'aquests 20 aminoàcids té característiques ben diferenciades. N'hi ha tenen un grup R que no disposa de parells d'electrons solitaris i per tant no es pot coordinar als ions metàl·lics. Altres tenen grups R que poden formar enllaços per pont d'hidrogen (l'aspargina, Asn, la glutamina, Gln o el triptòfan, Trp), o presentar interaccions de tipus electrostàtiques ja que tenen un centre amb càrrega + (lisina, Lys o Arginina, Arg).

Hi ha tres aminoàcids que tenen un alcohol en el grup R. Entre ells hi ha la treonina (Thr) que té  $R = \text{CHOHCH}_3$  i no s'acostuma a trobar coordinat a ions metàl·lics, mentre que la serina (Ser) amb  $R = \text{CH}_2\text{OH}$  i la tirosina (Tyr) que té com a grup R el fenol ( $R = \text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ) es poden trobar coordinats a alguns ions metàl·lics.

Hi ha dos aminoàcids que tenen sofre en el grup R, en forma de tiol en la cisteïna (**Cys**) ( $R = \text{CH}_2\text{SH}$ ) i en forma de tioèter en la metionina (**Met**) en que  $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ . Entre aquest dos el que es troba més freqüentment coordinat a ions metàl·lics és la cisteïna, que en coordinar-se es desprotona quedant en la forma aniònica.

Els altres dos aminoàcids que trobem formant part de molts centres actius són la histidina (**His**) que té un grup  $R = \text{imidazole}$  (Figura 2.2) i dos aminoàcids amb grup carboxilat, l'aspartat (**Asp**) ( $R = \text{CH}_2\text{CO}_2^-$ ) i el glutamat (**Glu**) ( $R = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2^-$ ).

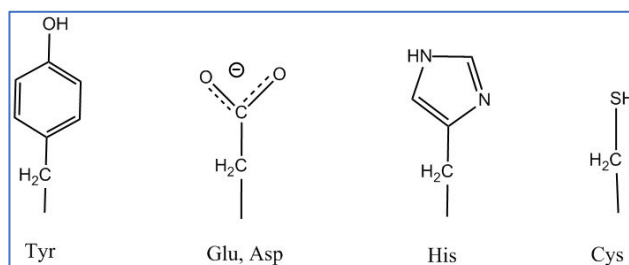


Figura 2.2 Grup R dels aminoàcids que es troben més freqüentment coordinats a ions metàl·lics.

Els aminoàcids que es troben més freqüentment coordinats a ions metàl·lics són: histidina, cisteïna i els que tenen carboxilat, i amb menor mesura, la tirosina. Tant la tirosina com la cisteïna quan es coordinen

es desprotonen i per tant actuen com a lligands aniònics. Així que tenim tres lligands aniònics amb funcions fenolat, tiolat i carboxilat. Per tant la tirosina i els carboxilats seran lligands amb àtom donador oxigen (base dura) i tindran afinitat per coordinar ions metàl·lics durs (radi petit i càrrega relativament gran). En canvi el tiolat, en coordinar-se pel sofre, que és una base tova, té més afinitat per cations tous, o sigui amb radis més grans i estats d'oxidació relativament baixos. Per exemple, el Fe(III) tindrà afinitat per lligands amb O- mentre que el Cu(I) pels lligands amb S-.

Per altra banda els lligands aniònics estabilitzen millor els complexos amb metalls en estat d'oxidació més gran que els lligands neutres.

L'altre aminoàcid que es troba coordinat a ions metàl·lics és la histidina. És un lligand neutre que es coordina pel N, i està en la franja intermèdia entre el caràcter dur i el tou. Això fa que sigui molt versàtil i la puguem trobar coordinada a ions metàl·lics durs i també als tous.

La majoria d'aquests aminoàcids es coordinen de forma monodentada; l'excepció son els aminoàcids que tenen grup carboxilat que poden trobar-se coordinats de forma monodentada, bidentada o actuant com a lligand pont entre dos centres metàl·lics (Figura 2.3). La histidina en la majoria dels cassos es troba coordinada de forma monodentada, ara be hi ha un sistema en el que es troba actuant com a lligand pont. Aquest és el cas de l'enzim superoxido dismutassa (SOD) que conté Cu i Zn en el seu centre actiu i en la que aquests ions estan units a través de la histidina que s'ha desprotonat i està actuant de pont.

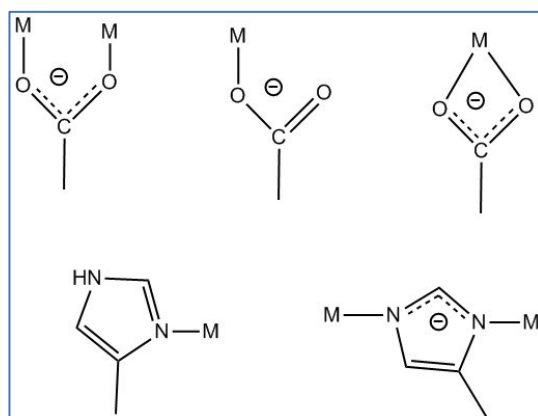


Figura 2.3 Modes de coordinació del lligand carboxilat i un cas particular de la histidina.

En centres actius formats per més d'un ió metàl·lic la presència de lligands pont aniònics minimitza la repulsió entre les càrregues positives dels cations metàl·lics propers.

## 2.2 Estructura de les proteïnes

Com ja s'ha comentat l'esquelet de la proteïna és una cadena formada per aminoàcids enllaçats covalentment. En alguns casos poden quedar aminoàcids cisteïna propers i es formen enllaços covalents entre els seus sofres, generant ponts disulfur (prot-S-S-prot).

Ara be, a part d'aquests enllaços covalents que formen l'esquelet de la proteïna hi ha enllaços per pont d'hidrogen entre els grups N-H i els C=O de la cadena, generant diferents disposicions en l'espai: quan aquestes interaccions es donen entre aminoàcids de la mateixa cadena genera un cert enrotllament (formació d'hèlix  $\alpha$ ) (Figura 4), mentre que si les interaccions son entre cadenes dona lloc a la formació de làmines ( $\beta$ ). Aquestes interaccions són les que donen l'**estructura secundària** de la proteïna.

La disposició que adopta a l'espai s'anomena **estructura terciària** i depèn de les interaccions entre els diferents residus i funcions que hi ha en la proteïna. En general els grups polars es disposen mirant cap

a l'exterior, que és més polar i els grups no polars cap a l'interior (Figura 2.4).

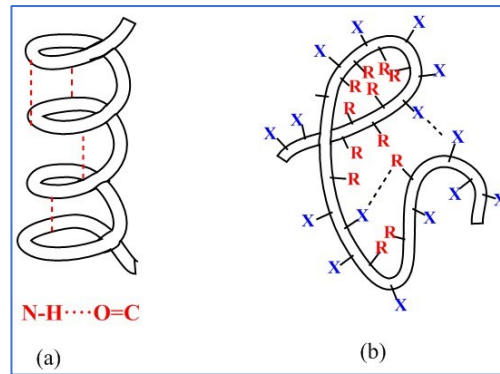


Figura 2.4 a) Enrotllament d'una cadena de proteïna degut a interaccions per enllaç per pont d'hidrogen entre els grups NH i CO de la cadena. b) Disposició a l'espai de la cadena de proteïna (estructura terciària).

Hi ha proteïnes que estan formades per més d'una subunitat, com és el cas de l'hemoglobina que està formada per 4 subunitats (Figura 2.5). La disposició relativa entre aquestes subunitats dona lloc a l'**estructura quaternària**. A l'igual que en l'estructura terciària, aquí també juguen un paper clau les interaccions de tipus electrostàtica i els enllaços per pont d'hidrogen entre els diferents grups R dels aminoàcids.

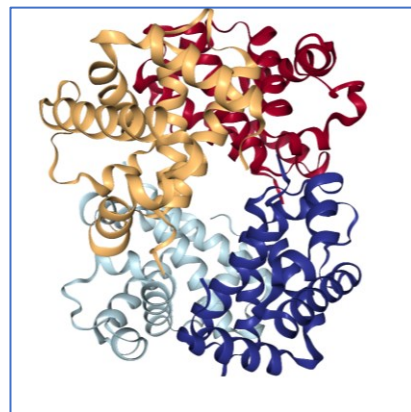


Figura 2.5 Disposició a l'espai de les quatre subunitats de l'hemoglobina, representades cadascuna en un color (PDB ID: 1HGB).<sup>5</sup>

Com ja s'ha comentat, una metal·loproteïna és una proteïna que té algun ió metàl·lic coordinat en l'espai que anomenem centre actiu. En algunes d'aquestes proteïnes la seva estructura terciària depèn de la coordinació del catió metàl·lic. Per exemple, les proteïnes conegudes com **dits de zinc**, si s'extreu el  $Zn^{2+}$  la disposició a l'espai de la proteïna canvia i perd la seva funció fisiològica. En aquests casos diem que l'ió metàl·lic té un paper estructural.

En canvi hi ha metal·loproteïnes en les que encara que s'extregui el catió metàl·lic l'estructura terciària no varia. Això passa per exemple en la **plastocianina**, que és una proteïna de coure que participa en el transport d'electrons. Evidentment si s'extreu el coure no té la funció de transport d'electrons, però la disposició a l'espai de la proteïna no canvia.

Quan es parla de que una proteïna es desnatura vol dir que canvia la seva estructura terciària. Aquest procés pot ser:

- Irreversible: quan hi ha pèrdua de l'activitat fisiològica. Per exemple per escalfament, el que passa amb els ous, o per efecte del pH quan es qualla la llet.
- Reversible: els canvis que es donen són reversibles, com pot ser el trencament i formació dels enllaços S-S entre residus de cisteïna (Figura 2.6).

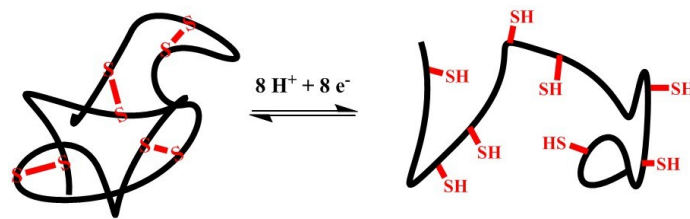


Figura 2.6 Formació i trencament dels enllaços entre tiols de cisteïna properes.

### 2.3 Altres lligands

En els sistemes biològics hi ha altres molècules que poden coordinar als ions metàl·lics i que no formen part de les proteïnes. Entre aquestes molècules les més importants són les que tenen un lligand nitrogenat macrocíclic tipus porfirina i els seus derivats (Figura 2.7). Aquests lligands tenen un precursor comú que s'ha anat modificant per adaptar-se a la funció que té que realitzar aquest centre actiu i a l'ió metàl·lic que ha de coordinar.

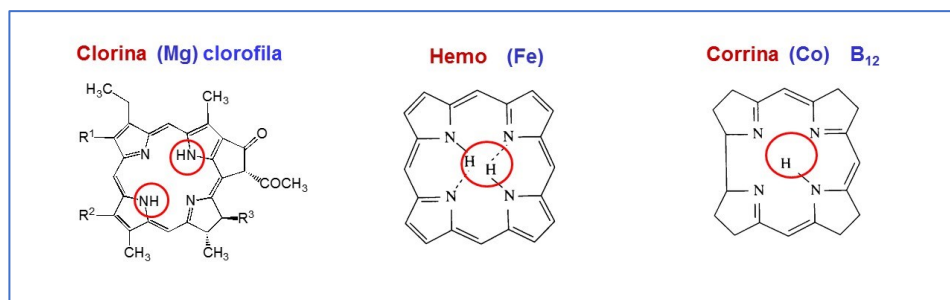


Figura 2.7. Lligands del tipus macrocicle nitrogenat que formen part de centres actius. S'indica l'ió metàl·lic que es coordina a aquests lligands i el nom del sistema.

El grup **hemo**, és un lligand tipus porfirina que coordina al ions del **ferro**. En coordinar-se al catió es desprotona, i per tant, estem parlant d'un lligand aniònic, amb dues càrregues negatives. Gràcies al conjunt de dobles enllaços que presenta aquest anell, amb un sistema  $\pi$  deslocalitzat aquest anell és pla.

La **clorina**, que coordina al **magnesi**, en la **clorofil·la**, té un anell similar, amb la mateixa càrrega (perd els dos protons en coordinar-se al  $Mg^{2+}$ ) i la mateixa mida de cavitat, ja que el seu esquelet té el mateix nombre d'àtoms de carboni. La diferència amb el grup hemo és que hi ha menys dobles enllaços, el que l'hi proporciona una certa flexibilitat i pèrdua de la planaritat.

El grup **corrina** que forma part de la vitamina **B<sub>12</sub>** i els sistemes relacionats, té ió **cobalt** coordinat. Comparat amb els altres dos lligands observem algunes diferències. És un lligand monoaniònic i el seu esquelet té un àtom de carboni menys, per tant presenta una cavitat més petita que el grup hemo. L'altra diferència significativa és que a l'igual que la clorina, no té el sistema  $\pi$  complet, i per això presenta major flexibilitat que el grup hemo.

En general, en els centres actius formats per aquests lligands l'ió metàl·lic es coordina també, al menys per una de les posicions axials, a un aminoàcid d'una cadena de proteïna.

## 2.4 Nucleòtids i polinucleòtids

Unes altres molècules rellevants en diversos processos fisiològics són els nucleòtids i els polinucleòtids. Un nucleòtid està format per un grup fosfat, un sucre i una base nitrogenada, enllaçats en aquest ordre: fosfat-sucre-base nitrogenada.

El sucres són la ribosa i la 2'-deoxiribosa. Les bases nitrogenades pertanyen a dues famílies: les purines i les pirimidines (Figura 2.8).

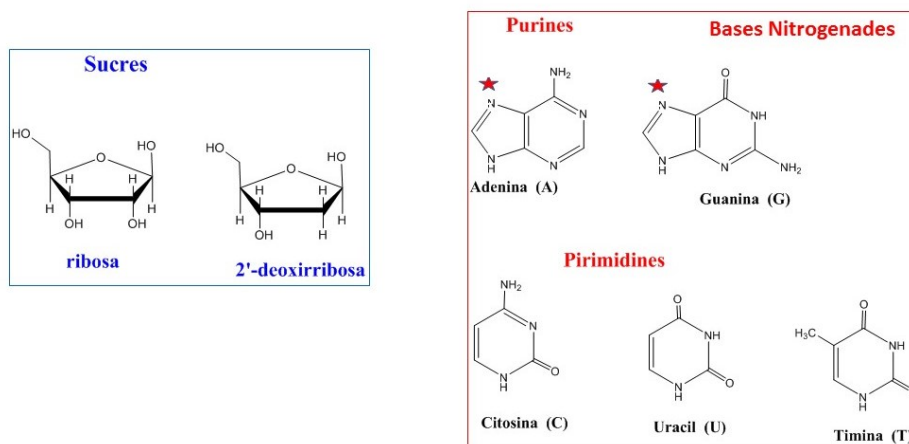


Figura 2.8 Sucres i bases nitrogenades que formen els nucleòtids. L'estrella indica la posició en la que es pot coordinar el  $Pt^{2+}$  dels compostos emprats com agents antitumorals.

El  $Pt^{II}$  té afinitat per coordinar-se a les bases de tipus purina i ho fa en la posició marcada amb una estrella a la Figura 2.8. Com es pot veure en la Figura, aquestes bases tenen diferents grups que poden formar enllaços d'hidrogen.

Derivats dels nucleòtids podem tenir:

- Mono i dinucleòtids.
- Polímers, és a dir, els polinucleòtids.

En el grup dels mono i dinucleòtids tenim tres espècies que són molt importants ja que participen en processos redox, gràcies a que tenen una base (diferent a les mencionades abans) que pot presentar una forma oxidada i una reduïda. Una d'aquestes bases és la nicotinàmida, present en el dinucleòtid  $NAD^+$  (forma oxidada o  $NADH$  en la forma reduïda) format per les bases nicotinàmida i adenina. L'altra base nitrogenada és la flavina. Amb aquesta base es troba un mononucleòtid, flavina mononucleòtid, FMN en la forma oxidada i  $FMNH_2$  en la reduïda. I també un dinucleòtid format per les dues bases adenina i flavina, que a l'igual que el mononucleòtid pot presentar les dues formes, oxidada FAD i reduïda  $FADH_2$  (Figura 2.9).

La seqüència dels components dels dinucleòtids és: adenina-sucre-difosfat- sucre-base redox on la base que té propietats redox pot ser la flavina o la nicotinàmida.

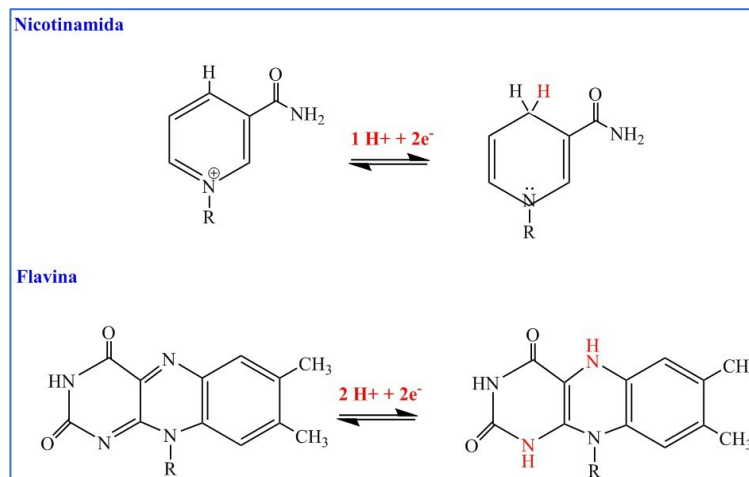


Figura 2.9 Bases nitrogenades que tenen propietats redox.

En el grup dels polinucleòtids podem parlar de l'ADN i de l'ARN. Des del punt de vista de la bioinorgànica el que té més rellevància a nivell del que aquí es presenta és l'ADN.

En la formació de les cadenes de nucleòtids, l'esquelet està format per la seqüència -fosfat-sucre- i és en el sucre (la 2'-deoxiribosa) on està enllaçada la base nitrogenada (de la família de les purines i les pirimidines). Entre dues cadenes d'ADN es poden establir enllaços per pont d'hidrogen entre les seves bases nitrogenades. Les parelles més favorables són entre bases de les dos famílies, purines i pirimidines. Així es poden trobar les interaccions entre A-T i G-C (Figura 2.10). Aquesta interacció dona estabilitat a l'estructura enrotllada i de doble hèlix de l'ADN.

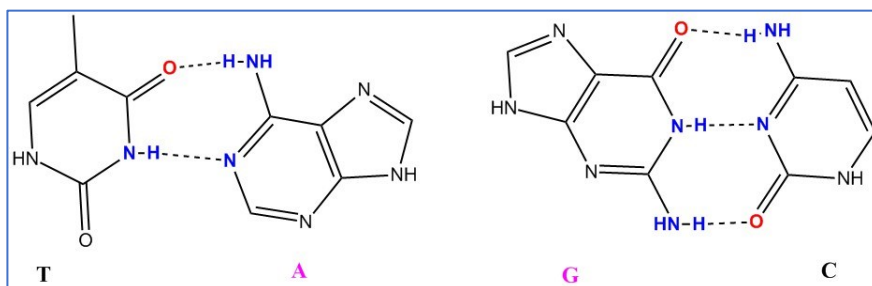


Figura 2.10 Interacció per enllaços per pont d'hidrogen entre les bases nitrogenades de la família de les purines (fúcsia) i les pirimidines (negre).

El fet de que les bases interaccionin entre elles propicia que en la doble hèlix els grups fosfats quedin a la part exterior. Així doncs en l'ADN trobem que les càrregues negatives, la part polar, està a la part externa mentre que la zona menys polar queda a l'interior. Per altra banda, la formació dels enllaços per pont d'hidrogen entre les parelles de bases propicia la disposició paral·lela d'aquest grups. Com que aquestes bases tenen orbitals  $\pi$  perpendiculars als anells, hi ha una certa interacció  $\pi$ - $\pi$  entre les bases apilades que reforça l'estabilitat (Figura 2.11).

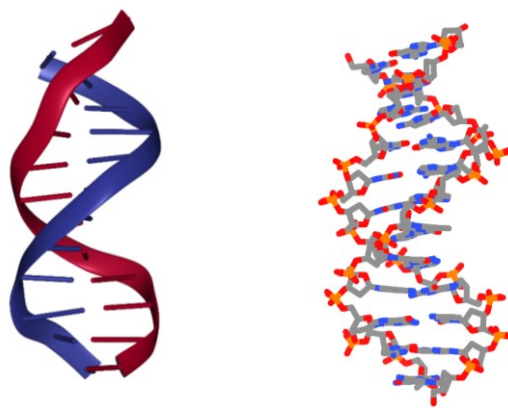


Figura 2.11. Dues formes de visualitzar la doble hèlix de l'ADN. (PDB: referència 9BNA).<sup>6</sup> En la Figura de la dreta: O vermell, N blau, C gris i P taronja.

## 2.5 La cèl·lula

En bioinorgànica es parla de molts tipus diferents d'organismes. Alguns són cèl·lules procariotes mentre que en d'altres les seves cèl·lules són eucariotes.

Alguns centres actius dels que parlarem es troben en bacteris, que tenen cèl·lules procariotes, menys compartimentades en el seu interior que les eucariotes. Dins d'aquest grup de bacteris trobem els arqueobacteris, els bacteris metanogènics, els termòfils, els extremis, els cianobacteris... En general aquests organismes tenen un ADN circular. Aquestes cèl·lules no tenen una membrana que separi el nucli i són més antigues a nivell evolutiu.

Les cèl·lules eucariotes es troben en fongs, algues, animals i plantes. En aquestes cèl·lules hi ha diferents espais i compartiments, i hi ha una membrana que aïlla el nucli. El citoplasma és l'espai que hi ha entre el nucli i la membrana exterior. Al seu interior hi ha el citosol, el líquid on hi ha els diferents compartiments o orgànuls, filaments, sals dissoltes, etc.

En els organismes amb cèl·lules eucariotes hi ha processos que es donen en el citosol, d'altres en els compartiments, altres en la membrana. A més, en els organismes pluricel·lulars i ha processos que tenen lloc a l'espai extracel·lular.

Dels diferents compartiments que hi ha podem destacar el reticle endoplasmàtic, que és on hi ha la reserva de calci. En els lisosomes hi ha reaccions d'hidròlisi i en els mitocondris és on hi ha els processos metabòlics. Aquí se sintetitza el ATP (trifosfat d'adenosina) que és una molècula reserva d'energia; hi ha reaccions redox i aquí hi ha sistemes que contenen Fe i Cu.

Per tant, per tal de que un ió metàl·lic arribi al centre actiu del que ha de formar part cal que pugui entrar a l'interior cel·lular, o sigui que ha de creuar la membrana cel·lular. Per això es requereix un sistema de transport més o menys sofisticats per afavorir el pas a través de la membrana.



### 3. TÈCNiques MÉS UTILITZADES EN EL CONEIXEMENT DEL CENTRE ACTIU

#### 3.1 Una breu introducció a la química de coordinació

L'objectiu de la bioinorgànica és conèixer el centre actiu, obtenir la màxima informació sobre quin ió metàl·lic conté, en quin estat d'oxidació es troba, quins lligands té al seu voltant, etc. Hi ha diferents tècniques que poden aportar informació, moltes d'elles són tècniques espectroscòpiques. L'objectiu d'aquest llibre no és descriure el fonament ni aprofundir en aquestes tècniques sinó tan sols explicar breument l'aplicació que tenen en el camp de la bioinorgànica.

Com ja s'ha comentat el centre actiu és pot considerar un compost de coordinació, en el que hi ha un ió metàl·lic envoltat de lligands biològics. Com que la majoria de ions que s'estudien pertanyen a la primera sèrie de transició es pot utilitzar la teoria del camp cristal·lí (TCC), que és un model senzill, per explicar les dades espectroscòpiques.

La TCC considera que els lligands al voltant de l'ió central, disposats en una determinada geometria provoquen, degut a les repulsions entre els electrons de l'ió metàl·lic i dels lligands, una pèrdua de degeneració dels orbitals  $d$ . Els orbitals  $3d$  del metall central ja no tenen la mateixa energia: hi ha el desdoblament dels orbitals  $d$  que depèn dels lligands que hi ha al voltant. És a dir, hi ha lligands que provoquen major repulsió que d'altres i per tant un major desdoblament. Això comporta que un ió metàl·lic pugui presentar una configuració electrònica de spin alt o de spin baix, depenent de quina situació sigui més favorable: superar la barrera energètica o be aparellar els electrons. Si el desdoblament del camp cristal·lí és gran (camp fort) és més favorable energèticament que hi hagi aparellament dels electrons. En la Figura 3.1 es presenta el diagrama d'energia del desdoblament dels orbitals  $d$  per un ió  $Fe^{3+}$  que té una configuració electrònica  $3d^5$ . Quan el desdoblament és petit (camp feble) és més favorable que els electrons es col·loquin el màxim de desaparellats possible, per tant l'espín  $S = 5/2$ . Quan el desdoblament és gran (camp fort), els orbitals de major energia no s'omplen, i en el cas de l'ió  $Fe^{3+}$  tan sols queda un electró desaparellat, per tant l'espín és  $S = 1/2$ . Per tant, segons el desdoblament dels orbitals  $d$  podem tenir diferent espín. Així que quan el camp és fort es diu que la configuració electrònica de l'ió metàl·lic és d'espín baix, mentre que si és de camp feble és d'espín alt.

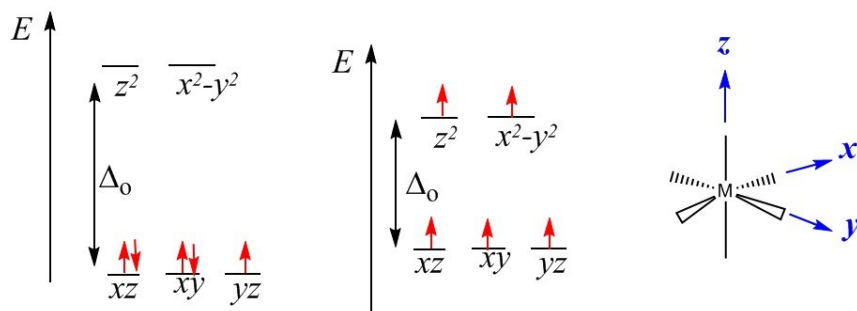


Figura 3.1 Desdoblament del camp cristal·lí per un ió  $Fe^{3+}$  en un entorn octaèdric per: camp fort o espín baix (esquerra) i camp feble o espín alt (dreta).

En diferents processos biològics trobem molècules petites que interaccionen amb els centres metàl·lics. Son de rellevant importància les molècules de  $O_2$  i  $N_2$  ja que aquestes espècies actuen com a lligands  $\pi$ -àcid. Un lligand  $\pi$ -àcid és aquell que té orbitals buits que poden formar enllaços  $\pi$  amb els orbitals  $d$  del metall. En el cas d'aquestes molècules tenen orbitals  $\pi^*$  parcialment buits o buits, com es pot veure en el diagrama d'orbitals moleculars (Figura 3.2). El diagrama utilitzat per la molècula de  $N_2$  es pot utilitzar també per la molècula de  $CO$  i per l'anió  $CN^-$ .

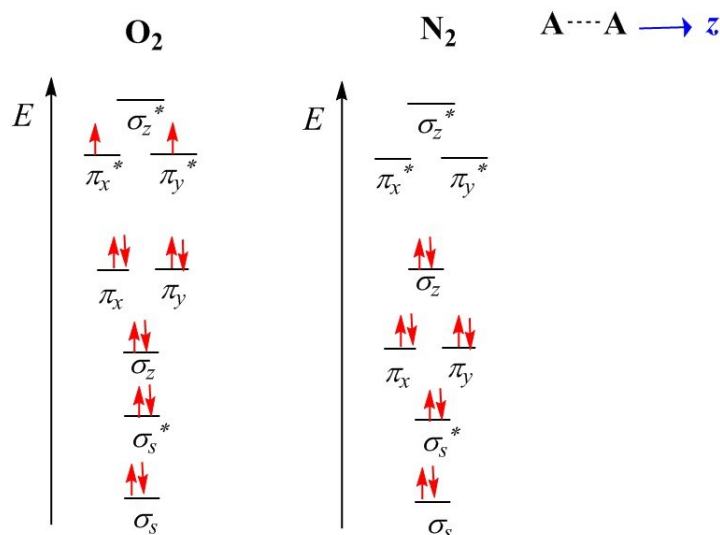


Figura 3.2 Diagrama d'orbitals moleculars per les molècules de  $O_2$  i  $N_2$ .

### 3.2 Tècniques de raigs X

La tècnica de difracció de raigs X permet resoldre l'estructura cristal·lina, i per tant, determinar la posició dels diferents àtoms que formen la molècula. Per això cal disposar d'un bon cristall, cosa no sempre fàcil d'obtenir. En el cas de les metal·loproteïnes l'entorn del metall sovint s'obté amb una baixa resolució. No obstant, actualment s'ha pogut determinar l'estructura cristal·lina de moltes metal·loproteïnes i enzims, tot i que no sempre en totes les formes en les que es troba, per exemple forma oxidada i reduïda.

Hi ha una altra tècnica de raigs X que serveix quan no es pot resoldre l'estructura, ja que aporta informació sobre el centre actiu: és la tècnica d'absorció de raigs X. En realitat hi ha dues tècniques XANES (X-ray absorption near edge spectroscopy) i EXAFS (extended X-ray absorption fine structure). Les dues tècniques es basen en l'absorció de la radiació però analitzen diferent zona de l'espectre d'absorció enfront de l'energia de la radiació X.

La radiació X provoca transicions dels electrons de les capes més internes,  $1s$ ,  $2s$  i  $2p$  cap a orbitals buits. Aquestes transicions es donen a una energia just per sota de l'energia llindar, o sigui just abans de la ionització. És el que es coneix com "pre-edge". I l'energia de ionització correspon al "edge". L'anàlisi d'aquesta zona correspon a la tècnica XANES. Quan l'energia és suficient per arrencar l'electró aquest electró alliberat es comporta com una ona interferint amb els altres electrons i les ondulacions que apareixen en l'espectre aporten informació sobre l'entorn del centre metàl·lic.

La combinació de les dues tècniques (XANES i EXAFS) aporta informació sobre diferents aspectes del centre actiu, especialment per comparació de les dades amb les de compostos model amb estructura coneguda:

- Permet saber si la primera esfera de coordinació del centre metàl·lic està formada per àtoms "lleugers", com el N o O, o be si hi ha S. El que no permet és diferenciar entre O i N ja que la seva densitat electrònica és massa semblant.
- Permet determinar l'estat d'oxidació del metall.
- Aporta informació sobre les distorsions que hi ha en l'entorn del metall.

### 3.3 Espectroscòpia de Ressonància d'espín electrònic (RSE)

Aquesta tècnica és molt útil en bioinorgànica. Per poder aplicar aquesta tècnica cal que l'ió metàl·lic tingui un espín electrònic diferent de zero ( $S \neq 0$ ), i en els aparells convencionals el que s'estudia habitualment són sistemes amb espín electrònic fraccionari. Per un sistema que tingui un electró desaparellat, com pot ser el  $\text{Cu}^{2+}$  l'espín electrònic  $S = 1/2$  té dos valors de  $M_S$  ( $-1/2$  i  $+1/2$ ) que deixen de ser degenerats quan s'aplica un camp magnètic (Figura 3.3). Si aquesta mostra està sotmesa a un radiació de freqüència coneguda, en el moment que el desdoblament degut a l'efecte Zeeman (efecte d'aplicar un camp magnètic) coincideixi amb l'energia de la radiació es dona la ressonància, la transició, i és quan s'observa una banda en l'espectre. Els espectres de RSE es presenten en forma de la primera derivada. Les transicions permeses són les que compleixen  $\Delta M_S = \pm 1$ .

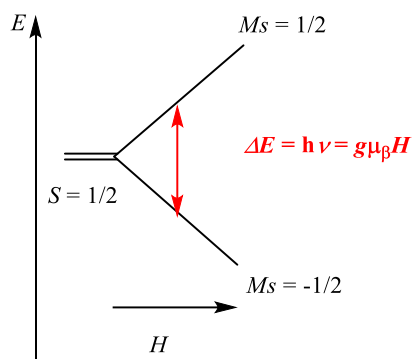


Figura 3.3 Efecte Zeeman electrònic. Desdoblament de les dues components  $M_S$  de l'espín electrònic per efecte del camp magnètic. Condició de ressonància: quan l'energia del desdoblament coincideix amb l'energia de la radiació aplicada.

L'energia de cada  $M_S$  en funció del camp magnètic és  $M_S g \mu_B H$ . El valor de  $g \approx 2.0$  per l'electró lliure i les desviacions respecte a aquest valor depenen de l'entorn.  $\mu_B$  és una constant, el magnetó de Bohr.

La **posició de la banda** en l'espectre es pot expressar indicant el camp al que es dona la ressonància o pel **valor de g**. En aquest llibre es parlarà sempre del valor de  $g$ .

Si l'entorn metàl·lic presenta distorsions, com és el cas del  $\text{Cu}^{2+}$  que presenta l'efecte Jahn-Teller, encara que tan sols hi ha una transició podem veure dos o tres senyals, o sigui tindrem dos o tres valors de  $g$ .

La **distorsió Jahn-Teller**, en el cas del  $\text{Cu}^{2+}$  que és un ió  $d^9$ , és deguda a que els orbitals  $d$  de més energia  $z^2$  i  $x^2-y^2$  no tenen el mateix nombre d'electrons, i per tant no estan degenerats. En menor mesura també passa amb els de més baixa energia que perden parcialment la degeneració. Això afecta a l'espectre RSE i podem trobar  $g_z \neq g_x = g_y$  quan tenim una distorsió axial (elongació o compressió en la direcció  $z$ ), i el senyal corresponent a la direcció  $z$  serà de menor intensitat que el corresponent a les altres dues. També es pot parlar de  $g_{\parallel} = g_z$  i  $g_{\perp} = g_x = g_y$ . Quan a més de la distorsió axial hi ha distorsió en el pla, les tres components seran diferents  $g_z \neq g_x \neq g_y$ . De totes formes, per aquest ió tant si s'observen dues o tres bandes, sempre estan al voltant de  $g \approx 2$ .

Quan en el centre actiu hi ha una espècie radicalària, per exemple el radical tirosina ( $\text{Tyr-O}\cdot$ ) o l'anió superòxid ( $\text{O}_2^-$ ) apareix un senyal a  $g \approx 2,00$  (similar a l'electró lliure) molt estreta, a diferència del que passa quan tenim el mateix espín electrònic  $S = 1/2$  però degut a un ió metàl·lic.

Quan el nucli presenta espín nuclear ( $I \neq 0$ ) hi ha acoblament hiperfí (acoblament entre l'espín electrònic i l'espín nuclear) i el senyal es desdobla en  $2nI+1$  senyals. En la Figura 3.4 es mostra aquest acoblament pel cas del coure que té un espín nuclear  $I_{\text{Cu}} = 3/2$  ( $n =$  nombre de nuclis). En aquest cas el que seria un senyal ens pot aparèixer desdoblament en 4. Si la interacció nucli-electró és feble, l'acoblament hiperfí és

petit i pot ser que no s'arribi a observar, veient-se tan sols una banda més ampla.

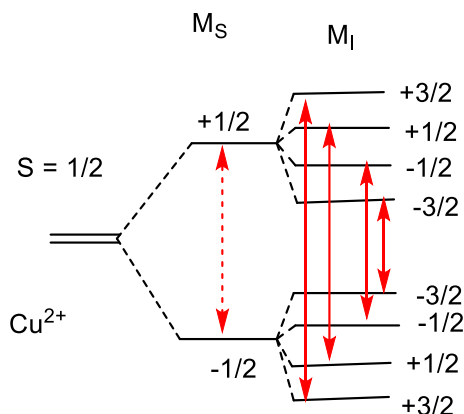


Figura 3.4 Desdoblament degut a l'acoblament hiperfí per un ió  $\text{Cu}^{2+}$  ( $I_{\text{Cu}} = 3/2$ ).

L'acoblament hiperfí ens permet detectar, en algun cas, la presència de  $\text{Cu}^+$  que és un ió  $d^{10}$  i per tant no presenta espectre RSE. Un sistema  $\text{Cu}^{2+}\text{-X-Cu}^+$ , si és de valència mixta deslocalitzada, tenim un sol electró desaparellat que veu als dos nuclis de Cu. Per tant  $n = 2$  i es veuen 7 senyals.

Per sistemes amb  $S > 1/2$ , el cas més rellevant en bioinorgànica és el del ferro formant part del grup **hemo** (Figura 3.5). La configuració electrònica depèn molt dels lligands en axial. Quan una posició en axial està vacanta, el nombre de coordinació **NC = 5** i la configuració electrònica és d'**espín alt**. En canvi si les dues posicions les ocupen aminoàcids de la cadena de proteïna (**NC = 6**) llavors presenta configuració electrònica d'**espín baix**.

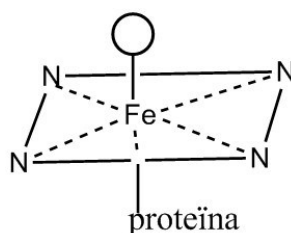


Figura 3.5 Esquema del Fe-hemo amb el Fe en un anell aromàtic. Una posició axial ocupada per un residu de la cadena de proteïna (ligand O-, N- o S-) i l'altra posició pot estar vacanta, ocupada per  $\text{H}_2\text{O}$  o per un altre residu de la cadena de proteïna.

En el cas del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  ( $d^6$ ) si és d'espín baix  $S = 0$  i si és d'espín alt  $S$  és un nombre enter ( $S = 2$ ) i per tant no s'observa espectre RSE. En canvi quan tenim  $\text{Fe}^{\text{III}}$  si és d'espín baix  $S = 1/2$  i per tant veurem espectre RSE amb un senyal a  $g \approx 2$ . En canvi quan té una configuració d'espín alt  $S = 5/2$  l'espectre és molt diferent. L'entorn del ferro en el grup hemo presenta una forta distorsió axial el que fa que els diferents  $M_S = \pm 5/2, \pm 3/2; \pm 1/2$  a camp magnètic nul ja presenten pèrdua de la degeneració. És el que es coneix com desdoblament a camp nul (zero field splitting, ZFS). Si el desdoblament és gran, (Figura 3.6) que és el que passa en el cas del Fe-Hemo, l'única transició permesa, serà la que va del  $M_S = -1/2$  al  $M_S = +1/2$ , i per tant tot i que l'espín electrònic és  $S = 5/2$  des del punt de vista del RSE es comporta com un sistema amb un espín efectiu  $S_{\text{ef}} = 1/2$ .

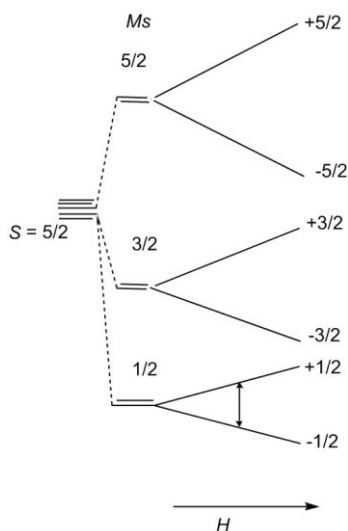


Figura 3.6 Desdoblament a camp nul i efecte Zeeman per un ió amb espín  $S = 5/2$  en un entorn amb distorsió axial.

Ara be, hi ha una diferència significativa entre l'espectre RSE d'un sistema amb  $S = 1/2$  i el d'un sistema amb  $S_{\text{ef}} = 1/2$ . Com ja s'ha dit, en el primer cas la banda o bandes ( $g_{\parallel}$  i  $g_{\perp}$ ) apareixen al voltant de 2,0 mentre que en el segon cas al menys una de les components de  $g$  apareix a valors molt més grans que 2,0.

A diferència del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  en el grup hemo, el  $\text{Mn}^{\text{II}}$  que té la mateixa configuració electrònica presenta bandes al voltant de  $g \sim 2$  ja que el ZFS dels seus compostos és petit.

Per tant, per espectroscòpia RSE es pot diferenciar entre  $\text{Cu}^{\text{II}}$  (bandes al voltant de 2,0) i  $\text{Cu}^{\text{I}}$  (silencios en RSE), així com entre  $\text{Fe}^{\text{III}}$  (presenta RSE) i  $\text{Fe}^{\text{II}}$  (no s'observa espectre). Pel  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a més permet diferenciar si és d'espín alt amb distorsió axial o d'espín baix.

Per tant, la tècnica de RSE aporta informació del centre actiu i possibles canvis en l'estat d'oxidació, així com detectar si hi ha la formació d'algun radical durant la reacció, ja que donen un senyal estret característic a  $g = 2,0$ .

### 3.4 Espectroscòpia electrònica

Quan s'aplica radiació visible o UV sobre la mostra es donen les transicions entre orbitals. Hi ha tres tipus de transicions a tenir en compte: les  $d \rightarrow d$ , les  $\pi \rightarrow \pi^*$  i les de transferència de càrrega.

Les transicions del tipus  $d \rightarrow d$  apareixen en la regió del visible i depenen molt de la geometria i de l'ió metàl·lic. Si la geometria és tetraèdrica les bandes són més intenses que si la geometria és octaèdrica, ja que compleixen la regla de selecció orbital (regla de Laporte) i d'espín. Des del punt de vista de la bioinorgànica aquestes bandes no aporten massa informació.

L'espectroscòpia Visible-UV és interessant per reconèixer la presència del grup hemo. El lligand porfirínic, amb un sistema aromàtic, presenta tres bandes característiques corresponents a transicions entre orbitals de tipus  $\pi$ , són transicions  $\pi \rightarrow \pi^*$ . La banda més intensa apareix a 400-500 nm i se la coneix com la banda Soret o banda  $\gamma$ . Hi ha dues bandes més, molt menys intenses ( $\alpha$  i  $\beta$ ) en la regió de 500-600 nm (Figura 3.7). Aquest conjunt de bandes és un patró característic del Fe-hemo.

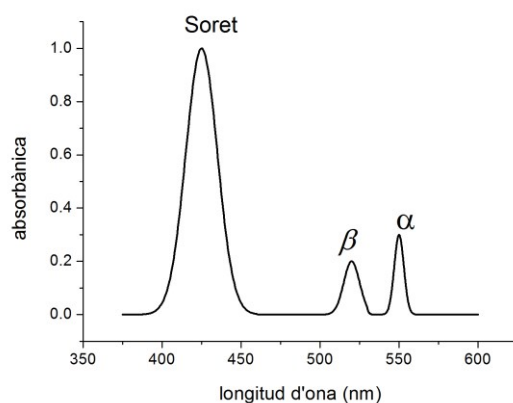


Figura 3.7 Simulació de l'espectre visible del sistema Fe-Hemo.

Per últim hi ha les bandes de transferència de càrrega lligand  $\rightarrow$  metall que són permeses per les regles de selecció i són molt intenses. Aquestes bandes són molt significatives en el cas de proteïnes de ferro i de coure. Un dels lligands que dona aquest tipus de bandes és el sofre, per exemple el sofre de la cisteïna (Cys-S<sup>-</sup>) en les proteïnes anomenades Fe-S o en les proteïnes blaves de coure. En ambdós casos la coloració és intensa degut a les bandes de transferència de càrrega Cys-S<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Fe<sup>n+</sup> (entre 350-600 nm) i les bandes Cys-S<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Cu<sup>2+</sup> (al voltant de 600 nm).

Un altre lligand que també dona bandes de transferència de càrrega és la tirosina quan està coordinada al Fe<sup>III</sup> (Tyr-O<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Fe<sup>3+</sup>).

### 3.5 Espectroscòpia Mössbauer

L'espectroscòpia Mössbauer analitza les transicions que es donen en el nucli per efecte de la radiació  $\gamma$ . L'element més estudiat amb aquesta tècnica és el ferro, el <sup>57</sup>Fe. Tot i que actualment es fa servir també en l'estudi d'altres ions metàl·lics, aquí ens centrarem únicament en la seva aplicació en els sistemes de ferro.

La font d'energia que es fa servir és el mateix isòtop que està en un estat excitat, <sup>57</sup>Fe\*. Per obtenir aquesta font d'energia es parteix del <sup>57</sup>Co, que és un isòtop que té una vida mitja d'uns nou mesos. En descompondre dona lloc a la formació del <sup>57</sup>Fe. Va perdent energia en passar del <sup>57</sup>Co al <sup>57</sup>Fe en el seu estat excitat  $I = 5/2$  però ràpidament cau al  $I = 3/2$  que té una vida mitja de 97,8 ns. O sigui que també descompon ràpidament per arribar a l'estat fonamental  $I = 1/2$ . La caiguda des de l'estat  $I = 3/2$  al  $I = 1/2$  allibera 14,4 keV.

Per tant la font de radiació és aquest <sup>57</sup>Fe\* que va alliberant radiació, per altra banda, la mostra que conté <sup>57</sup>Fe absorbirà aquesta radiació quan coincideixi amb la transició entre el  $I = 1/2$  i el  $I = 3/2$ . Cal remarcar que en el ferro natural hi ha tan sols un 2,2 % de <sup>57</sup>Fe.

El que s'observa en un espectre Mössbauer és la transició que es dona en la mostra entre aquests dos estats d'espín nuclear:  $1/2 \rightarrow 3/2$ . La forma d'expressar on apareix aquesta transició és coneix com desplaçament isomèric,  $\delta$ . Ara bé, el nucli del Fe no és esfèric i té moment quadrupolar, que provoca el que s'anomena desdoblament quadrupolar,  $\Delta E_Q$ , perdent-se la degeneració entre els  $M_I, \pm 3/2$  i  $\pm 1/2$ . (Figura 3.8).

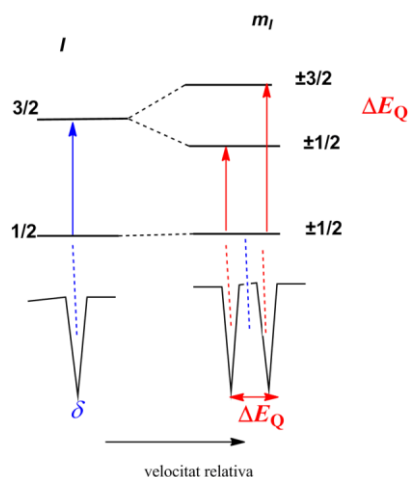


Figura 3.8 Esquema que representa les transicions corresponents a l'espectre Mössbauer del  $^{57}\text{Fe}$ .

El **desplaçament isomèric** aporta informació sobre l'estat d'oxidació del ferro i també sobre la seva configuració electrònica, si és d'espín alt o d'espín baix. En línies generals es pot dir que  $\delta(\text{Fe}^{\text{II}}) > \delta(\text{Fe}^{\text{III}})$  i que  $\delta(\text{spin alt}) > \delta(\text{spin baix})$ .

El **desdoblament quàdrupolar** dona informació sobre la distorsió del centre actiu. Com més gran és  $\Delta E_Q$  major és la distorsió.

L'inconvenient que presenta aquesta tècnica és la baixa concentració que hi ha de  $^{57}\text{Fe}$  en les mostres biològiques.

### 3.6 Espectroscòpia vibracional

Les metal·loproteïnes són molècules voluminoses en les que hi ha molts enllaços covalents i per tant moltes vibracions. En bioinorgànica aquesta espectroscòpia (Infraroig i Raman) és útil en el seguiment de reaccions en les que hi intervenen molècules com el  $\text{O}_2$  o el  $\text{N}_2$ . L'espectre vibracional permet veure els canvis en la força de l'enllaç i l'ordre d'enllaç.

Per exemple, la vibració O-O canvia molt en el procés de reducció, com es pot veure en la taula 3.1. En aquesta taula s'indica també el rang observat en els centres actius que coordinen la molècula d'oxigen. Per tant aquesta tècnica permet veure si la reducció de l'oxigen es dona formant un intermedi peròxid o superòxid, és a dir, si és una reducció amb un o dos electrons.

La freqüència de vibració per altres molècules d'interès en bioinorgànica són:  $\nu(\text{NO}) = 1880 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{CO}) = 2145 \text{ cm}^{-1}$  i  $\nu(\text{N}_2) = 2330 \text{ cm}^{-1}$ .

Taula 3.1 Vibració de l'enllaç O-O segons la força de l'enllaç.

	$\nu(\text{O-O}) / \text{cm}^{-1}$		Rang de $\nu / \text{cm}^{-1}$
$\text{O}_2$	1555	$\text{M}^{\text{n}+}-\text{O}_2$	
$\text{KO}_2$	1108	Tipus superòxid ( $\text{M}^{\text{m}+}-\text{O}_2^-$ )	1100–1200
$\text{Na}_2\text{O}_2$	~760	Tipus peròxid ( $\text{M}^{\text{m}+}-\text{O}_2^{2-}$ )	920–750

### 3.7 Propietats magnètiques

Una altra tècnica, aquesta no espectroscòpica, que aporta molta informació sobre el centre actiu és l'estudi de les propietats magnètiques. Per sistemes mononuclears la mesura del moment magnètic efectiu ( $\mu_{\text{ef}}$ ) o de la susceptibilitat magnètica molar per la temperatura ( $\chi_{\text{MT}}$ ) dona informació sobre el nombre d'electrons desaparellats que hi ha. La relació entre elles és:  $8\chi_{\text{MT}} = \mu_{\text{ef}}^2 = n(n+2) = g^2 S(S+1)$ .

Per tant, per un sistema mononuclear aquestes mesures ens permeten saber l'estat d'oxidació de l'ió metàl·lic i la seva configuració electrònica, si és d'espín alt o baix.

En sistemes polinuclears en que hi hagi més d'un ió paramagnètic (que tingui electrons desaparellats) pot haver-hi una certa interacció entre aquests centres metàl·lics, que generalment es dona a través d'un o més lligands que fan de pont.

Si tenim un centre dinuclear format per ions Cu(II), l'electró desaparellat de cada ió té un espín 1/2 i en establir-se una interacció magnètica entre ells pot donar dues situacions diferents (Figura 3.9):

- Quan la interacció és de tipus ferromagnètica (F) els dos espins tenen el mateix  $M_s$  (orientats de la mateixa manera) i per tant, l'espín total de l'estat fonamental serà  $S = 1$ .
- Quan la interacció és de tipus antiferromagnètic (AF) els dos spins tenen el  $M_s$  de signe oposat i l'espín total de l'estat fonamental és  $S = 0$ .

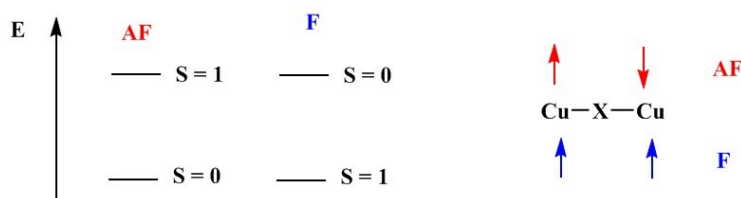


Figura 3.9 Tipus d'interacció magnètica entre dos ions Cu(II). **F** = ferromagnètica, **AF** = antiferromagnètica.

### 3.8 Tipus de coure en metal·loproteïnes

El coure que es troba formant part de metal·loproteïnes i metal·loenzims es pot classificar en funció de les seves característiques espectroscòpiques. Es pot parlar de tres tipus de Cu, en funció de les característiques espectroscòpiques del centre actiu quan està en forma de Cu(II).

**Cu tipus 1, blau.** Quan està com a Cu(II) presenta una coloració blava molt intensa. En l'espectre visible apareix una banda molt intensa, amb un coeficient d'extinció ( $\epsilon$ ) elevat, que correspon a una banda de transferència de càrrega  $\text{Cys-S}^- \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ . Aquest tipus de coure es caracteritza per presentar espectre RSE quan està com Cu(II).

*Es troba en proteïnes de transport electrònic, i en les oxidases blaves, com la lacassa.*

**Cu tipus 2, no blau.** Tot i que és Cu(II) no presenta la coloració intensa del Cu de tipus 1, el que indica que no hi ha banda de transferència de càrrega des de lligands S<sup>-</sup>, per tant es pot descartar la presència de lligands tipus cisteïna o metionina en l'esfera de coordinació. Aquest tipus de Cu(II) a l'igual que el de tipus 1, presenta espectre RSE.

*Es troba en les oxidases no blaves, en oxigenases, en la citocrom c oxidasa i en la superoxido dismutasa (SOD).*

**Cu tipus 3, no RSE.** La característica més rellevant d'aquest tipus de Cu(II) és que no presenta espectre RSE. Això vol dir que el seu electró desaparellat està interaccionant antiferromagnèticament amb algun



altre centre paramagnètic. Ho trobarem en sistemes dinuclears  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-X-Cu}^{\text{II}}$  i en sistemes  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-X-Fe}^{\text{III}}$ .

*Aquest tipus de centre es troba en les oxidases blaves, monooxigenases, en sistemes de transport d'oxigen i en la citocrom c oxidasa.*

### 3.9 Resum de les tècniques més emprades per cada metall o molècula

La taula 3.2 presenta un resum de les tècniques que s'utilitzen habitualment per caracteritzar els centres actius en funció dels metalls o per detectar determinades molècules.

*Taula 3.2 Resum de les tècniques de caracterització de centres actius en funció de l'ió metàl·lic.*

Fe	Mössbauer, RSE, magnetisme, V-UV
Cu	RSE, UV
Co, Ni, Mn, Cr, Mo	RSE
$\text{O}_2$ , $\text{N}_2$ ,	Espectroscòpia vibracional

En la taula 3.3 es resumeix la informació que aporten les tècniques emprades en bioinorgànica, per tal d'elucidar l'entorn de l'ió metàl·lic en un centre actiu o els canvis que pateix al llarg d'un procés.

*Taula 3.3 Resum de la informació que aporta a la bioinorgànica cadascuna de les tècniques comentades anteriorment.*

Mössbauer	Fe, configuració electrònica (espín alt/baix), estat d'oxidació.
XANES, EXAFS	Diferència entre lligands de la 1 <sup>a</sup> esfera de coordinació lleugers (O, N) o pesats (S).
V-UV	Presència de grup hemo (Fe), bandes de transferència de càrrega $\text{L} \rightarrow \text{M}$ .
IR	Canvis en l'enllaç O-O en la molècula d'oxigen.
RSE	Espín fraccionari, diferència entre $S=1/2$ i $S > 1/2$ i radicals.
Magnetisme	Spin del sistema (spin alt/baix, estat d'oxidació). En sistemes polinuclears el grau d'acoblament relacionat amb el tipus de lligand pont.

## 4. SISTEMES DE TRANSPORT DE IONS

### 4.1 Transport de ions a través de membranes

Com ja s'ha comentat anteriorment, la selecció d'un element depèn de diferents factors: la funció que han de realitzar, l'abundància en l'entorn i que es puguin incorporar a les cèl·lules. Aquests dos últims factors són els que influeixen en la seva biodisponibilitat.

Com a exemple podem comentar el cas del molibdat ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ) i el sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ): són ions molt similars, amb la mateixa geometria i la mateixa càrrega, però el molibdat és molt més soluble que el sulfat i per tant, es pot esperar que sigui més fàcil la seva incorporació, però és molt menys abundant, pel que la biodisponibilitat del sulfat és major.

Els nutrients que s'adquireixen a través de la dieta passen al plasma sanguini i al sistema limfàtic, que són els fluids que ajuden a la seva distribució a l'organisme.

Ara bé, hi ha molts lligands biològics que poden coordinar als ions metàl·lics, i també diferents ions metàl·lics, per tant hi pot haver competència entre ells. És important que els cations arribin al punt on han de realitzar la seva funció, sigui en l'espai extracel·lular o bé a l'interior de la cèl·lula. A més cal que arribi al seu lloc de forma selectiva, per això és molt important el sistema de transport dels ions que és el que regularà la seva distribució en l'organisme.

En el cos humà tenim diferents bacteris i microorganismes que s'alimenten amb els micronutrients que obtenen del plasma sanguini.

Un dels punts claus en el transport de ions és el pas a través de la membrana cel·lular. Aquesta membrana està formada per una doble capa de fosfolípids. La cadena orgànica, apolar, queda a l'interior de la doble capa mentre que els grups fosfat o altres grups carregats de l'extrem queden a l'exterior on el medi és polar (Figura 4.1).

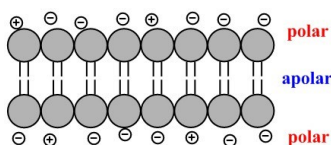


Figura 4.1 Esquema de la doble capa de fosfolípids que forma la membrana cel·lular.

Hi ha molècules petites i apolars, que poden creuar fàcilment la membrana, passant entre les cadenes de fosfolípids, en canvi hi ha altres espècies, carregades o polars, que poden quedar atretes a la superfície però no poden creuar fàcilment la regió apolar de la membrana. Això passa amb els cations metàl·lics que per creuar la membrana cel·lular necessiten algun sistema de transport.

Els organismes tenen diferents formes de resoldre aquest problema:

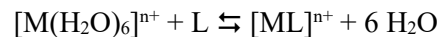
- Utilitzant **lligands transportadors** que converteixen el catió metàl·lic en una espècie menys polar.
- Proteïnes que obren **canals** per on pot passar el catió metàl·lic.

Per altra banda, el transport a través de la membrana es pot donar de forma passiva, o bé pot requerir energia, llavors es parla de transport actiu o de bombes de transport, com és el cas de la bomba Na-K.

En alguns microorganismes la membrana pot contenir alguna molècula que té capacitat d'actuar com a lligand. Aquesta molècula s'apropa o s'allibera a la banda exterior i allà complexa al catió metàl·lic, creant-l'hi un embolcall menys polar, el que permet el seu transport a través de la part central, apolar,

de la membrana. Quan arriba a l'altra banda, el catió es descoordina del lligand i s'allibera a l'interior cel·lular (Figura 4.2). Per tant aquest procés consta de diferents etapes:

- Descoordinació de les aigües de solvatació del catió metàl·lic i substitució pel lligand transportador L.



- Transport a través de la part apolar de la membrana.
- Descoordinació del catió del complex format amb el lligand transportador ( $[ML]^{n+}$ ) i substitució per algun altre lligand, que pot ser aigua o alguna proteïna.

Una altra forma de creuar la membrana és quan s'obren canals. La membrana pot contenir alguna proteïna que en un moment donat pot canviar de conformació de forma que crea un canal: la part apolar de la proteïna s'orienta cap a la membrana (part apolar) i el canal és on hi ha els grups polars. D'aquesta forma els cations poden creuar fàcilment la membrana passant per aquest canal (Figura 4.2). La formació d'aquest canal està regulada a nivell cel·lular, i pot ser per efecte d'un estímul o de la interacció amb alguna altra proteïna que s'obri o es tanqui el pas.

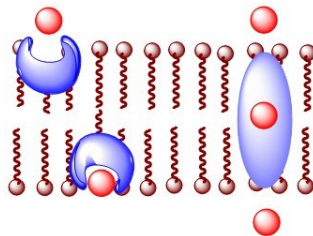


Figura 4.2 Pas dels cations a través de membranes: amb lligands transportadors o a través de canals.

La gramicidina A és un antibiòtic bacterià que es va veure que augmentava la permeabilitat de les membranes al pas dels cations. Investigant aquest fet es va trobar que això era degut a la creació de canals formats per dos unitats d'aquest polipèptid.

Per tant l'obertura del canal pot ser deguda a una proteïna de membrana o be a una proteïna externa que s'insereixi en la membrana, com és el cas de la gramicidina.

La velocitat de pas dels ions metàl·lics depèn significativament de la via que utilitzen. Quan el pas es dona a través de canals passen de l'ordre de  $10^7$ - $10^8$  ions/segon mentre que quan s'utilitzen lligands transportadors la velocitat de pas és molt més petita, de l'ordre de  $10^2$ - $10^3$  ions/segon. O sigui que el transport a través de canals és molt més eficient que amb lligands transportadors.

Algunes neurotoxines són espècies catióniques que poden interaccionar amb els grups amb càrrega negativa de la superfície de la membrana; si interaccionen amb els grups que hi ha a l'entrada del canal d'intercanvi  $Na^+ / K^+$  i son més voluminoses que aquests ions, poden bloquejar el canal i per tan alterar les concentracions de  $Na^+$  i  $K^+$  a nivell cel·lular, que és el que provoca la neurotoxicitat.

## 4.2 Ionòfors

Els ionòfors són lligands transportadors de metalls alcalins. Hi ha una sèrie d'antibiòtics naturals que es troben en fongs i líquens que fan augmentar la permeabilitat de les membranes. Un exemple és la valinomicina (Figura 4.3).

Les característiques generals dels ionòfors són:

- Lligands macrocíclics no aromàtics
- Lligands neutres

- Anell flexible
- Contenen diferent nombre d'àtoms d'oxigen donadors d'electrons (O-)
- Poden coordinar tant al  $K^+$ , amb nombre de coordinació (N.C.) 6 o 8, com al  $Na^+$ , en aquest cas amb NC= 6, ja que el seu radi és menor que el del  $K^+$ .

Aquests lligands, en ser flexibles, poden presentar diferents conformacions per adaptar-se a cations amb diferent radi. Cada conformació té preferència per un catió ( $K^+$  o  $Na^+$ ).

En la Figura 4.3 es mostra l'anell de la valinomicina amb el  $K^+$  coordinat a 6 dels àtoms d'oxigen. Aquest catió es troba en un entorn octaèdric d'oxígens i els grups apolars queden dirigits cap a l'exterior, D'aquesta forma el  $K^+$  queda protegit per una capa poc polar i pot creuar més fàcilment la membrana.

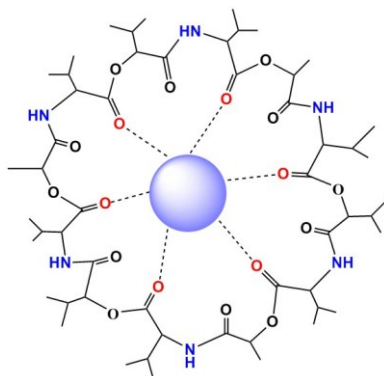


Figura 4.3 Esquema de la valinomicina coordinant al catió  $K^+$ .

Hi ha diferents lligands que actuen com a ionòfors, com són els èters corona i els criptands (Figura 4.4) i l'estudi amb aquests lligands ha posat de manifest la seva gran selectivitat envers  $Na^+$  o  $K^+$  en funció del nombre d'àtoms donadors d'electrons de l'anell.

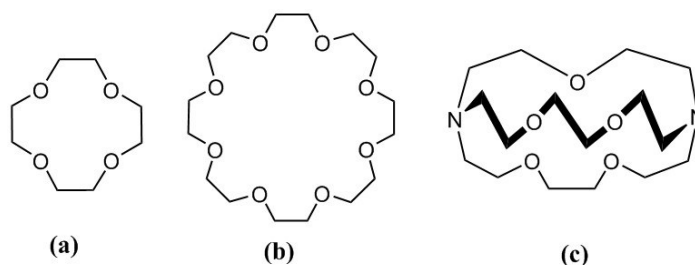


Figura 4.4 Lligands que coordinen als ions  $Na^+$  i/o  $K^+$ : èters corona (a i b), criptands (c).

### 4.3 Sideròfors

Els lligands transportadors de ferro en els microorganismes s'anomenen sideròfors. Són lligands carregats negativament que estableixen al  $Fe^{III}$ . Són cadenes o anells en els que hi ha un grup quelant que es repeteix: **hidroxamat** o **catecolat** (Figura 4.5). Els que tenen grups hidroxamats són la família dels ferricrom, i un exemple de la família dels catecolats és l'enterobactina.

L'entorn del  $Fe^{III}$  és octaèdric amb 3 fragments bidentats. Si és un lligand del tipus hidroxamat la cavitat on es troba el  $Fe^{III}$  té tres oxígens carregats i 3 oxígens neutres, mentre que si el lligand és del tipus catecolat tots els oxígens tenen càrrega negativa. Això justifica les constants de formació ( $K_f$ ) del complex, que són molt més grans pels catecolats que pels hidroxamats. Les  $K_f$  dels sideròfors es troben en un rang molt ampli, des de  $\sim 10^{20}$  fins a  $\sim 10^{50}$ .

Per altra banda, aquests lligands estabilitzen millor al  $\text{Fe}^{\text{III}}$  que al  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ; per un mateix lligand sideròfor la  $K_f(\text{Fe}^{\text{III}}) > K_f(\text{Fe}^{\text{II}})$ .

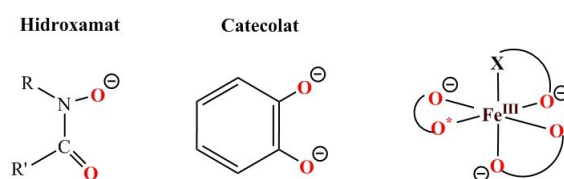


Figura 4.5 Grups hidroxamat i catecolat presents en els sideròfors. Entorn del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ( $\text{O}^*$  sense càrrega si és un hidroxamat i amb càrrega negativa si és catecolat).

En coordinar al voltant del ferro tres grups bidentats aquest centre actiu presenta isomeria òptica. S'ha observat que el pas a través de la membrana és més favorable per un dels enantiòmers ( $\Lambda$ ) que per l'altre ( $\Delta$ ). Això indica que deu haver-hi un receptor de membrana que reconeix l'isòmer  $\Lambda$  i no a al  $\Delta$ .

Tenint en compte el que s'ha comentat, de que el complex amb  $\text{Fe}^{\text{III}}$  és més estable que el de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , es proposa que aquest ió entra a la cèl·lula coordinat com a  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i que un cop a l'interior s'allibera i es coordina a un altre lligand. La descoordinació del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  del lligand es pot donar per dues vies:

- un canvi en el pH que permeti la protonació del lligand. Això fa disminuir la seva afinitat pel  $\text{Fe}^{\text{III}}$  ja que passa a ser un lligand neutre.
- que es redueixi el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i com que aquest complex és menys estable, es pot descoordinar més fàcilment.

#### 4.4 Bomba $\text{Na}^+ / \text{K}^+ : \text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPasa

Les primeres cèl·lules es van formar al mar, i per tant en certa forma van reproduir les condicions ambientals. És a dir, en els organismes pluricel·lulars la concentració extracel·lular de  $\text{NaCl}$  és més elevada que a l'interior cel·lular (Taula 4.1).

Taula 4.1 Composició d'alguns elements a l'interior i exterior cel·lular.

	Interior / mM	Exterior / mM
$\text{Na}^+$	10	145
$\text{K}^+$	140	5
$\text{Mg}^{2+}$	30	1

Com es pot veure en aquesta en aquesta taula les concentracions de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  estan gairebé invertides, el primer es abundant a l'espai exterior mentre que el segon a l'interior. Tenint en compte que les membranes son permeables, hi haurà un cert pas dels ions a través de la membrana per tal d'igualar les concentracions a dins i a fora. És el que es coneix com transport passiu. Ara be, les cèl·lules necessiten conservar el gradient de concentració pel seu bon funcionament, per això cal que extreure altre cop l'ió sodi que ha entrat a dins, i en el cas del potassi al revés, cal tornar-lo cap a l'interior. Aquest transport que es fa per mantenir el gradient de concentracions és el que es coneix com a transport actiu, i requereix energia. (Figura 4.6).

Les bombes, processos de transport que requereixen energia, poden aconseguir aquesta energia de dues formes:

- A partir de la hidròlisi del ATP (bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ).

- A partir d'una reacció redox, per exemple amb els nucleòtid  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

En la taula 4.1 també es pot veure que la  $[\text{Mg}^{2+}]$  és significativament més gran a l'interior cel·lular que a l'exterior. De fet tots els processos en els que intervé el magnesi que es presenten en aquest llibre, són processos que es donen en l'interior cel·lular.

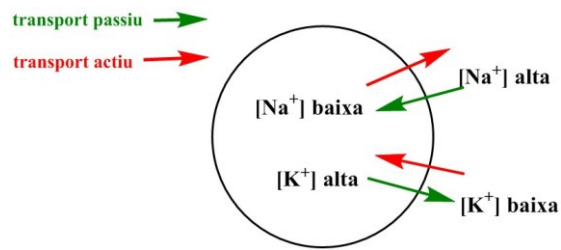


Figura 4.6 Esquema representant el transport passiu i transport actiu a través de la membrana.

La salut depèn de que es conservin els gradients de concentracions d'aquests ions, i això es regula en el ronyó. Un excés de sodi fa pujar la tensió arterial. La pressió arterial és la pressió de la sang en el teixit del vas sanguini. Quan es fa una dieta rica en sodi, en augmentar la concentració de  $\text{Na}^+$  a l'espai exterior tendirà a augmentar la concentració a l'interior cel·lular, per transport passiu. Si a més la dieta és pobre en  $\text{K}^+$  per transport passiu tendirà a sortir de l'interior cel·lular. Això provoca un augment del volum de les cèl·lules vasculares i major capacitat de contracció, el que provoca la hipertensió.

Per tant, el que és important és la relació que tenen els aliments entre Na i K. Per exemple, una salsitxa de Frankfurt té una relació  $\text{Na}/\text{K} = 13/1$ , en canvi una patata té una relació  $\text{Na}/\text{K} = 1/81$  o una ceba  $\text{Na}/\text{K} = 1/155$ . En línies generals els aliments d'origen animal tenen  $[\text{Na}] > [\text{K}]$  i els vegetals al revés  $[\text{K}] > [\text{Na}]$ .

Els diferents processos que es donen en el cos humà no es produeixen de forma aïllada, sinó que estan combinats o relacionats amb altres processos. En el cas del transport de ions a través de la membrana es pot donar el cas de que un mateix agent transportador faciliti el pas de dues espècies diferents, que és el que es coneix com co-transport. Pot ser que les dues espècies creuin la membrana en el mateix sentit, (simport) o en sentit oposat (antiport). L'entrada de ions  $\text{Na}^+$  a l'interior cel·lular per igualar concentracions va lligada al pas en el mateix sentit de glucosa. En el múscul cardíac hi ha un co-transport antiport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que extreu  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol. En el marc de la relació que hi ha entre el transport de diferents ions i molècules, s'ha trobat que quan la dieta és pobre en  $\text{K}^+$  provoca l'eliminació i pèrdua de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  és una proteïna de membrana (proteïna que està integrada a la membrana) que consta de 4 subunitats ( $\alpha_2\beta_2$ ). Les subunitats  $\alpha$  són les que estan involucrades en el procés. Les dues subunitats  $\alpha$  poden presentar al menys dos conformacions diferents, una en que es forma una cavitat o obertura cap a l'interior cel·lular, i l'altra en que està enfocada cap a l'exterior. Quan està oberta cap a l'interior captura 3  $\text{Na}^+$  i això provoca un canvi estructural i després s'obre cap a l'exterior, on surten els 3  $\text{Na}^+$  i al seu lloc es coordinen 2  $\text{K}^+$  (Figura 4.7). Els canvis conformacionals que es donen provoquen modificacions en la mida de la cavitat seleccionant així la captura o alliberament dels cations  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ .

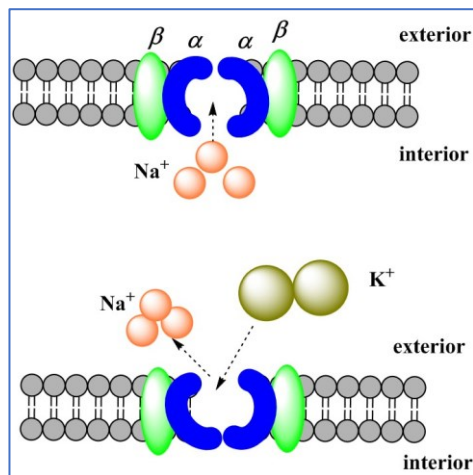


Figura 4.7 Esquema de la proteïna de membrana que forma la bomba Na / K.

La qüestió rau en conèixer quins factors influeixen en aquests canvis conformacionals de la proteïna. I aquí juga un paper important el ATP, que tot i que molt sovint s'escriu d'aquesta forma, en realitat és un anió:  $\text{ATP}^{4-}$ . Aquesta molècula és una reserva d'energia i la seva hidròlisi és la que aporta l'energia necessària pel transport dels ions  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  a través de la membrana.



Aquesta reacció d'hidròlisi està assistida per ions  $\text{Mg}^{2+}$ , que com ja s'ha comentat és més abundant a l'interior cel·lular que en l'exterior.

A l'interior cel·lular el  $\text{Mg}^{2+}$  pot interaccionar amb els grups fòsfor del  $\text{ATP}^{4-}$ , especialment amb els dos terminals; com que és un catió polaritzant (*q/r* gran), atrau densitat electrònica dels enllaços cap a ell, de tal forma que sobre fòsfor terminal hi ha una certa disminució de la seva densitat electrònica ( $\text{P}^{\delta+}$ ), el que afavoreix l'atac nucleòfil sobre seu, per part d'un grup ric en densitat electrònica.

L'enzim ATPasa, o sigui la proteïna que està en la membrana, és co-responsable de la hidròlisi del  $\text{ATP}^{4-}$ . La subunitat  $\alpha$  d'aquesta proteïna té un grup carboxilat terminal ( $\text{prot-CO}_2^-$ ) que és l'agent nucleòfil. Per tant les diferents etapes que es proposen pel transport a través de la membrana serien:<sup>7</sup>

- Atac nucleòfil del grup  $-\text{CO}_2^-$  de la proteïna sobre el fòsfor terminal. Això modifica l'entorn d'aquest àtom que passa de tenir un entorn tetraèdric a un de bipiràmide trigonal (Figura 4.8).
- Aquesta interacció proteïna-ATP provoca un canvi conformacional en la proteïna i és quan s'obre la cavitat cap a l'interior i pot entrar i coordinar els ions  $\text{Na}^+$ .
- La coordinació del  $\text{Na}^+$  afavoreix un canvi en l'entorn del P. En química de coordinació, per un nombre de coordinació  $\text{NC} = 5$  hi ha dos geometries possibles, la bipiràmide trigonal (bpt) i la piràmide de base quadrada (pbq). L'energia potencial d'aquestes geometries és similar, pel que es pot passar fàcilment d'una a l'altre. El pas d'una bipiràmide trigonal a una altra, passant per la piràmide de base quadrada, es coneix com la pseudo-rotació de Berry (Figura 4.9).

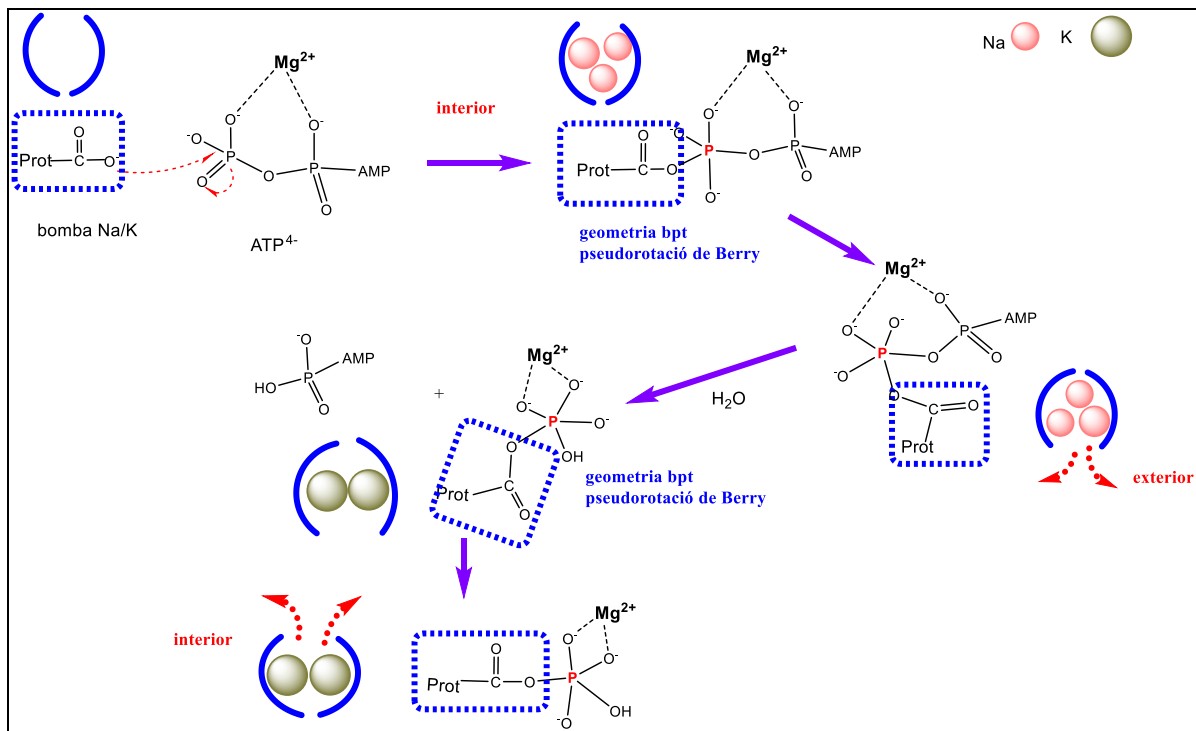


Figura 4.8 Canvis conformacionals en la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (adaptat de <sup>7</sup>).

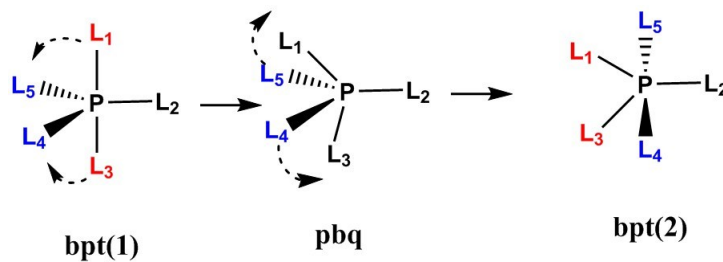


Figura 4.9 Pseudo-rotació de Berry al voltant del P per passar d'una geometria de bupiràmide trigonal (bpt) a una altra.

Aquest pas de bpt(1) a bpt(2) comporta l'intercanvi entre els lligands en axial i dos dels que estan en el pla equatorial. Això té gran rellevància quan un d'aquests lligands forma part de la proteïna i en les altres posicions està interaccionant amb el  $\text{Mg}^{2+}$ . Aquest mecanisme pot explicar que la cavitat s'obri cap a l'altra banda de la membrana.

- L'alliberament del  $\text{Na}^+$  provoca canvis conformacionals que afavoreixen el trencament del  $\text{ATP}^{4-}$ .
- La proteïna fosforilada (l'hi queda un fosfat enllaçat al carboxilat) que segueix interaccionant amb el  $\text{Mg}^{2+}$  a través del fosfat, pot coordinar als ions  $\text{K}^+$ , la cavitat tindria ara una mida adient per coordinar 2 ions  $\text{K}^+$ .
- La coordinació dels  $\text{K}^+$  provoca un altre canvi, el P que té geometria bpt pot donar altre cop la pseudo-rotació de Berry i obrir-se de nou cap a l'interior de la cèl·lula.
- En alliberar-se el  $\text{K}^+$  de nou els petits canvis estructurals poden afavorir, en aquest cas el trencament de l'enllaç entre la proteïna i el grup fosfat. Així es completa la hidròlisi de l'ATP i el transit de  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  per la membrana. (Figura 4.8).



## 4.5 Transferrina

La transferrina és la proteïna responsable del transport de ferro en mamífers, i en general en organismes pluricel·lulars. De fet és una família de proteïnes que reben diferent nom segons on es troben de l'organisme. Es coneix la serotransferrina, que transporta el ferro en la sang, la lactotransferrina que es troba en diversos fluids extracel·lulars (la llet i les llàgrimes, entre d'altres) i la ovotransferrina que es troba en la clara d'ou.

La transferrina és una glicoproteïna, és a dir una cadena de proteïna que té enllaçades dos cadenes de carbohidrats. La seva disposició a l'espai genera dues cavitats en les que s'hi coordina el ferro.

Abans de la resolució estructural ja es tenia alguna informació del centre actiu a partir de les dades de l'espectroscòpia visible. Aquesta proteïna presenta una coloració vermella intensa que s'atribueix a la banda de transferència de càrrega lligand  $\rightarrow$  metall de Tyr-O<sup>-</sup>  $\rightarrow$  Fe<sup>III</sup>. En la Figura 4.10 es pot veure l'estructura d'aquesta proteïna, en la que els punts vermells, poc visibles, corresponen a dos ions Fe<sup>III</sup> coordinats.

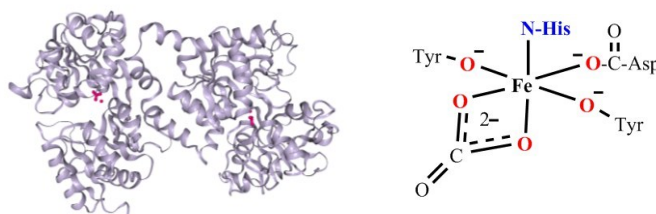


Figura 4.10 Esquerra: estructura de la lactotransferrina humana. En vermell els dos centres de ferro (Codi PDB: 1B0L).<sup>8</sup> Dreta: Esquema del centre actiu del ferro(III), en el que es pot observar la seva coordinació octaèdrica.

El Fe<sup>III</sup> està en un entorn octaèdric, envoltat de lligands aniónics que aporten estabilitat al centre actiu. Els aminoàcids tirosina (fenol) es desprotonen en coordinar-se al Fe<sup>III</sup> i per tant també actuen com lligands aniónics. A part dels grups provinents de la proteïna hi ha un anió carbonat bloquejant dues posicions de coordinació del Fe<sup>III</sup> i aportant també densitat de càrrega negativa (Figura 4.10). S'ha pogut comprovar que aquest anió és necessari pel transport de ferro i el seu pas a través de la membrana.

El centre actiu de la transferrina (Tf), ric en lligands -O<sup>-</sup> estabilitza millor al Fe<sup>III</sup> que al Fe<sup>II</sup> gràcies a que hi ha una atracció electrostàtica més gran. Per tant es lògic pensar que es transporta en la forma oxidada, Fe<sup>III</sup> i es mobilitza en la forma reduïda Fe<sup>II</sup>. Per altra banda, aquest centre actiu serà sensible al pH ja que hi ha diversos grups que es poden protonar, com és l'anió carbonat i els fenols (tirosina). Per tant l'alliberament del Fe a l'interior pot estar produït per la combinació dels dos factors: procés redox i canvi de pH. Un medi més àcid afavoreix l'alliberament del ferro i que la transferrina es trobi en forma apo-transferrina (sense ió metàl·lic coordinat).

Per tant, un comportament similar al dels sideròfors. Les càrregues negatives en el centre actiu estabilitzen al Fe<sup>III</sup>, mentre que l'alliberament de l'ió metàl·lic es pot produir per efecte del pH i la reducció del Fe<sup>III</sup> a Fe<sup>II</sup>. Tant la protonació del lligand com la reducció del metall fan disminuir la interacció electrostàtica metall... lligand, i per tant l'estabilitat del complex disminueix.

El mecanisme que es proposa<sup>9</sup> és que hi ha un receptor de membrana que interacciona i reconeix al complex Tf-Fe<sup>III</sup>-CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> i això provoca un cert plegament de la membrana que porta a la formació d'una vesícula que queda estabilitzada per molècules de la proteïna clatrina. Ja tenim el centre actiu de ferro a l'interior cel·lular, tancat en la vesícula.

L'etapa següent serà el canvi de pH, provocat per una bomba de protons H-ATPasa, i l'aportació d'electrons al medi de forma que el  $\text{Fe}^{\text{II}}$  s'allibera i la seva descoordinació provoca un canvi en la membrana que afavoreix que es torni a obrir la vesícula alliberant-se cap a l'exterior la apo-transferrina, disposada a anar a recollir més  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . (Figura 4.11)

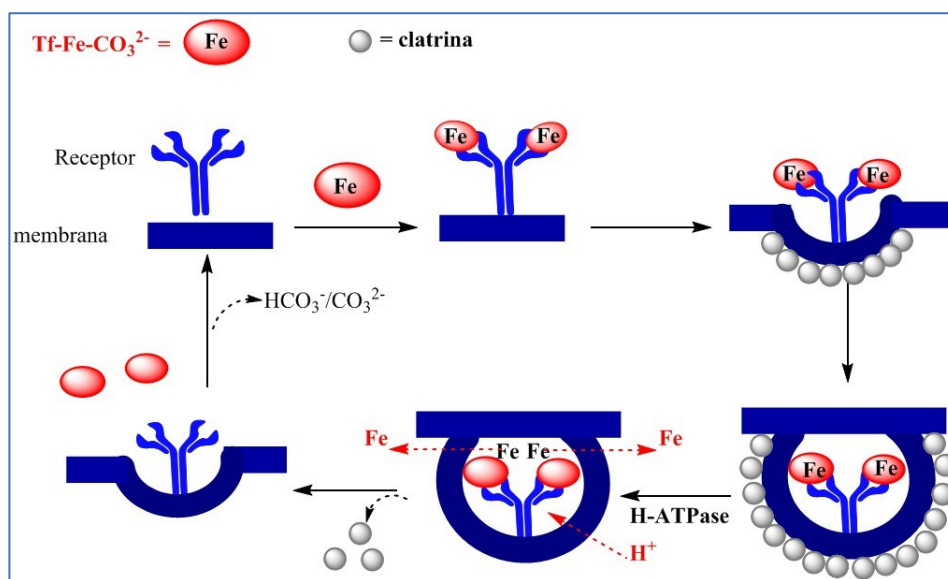


Figura 4.11 Transport de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a través de la membrana.

#### 4.6 Metal·lotioneïna (MT)

La metal·lotioneïna és una proteïna rica en sofre. Com el seu nom indica és rica en aminoàcids cisteïna, que són els que aporten els lligands amb S donador d'electrons:  $\text{Cys-S}^-$ . Del seu nom també se'n pot extreure una altra informació: no és específica d'un sol metall.

Les metal·lotioneïnes (MT) són proteïnes que es troben en el citoplasma i tenen diverses funcions: transport i emmagatzematge de ions metàl·lics i també permeten eliminar cations tòxics (detoxificació). Es troben en els cianobacteris, en fongs, plantes, insectes i vertebrats.

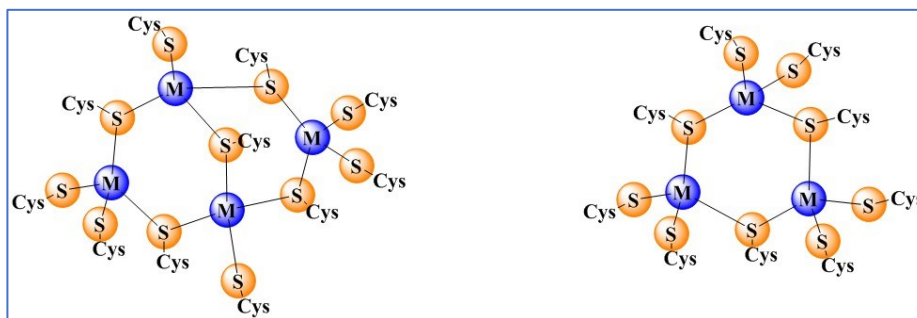
Aquesta família de proteïnes són relativament curtes, i amb un elevat nombre de cisteïnes. La relació aminoàcids de la cadena/ cisteïnes varia una mica. Per exemple en mamífers tenen 61-62 aminoàcids dels quals 20 són cisteïnes; en el cervell aquesta proteïna té 68 aminoàcids. En crustacis hi ha menys grups cisteïna, 18. En alguns fongs la cadena és més curta 25-26 aminoàcids i també es menor el nombre de cisteïnes, 7. Malgrat aquestes diferències tenen en comú alguns factors:

- Són riques en grups  $\text{Cys-S}^-$ .
- Coordinen ions metàl·lics amb configuració electrònica  $d^{10}$ .
- Hi ha formació de clústers en els que els grups  $\text{Cys-S}^-$  actuen com a lligands pont.

El fet de de que tingui com a lligands donadors d'electrons el S, que és una base tova afavoreix la seva interacció i coordinació amb ions metàl·lics que presentin caràcter tou (radi gran i baix estat d'oxidació). Entre els elements essencial té **tendència a coordinar** al  $\text{Zn}^{2+}$  i al  $\text{Cu}^+$ . I pot eliminar cations tòxics com el  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . En estudis amb animals de laboratori s'ha observat que en presència de cations tòxics augmenta la síntesi de MT. En mamífers els òrgans on hi ha una major concentració d'aquesta proteïna són el fetge i el ronyó.

El sofre del grup Cys-S<sup>-</sup> té tres parells d'electrons solitaris fet que afavoreix que en pugui compartir dos i estigui actuant com a lligand pont. Els clústers que es formen contenen 3 o 4 centres metàl·lics, en els quals els cations tenen un entorn tetraèdric (Figura 4.12). L'espectre V-UV presenta bandes intenses característiques de la transferència de càrrega Cys-S<sup>-</sup> → M.

Aquestes proteïnes són sensibles a l'oxidació degut a la presència de Cys-S<sup>-</sup> que poden formar ponts disulfur Cys-S-S-Cys. Gràcies a aquesta capacitat per oxidar-se participen també en el sistema de defensa contra radicals.



4.12. Agregats que es troben en les metal·lotioneïnes.

#### 4.7 Resum dels sistemes de transport

En la taula 4.2 es resumeixen els diferents sistemes de transport distingint entre els sistemes que el lligand formen part d'una proteïna i els que no.

Taula 4.2 Resum dels diferents sistemes de transport.

<b>Sistema no proteic</b>	<b>Elements que transporta</b>
Ionòfors	Na, K
Sideròfors	Fe
<b>Proteïnes</b>	
Bomba Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> (enzim)	Na, K
Transferrina	Fe
Metal·lotioneïna	Cu, Zn, (Hg, Tl, Pb, Cd)

## 5. BIOMINERALS

### 5.1 Introducció als biominerals

El que es coneix com a biominerals són els sòlids que formen part dels éssers vius. A diferència dels minerals aquests sòlids tenen dos components:

- El sòlid inorgànic que dona resistència al biomineral.
- La matriu orgànica on comença a formar-se el sòlid: és on té lloc el procés de nucleació i creixement. Aquesta matriu orgànica aporta flexibilitat al biomineral i en molts casos condiciona la seva forma, per exemple la formació punxes o espines, o la de closques.

Molts dels biominerals són compostos de calci (taula 5.1), per això el processos de formació i redissolució d'aquests biominerals se'ls anomenava calcificació i descalcificació respectivament. Ara be, tenint en compte que hi ha biominerals que contenen altres ions metàl·lics és preferible parlar de procés de biomineralització.

Les funcions que poden tenir aquests materials son diverses i depenen de les seves propietats. Per exemple, un material dens és útil com a sensor gravitacional, mentre que un sensor magnètic requereix un sòlid que doni resposta en presència de camp magnètic.

Una altra funció que poden tenir els biominerals és la d'emmagatzemar ions metàl·lics: aquests ions no estan circulant lliurement per l'organisme, sinó que estan en reserva per quan calgui, mobilitzar-los. Per altra banda, es poden formar biominerals que no son essencials en l'organisme, i que provenen d'una mala regulació de la concentració dels ions, com es el cas de la formació de "pedres" o càlculs renals o biliars.

*Taula 5.1. Biominerals més importants i funcions que realitzen.*

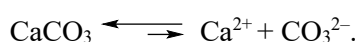
	Funció
$\text{CaCO}_3$	Exoesquelet: closques, pues, conxes, corals // sensors gravitacionals
$\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$	Endoesquelet: ossos /dents
$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Emmagatzematge de Ca // sistema de defensa de les plantes Càlculs renals o biliars
$\text{CaSO}_4$ $\text{BaSO}_4$	Sensors gravitacionals
$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Defensa plantes // diatomees
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	Sensors magnètics
$\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Emmagatzematge de Fe (Ferritina)

La precipitació del sòlid inorgànic es dona quan el producte de les concentracions dels ions involucrats sobrepassa el producte de solubilitat. Per exemple, en el cas del  $\text{CaCO}_3$  comença a precipitar quan  $K_s < [\text{Ca}^{2+}][\text{CO}_3^{2-}]$ . Ara bé, aquest compost a la natura presenta diferents formes cristal·lines amb diferències en quant a la seva solubilitat (taula 5.2).

Taula 5.2 Constants de solubilitat de les diferents formes cristal·lines del  $\text{CaCO}_3$ .

Forma cristal·lina	Amorf	Vaterita	aragonit	calcita
$\text{p}K_s$	7,4	7,6	8,2	8,4

En general, el primer precipitat és en forma amorfa i després va passant per les diferents formes cristal·lines, començant per les més soluble fins a les més insoluble, que presenten una redissolució més lenta. Cal remarcar que sempre hi ha un cert equilibri, tot i que està molt desplaçat cap a la formació del sòlid:



Com ja s'ha dit, el biomineral té dos components, la matriu orgànica i el sòlid inorgànic, per tant la seva formació depèn de la regulació en la síntesi d'aquests dos components.

**Matriu orgànica:** hi ha un conjunt d'enzims que regulen la síntesi d'aquesta matriu, que pot ser una làmina o una cadena, segons cada cas. En general les reaccions que tenen lloc són reaccions de polimerització i hidroxilació. Un exemple d'enzims que realitzen aquesta funció són les oxidases de coure.

**Mineral:** per tal de que precipiti cal regular la concentració dels dos ions. Hi ha diferents sistemes que permeten controlar aquestes concentracions:

- Bombes iòniques que permetin el seu transport.
- Regulació del pH: pot modificar la solubilitat del mineral. Per exemple passant de  $\text{HCO}_3^-$  a  $\text{CO}_3^{2-}$  o a la inversa.
- Mobilització del catió metàl·lic: per procés redox  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  o per protonació del lligand, per exemple en la metal·lotioneïna.
- Enzims: com per exemple l'anhidrasa carbònica que regula la formació de  $\text{HCO}_3^-$ .

En el procés de redissolució, la part inorgànica tindrà mecanismes similars als de formació, mentre que la degradació de la matriu orgànica requereix d'enzims hidrolítics, que en molts casos són enzims de zinc.

## 5.2 Emmagatzematge de ferro: ferritina

En els mamífers hi ha dues proteïnes associades al ferro: la transferrina que és la responsable del seu transport i la ferritina que és on s'emmagatzema aquest element.

Els ions metàl·lics del bloc d de la taula periòdica tenen molta tendència a formar complexos, per tant, si es trobessin circulant lliurement per l'organisme podrien anar interaccionant amb els diferents lligands biològics que trobessin. Per això es requereix un bon sistema de transport, i també un lloc on emmagatzemar-los per quan siguin necessaris. Hi ha elements essencials que s'ha trobat que estan involucrats en l'aparició de patologies neurològiques.

La ferritina és la proteïna on s'emmagatzema el ferro fins a la seva utilització en altres proteïnes i enzims. Es troba tant en animals, com en plantes i microorganismes. En tots aquests organismes és molt similar. Les característiques més rellevants són:

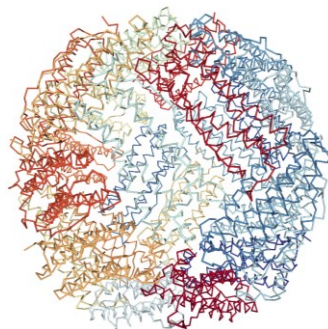
- Està formada per 24 subunitats de proteïna.
- Disposició esfèrica de les subunitats; l'esfera té un diàmetre d'uns 8 nm.
- L'interior de l'esfera és buit i és on es diposita el mineral.
- El mineral és un òxid hidratat de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  amb una composició similar a la del mineral ferrihidrita ( $\text{Fe}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2$ ).
- Pot allotjar aproximadament 4500 àtoms de ferro.

Les 24 subunitats de la proteïna no son totes iguals, sinó que son de dos tipus H i L; són similars en quant a composició però tenen diferent funció.<sup>10</sup>

- Les subunitats H (heavy) tenen 178 aminoàcids i tenen funció ferroxidasa: són les responsables de l'oxidació del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .
- Les subunitats L (light) tenen 171 aminoàcids i la seva funció és la nucleació. És en aquestes subunitats on comença a precipitar el compost.

Segons els teixits i òrgans on es troba la ferritina varia la proporció entre les subunitats H i L. En animals hi ha els dos tipus de subunitats mentre que en les plantes i microorganismes només s'han trobat subunitats tipus L.

En la Figura 5.1 es mostra l'estructura cristallina per la ferritina de la granota toro.<sup>11</sup>



*Figura 5.1 Estructura cristallina de la ferritina de la granota toro (lithobates catesbeiana). (Codi PDB: 1MFR).*

L'empaquetament de les 24 subunitats formant l'esfera genera canals. Pels canals més polars és per on entra el ferro en forma de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i va cap a les subunitats H, on hi ha l'oxidació a  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i la precipitació de l'òxid de ferro(III) hidratat. Els punts de nucleació, on es coordina el  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , són aminoàcids amb càrrega negativa, carboxilats, com glutamat. El medi aquos afavoreix la precipitació del  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . L'esfera no arriba a estar mai totalment plena de mineral (Figura 5.2).

En aquesta proteïna el ferro s'emmagatzema en forma de  $\text{Fe}^{\text{III}}$  però entra i surt en forma de  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Els òxids de ferro(III) són molt més insolubles que els de ferro(II), per això la forma de mobilitzar el ferro que està en reserva és reduint-lo. Per tant, cal que hi hagi alguna molècula que aporti aquests electrons.

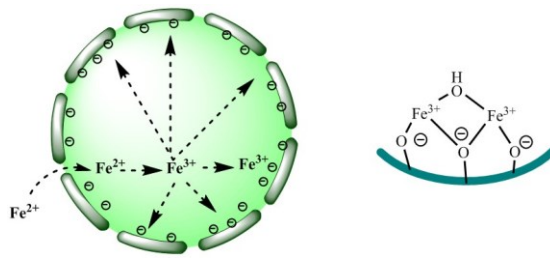


Figura 5.2 Esquema de la ferritina: entrada com  $Fe^{II}$ , oxidació i aproximació a la superfície interna per iniciar la precipitació. A la del dreta esquema del procés de biomineralització.

S'ha trobat que hi ha relació entre la metal·lotioneïna (MT) i la ferritina:<sup>10</sup>

- La MT pot oxidar-se formant enllaços Cys-S-S-Cys i alliberant el metall, per exemple el  $Zn^{2+}$ .
- Els electrons els rep la ferritina i el  $Fe^{III}$  es redueix a  $Fe^{II}$  amb el que surt de l'esfera on està encapsulat.

La ferritina que es troba en el cervell juga un paper important i un mal funcionament s'ha relacionat amb malalties neurodegeneratives.<sup>12</sup>

### 5.3 Sensors magnètics i gravitacionals

Els sensors gravitacionals i sensors magnètics permeten als organismes orientar-se en funció del camp gravitacional o del camp magnètic terrestre.

La característica d'un sensor gravitacional és que sigui un compost dens, amb una massa molar gran, com son el  $BaSO_4$  i  $CaSO_4$ . En organismes marins quan es forma el biomineral l'augment de pes els hi permet desplaçar-se cap al fons on hi ha menys oxigen; això és útil quan els persegueix algun depredador que no pot arribar a zones on la concentració d'oxigen sigui menor. Quan volen tornar cap a la superfície o a menys fondària, tan sols cal redissoldre el mineral.

El carbonat de calci com a sensor gravitacional també es troba en els peixos i en la oïda interna en humans. En la oïda interna hi ha uns cristallets de  $CaCO_3$  sobre una membrana, en contacte amb uns filaments, que transmeten la informació a les terminacions nervioses. Quan s'inclina el cap els cristallets es desplacen lleugerament sobre la membrana provocant un cert plegament dels filaments; el grau i direcció del plegament aporta informació sobre la inclinació del cap, i el cos.

Un sensor magnètic és la magnetita,  $Fe_3O_4$ , un òxid doble de  $Fe^{II}$  i  $Fe^{III}$ , que és un imant i s'alinea amb el camp magnètic terrestre. Els bacteris magnetotàctics tenen cristalls de magnetita perfectament alineats; quan es desplacen al mar poden anar en una direcció (zones pobres en oxigen) o l'altre (més superficials i més riques en oxigen) tan sols canviant la orientació del seu imant intern.<sup>13,14</sup> També s'ha trobat que hi ha magnetita a les dents del mol·lusc marí chiton.<sup>15</sup> Les aus, les abelles, els cargols també tenen la seva brúixola interna de magnetita que els hi permet orientar-se.<sup>16,17</sup>

### 5.4 Altres biominerals

#### Carbonat de calci

El  $CaCO_3$  a part de la seva funció com a sensor gravitacional també té una funció protectora en els mol·luscs. Els mol·luscs tenen closques molt diferents els uns dels altres. Ja entre els cargols hi ha una gran diversitat de formes, així com en els mol·luscs bivalves, com cloïsses o musclos, entre d'altres. En tots ells les closques estan formades per petits cristalls disposats ordenadament, amb organitzacions diferents segons les espècies. La formació d'aquestes estructures ve regulada i controlada a nivell

cel·lular. David Raup, un paleontòleg nord-americà va dissenyar un model matemàtic per explicar la formació de les diferents formes de closques a partir d'una mateixa base cònica.

### Sílice

El  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  es troba generalment en forma amorfa, i en la majoria dels casos es diposita sobre suports que contenen polisacàrids. Això explica que es trobi en plantes, ja que són riques en aquests polímers. Els grups  $-\text{OH}$  propers afavoreixen la precipitació de la sílice.

Per altra banda, aquest mineral forma una closca protectora en les algues diatomees. Quan aquestes algues moren, les closques queden dipositades en els sediments.

### Fosfats de calci

En els mamífers les estructures sòlides, ossos i dents, estan formades per “fosfat de calci”. La part mineral dels ossos és essencialment hidroxiapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$  mentre que en les dents, l'esmalte de les dents, està format per hidroxiapatit però en la superfície és fonamentalment fluoroapatit  $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$ . La substitució del grup  $\text{OH}^-$  per  $\text{F}^-$  dona al fluoroapatit una major resistència a la hidròlisi. En la boca, les restes de menjar poden donar un cert pH àcid a la saliva i a la cavitat bucal. El grup  $\text{OH}^-$  de l'hidroxiapatit és una base forta i es pot protonar fàcilment, afectant a l'estructura del biomineral. En canvi si el mineral és fluoroapatit, el  $\text{F}^-$  que prové d'un àcid feble té menys facilitat per protonar-se, i per tant aquest biomineral és menys sensible al medi àcid.

La composició de les dents de llet, o primeres dents és diferent que les que es formen en segon lloc, difereixen entre d'altres coses, en que tenen una capa més fina de biomineral.

La renovació anual dels ossos és aproximadament del 5-10%. Per tant, els cations metàl·lics no essencials, si tenen afinitat pels fosfats, poden quedar retinguts en ossos i dents. En alguns casos pot afectar a les propietats del biomineral.

Una de les característiques de l'hidroxiapatit és que és piezoelèctric. Això vol dir que per efecte d'una pressió externa es genera una certa separació de càrregues, que comporta una redistribució de ions, un flux de ions per reforçar momentani el mineral, mentre s'està exercint la pressió.

La composició dels ossos és aproximadament un 55% hidroxiapatit i de l'ordre d'un 30% fibres, com el col·lagen i l'osteonectina. A més hi ha en menors quantitats, citrat, carbonats de calci i magnesi i sílice. Les fibres tenen diferents grups en els que pot començar la nucleació, com poden ser grups carboxilat ( $-\text{CO}_2^-$ ) o bé alcohols com al serina o treonina ( $-\text{OH}$ ) (Figura 5.3). Els grups alcohol és on hi ha la fosforilació (si uneix el fosfat) mentre que en els grups carboxilat és on s'aproximen els cations  $\text{Ca}^{2+}$ .

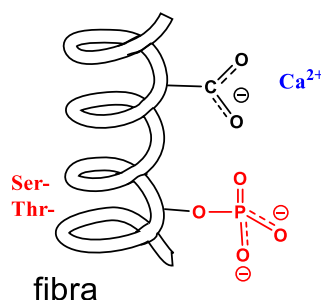
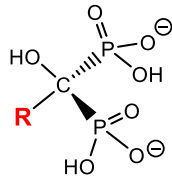


Figura 5.3 Esquema d'una fibra amb els punts on es pot iniciar la nucleació i precipitació.

En l'organisme hi ha dos tipus de cèl·lules, els osteoblast, que regulen la formació dels ossos, i els osteoclasts que són els que controlen la seva redissolució. Cal que la velocitat de formació i redissolució es mantinguin equilibrades. Si la redissolució és més ràpida que la formació és quan hi ha pèrdua de massa òssia i dona lloc a la malaltia anomenada osteoporosi. Els fàrmacs que s'administren per evitar



la redissolució excessiva dels ossos són del tipus difosfonat (Figura 5.4). A través dels grups fosfat s'ancora a l'os quedant en la part externa els grups R, que son apolars, de forma que protegeix parcialment al mineral dels agents que el poden dissoldre.



*Figura 5.4. Esquema de compostos difosfonat, emprats en el tractament de l'osteoporosi.*

Els cos humà té una gran capacitat per regenerar els ossos quan es trenquen, ara be, hi ha vegades que cal utilitzar algun element extern, per fixar la part on hi ha la fractura o be s'ha d'implantar una pròtesi. Cal que aquests materials externs siguin compatibles amb el medi biològic. Aquest tema és una línia de recerca que va en augment. Es busquen materials que més que substituir l'os, estimulin la seva regeneració. Cal que sigui un material porós, ja que ha de permetre la incorporació de les cèl·lules i molècules biològiques necessàries en la formació de l'os. Actualment es treballa amb materials molt diversos i ha portat al que es coneix com enginyeria del teixit ossi.<sup>18</sup>

## 6. PROTEÏNES DE TRANSPORT D'ELECTRONS

### 6.1 Breu introducció al transport d'electrons en els sistemes biològics

En els éssers vius hi ha una sèrie d'enzims que catalitzen reaccions de tipus redox, i que per tant, requereixen electrons o be alliberen electrons. Cal un sistema per regular i facilitar aquest flux d'electrons d'un punt a l'altre (Figura 6.1). En molts casos, la diferència de potencial de reducció entre dos centres actius enzimàtics és gran. Per facilitar la transferència d'electrons entre els dos sistemes, és millor si el procés es dona en etapes, cadascuna d'elles amb una diferència de potencial petita. La barrera energètica es va superant de forma escalonada (Figura 6.2) des dels sistemes amb un potencial de reducció  $E_{red}$  menor fins als que tenen valors més positius.

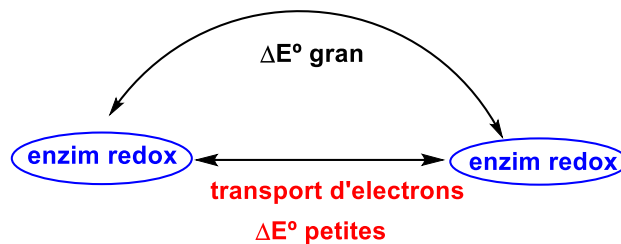


Figura 6.1 Intercanvi electrònic entre enzims.

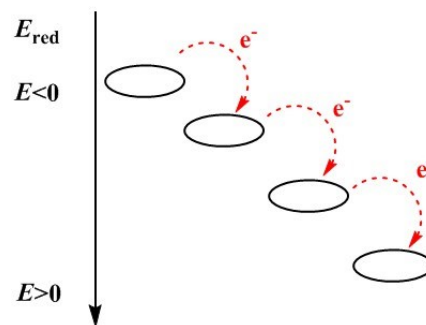


Figura 6.2 Gradació en el potencial de reducció ( $E_{red}$ ) per afavorir el transport d'electrons.

Hi ha diferents sistemes que participen en el transport d'electrons:

- **Molècules que tenen propietats redox.** En aquest grup es troben els mono i dinucleòtids (per ex.  $\text{NAD}^+$  o  $\text{FAD}$ ) que tenen bases nitrogenades que presenten dues formes (oxidada i reduïda, Figura 2.8). també hi ha molècules tipus quinona que es poden reduir a catecols (Figura 6.3).

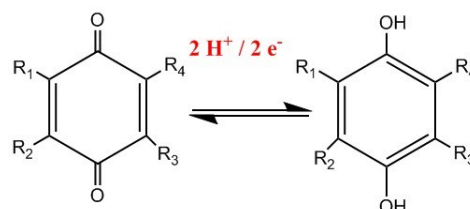


Figura 6.3 Reacció redox de les quinones.

- **Metal·loproteïnes.** Hi ha tres famílies de metal·loproteïnes de transport d'electrons.

Proteïnes Fe-S, que en general tenen un  $E < 0$ .

Citocroms (Fe-hemo) amb un  $E \sim 0$ , positiu o negatiu.

Proteïnes blaves de coure que tenen  $E > 0$ .

Cal remarcar que les proteïnes de transport electrons únicament transporten electrons, és a dir, que canvia exclusivament l'estat d'oxidació del metall. Per tant l'entorn de coordinació no es modifica, el nombre de coordinació (NC) es manté. En canvi, en els enzims redox, quan catalitzen una reacció redox, hi ha canvis en el nombre de coordinació del metall, ja que hi ha interacció amb alguns dels reactius, i també canvia el seu estat d'oxidació. Per tant, la diferència entre la proteïna de transport d'electrons i l'enzim redox és que en el primer cas no canvia el NC i en el segon sí.

## 6.2 Proteïnes Fe-S

La família de proteïnes Fe-S està formada per proteïnes que contenen ferro i que presenten diferent nuclearitat: poden contenir entre 1 i 4 ions metàl·lics. Totes elles, independentment de nombre de Fe que continguin, intercanvien un sol electró. En aquestes proteïnes els dos estats d'oxidació possibles són  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Aquestes proteïnes es caracteritzen per tenir un entorn tetraèdric al voltant del ferro. Els lligands que es coordinen al ferro són  $\text{Cys-S}^-$  i en els centres actius polinuclears hi ha també lligands  $\text{S}^{2-}$  actuant com a lligands pont.

Aquestes proteïnes es classifiquen en funció del nombre de centres metàl·lics i el nombre de lligands  $\text{S}^{2-}$ , que sovint s'anomena "S inorgànic". Aquest nom té el seu origen en que abans de disposar de l'estructura cristal·lina es va observar que quan aquestes proteïnes es tractaven amb àcid s'alliberava  $\text{H}_2\text{S}$ , el que indicava que hi havia part de sofre que no formava part de la proteïna.

La família de proteïnes Fe-S està formada per proteïnes del tipus  $[\text{nFe-mS}]$  segons el nombre de Fe (n) i el de S inorgànic (m). Així tenim:

La **rubredoxina**:  $[\text{1Fe-0S}]$ . Té un sol ferro envoltat de 4 lligands cisteïna.

Les **ferredoxines** són centres actius polinuclears en els que hi ha sulfurs pont i lligands cisteïna completant la coordinació tetraèdrica al voltant dels ions ferro. Dins d'aquesta grup tenim diferents clústers:  $[\text{2Fe-2S}]$ ,  $[\text{3Fe-4S}]$  i  $[\text{4Fe-4S}]$ .

Aquestes proteïnes modulen el seu  $E^\circ$  de diferents formes:

- Amb el nombre de centres metàl·lics.
- Amb els estats d'oxidació dels ions Fe, variant la proporció de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .
- Modificant algun lligand terminal.

Aquestes proteïnes són molt antigues a nivell evolutiu. Es van incorporar a les cèl·lules abans de l'aparició de l'oxigen, quan l'atmosfera era reductora i rica en sulfurs.

L'estructura cristal·lina de la **rubredoxina**  $[\text{Fe}(\text{Cys-S})_4]^{\text{n-}}$  es mostra en la Figura 6.4.<sup>19</sup> Es pot veure l'entorn tetraèdric del Fe unit a 4 cisteïnes. Hi ha enllaços per pont d'hidrogen que estableixen l'estructura terciària.

Com el seu nom indica, aquesta proteïna presenta un color vermell intens, tant en la forma oxidada com reduïda, degut a la transferència de càrrega  $\text{Cys-S}^- \rightarrow \text{Fe}^{\text{n+}}$ .

El seu potencial de reducció és petit i negatiu ( $E^\circ \sim -60$  mV), el que indica que el pas entre la forma oxidada i reduïda és fàcil, i per tant no hi ha una forma que sigui molt més favorable que l'altra.

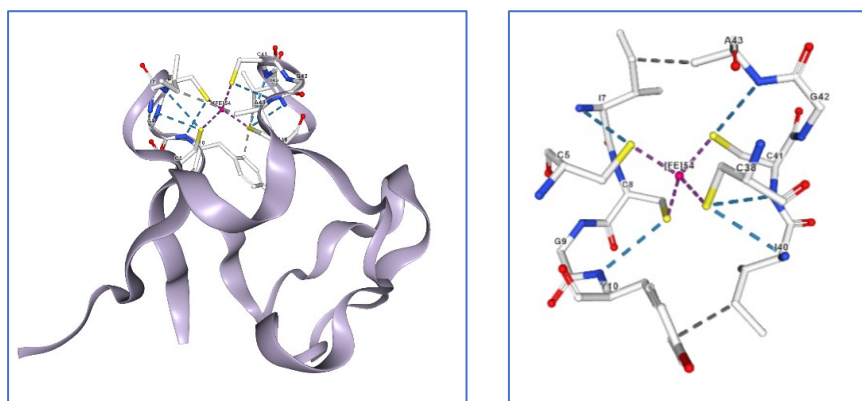


Figura 6.4 Estructura de la rubredoxina i de l'entorn del ferro. Codi PDB: 1BRF.

En la forma oxidada ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) presenta un senyal RSE a  $g \gg 2$ , el que indica que té una configuració electrònica d'espín alt ( $S = 5/2$ ), com era de preveure en un entorn tetraèdric en que el desdoblament dels orbitals  $d$  degut als lligands és relativament petit. En la forma reduïda no s'observa senyal RSE degut a que l'espín és enter ( $S = 2$ ).

La **ferredoxina [2Fe-2S]** té una fórmula  $[\{\text{Fe}(\text{S-Cys})_2\}_2(\mu\text{-S})_2]^{n-}$ . La seva estructura es presenta en la Figura 6.5. Hi ha interacció antiferromagnètica (AF) entre els dos ions metàl·lics propiciada per la presència de lligands pont.

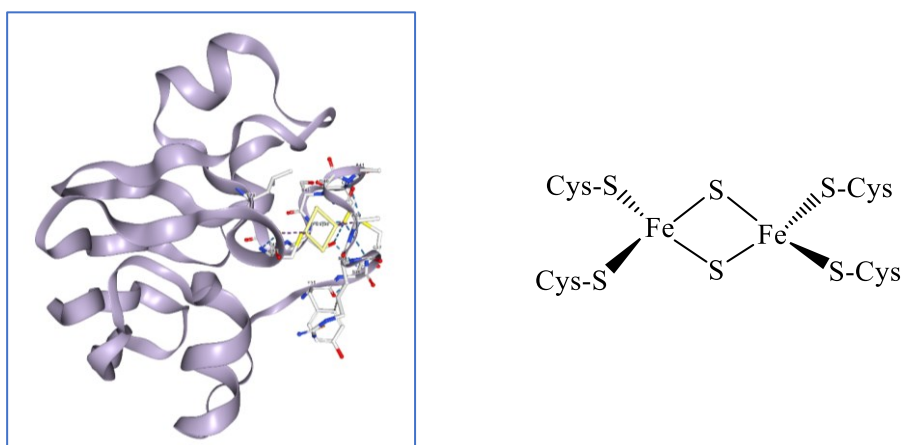


Figura 6.5 Estructura de la ferredoxina [2Fe-2S] i detall del centre actiu. Codi PDB: 1AWD.

El que cal saber és quin estat d'oxidació presenten els ions ferro en aquesta proteïna. Sabent que aquestes proteïnes intercanvien un sol electró, hi ha dues possibilitats, i com que hi ha una interacció AF entre els dos ions, es pot deduir l'estat fonamental d'espín esperat en cada cas. Així doncs, les dues possibles parelles redox són:

- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}} / \text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ . La forma oxidada tindria  $S_{\text{T}} = 0$  mentre que la forma reduïda tindria  $S_{\text{T}} = 1/2$ .
- $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}} / \text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ . En aquest cas la forma oxidada tindria  $S_{\text{T}} = 1/2$  mentre que la reduïda tindria  $S_{\text{T}} = 0$ .

L'espectroscòpia RSE d'aquesta proteïna aporta informació valuosa ja que tan sols s'observa espectre en la seva forma reduïda i apareix un senyal a  $g \sim 2$ . Això indica que en la forma reduïda l'espín total és  $S_{\text{T}} = 1/2$  i per tant es correspon amb l'opció **a**: forma oxidada  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{III}}$  i forma reduïda  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ .

La informació sobre el centre actiu es completa amb l'espectre Mössbauer, que en la forma oxidada presenta un sol senyal (desdoblament degut al moment quadrupolar del nucli) mentre que en la forma reduïda presenta dos senyals. Això confirma que és l'opció a i a més indica que en la forma reduïda l'electró extra està localitzat en un dels àtoms de ferro, o sigui que és un sistema de valència mixta localitzada.

El  $E^\circ$  d'aquestes ferredoxines es troba entre  $-300$  i  $-450$  mV. Aquest potencial és més negatiu que el de la rubredoxina, i indica que el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  està més estabilitzat que el  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , probablement degut a que la cavitat té bastanta càrrega negativa, ja que hi ha els dos  $\text{S}^{2-}$  a més de les  $\text{Cys-S}^-$ .

En la membrana mitocondrial hi ha una proteïna similar, en el centre de Rieske, que té  $E^\circ$  positiu, de l'ordre dels  $+300$  mV, el que indica que en aquest cas és més estable la forma reduïda que l'oxidada. La diferència entre aquesta proteïna i la comentada anteriorment és en els lligands terminals que hi ha en un dels ions ferro. En el centre de Rieske les dues cisteïnes d'un dels ferros s'han substituït per dues histidines. És a dir, que s'han substituït dos lligands aniònics ( $\text{Cys-S}^-$ ) per dos lligands neutres (N-His) i aquest canvi és el responsable del canvi de signe del  $E^\circ$ .

En les **ferredoxines [4Fe-4S]** el centre actiu és un cub en el que els vèrtexs estan ocupats de forma alternada per Fe i S, com es mostra en la Figura 6.6. Com en els altres casos, els ions ferro tenen un  $\text{NC} = 4$ ; tres posicions estan ocupades per lligands  $\text{S}^{2-}$  pont que formen part de l'estructura del cub i la quarta posició l'ocupa una cisteïna, i és per aquestes posicions que el cub està ancorat a la proteïna. Així doncs la fórmula d'aquest centre actiu es pot escriure  $[\{\text{Fe}(\text{S-Cys})\}_4(\mu\text{-S})_4]^{n-}$ .

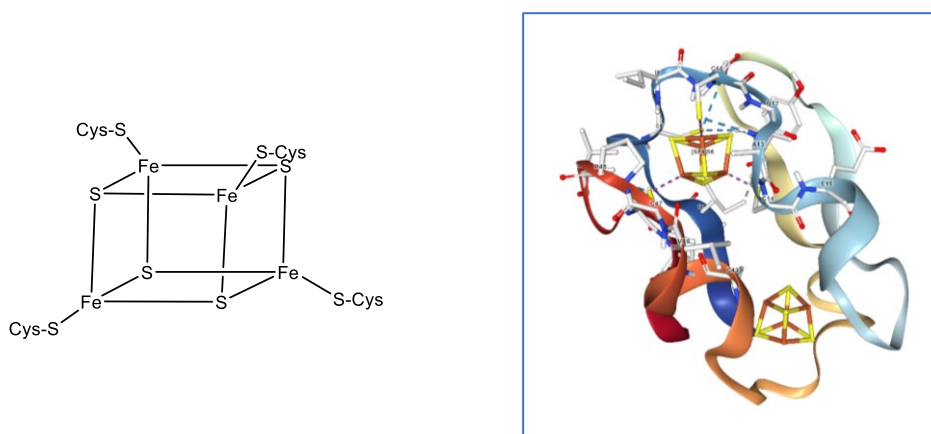


Figura 6.6 Centre actiu de les ferredoxines [4Fe-4S] i estructura d'una cadena de proteïnes d'aquesta família que té dos clústers de ferro. Codi PDB: 1FCA.

En el grup de les proteïnes [4Fe-4S], hi ha dos subgrups en funció del seu potencial redox.

- Les de **baix potencial** (BP): presenten un  $E^\circ$  negatiu al voltant de  $-300$  i  $-450$  mV. Només presenten espectre RSE en la forma reduïda, amb un senyal a  $g \sim 2$ .
- Les d'**elevat potencial** (EP): presenten  $E^\circ$  positiu, al voltant de  $+350$  mV. Presenten espectre RSE en la forma oxidada també amb senyal a  $g \sim 2$ .

L'espectre Mössbauer dona en tots els casos un sol senyal desdoblament, en que varia molt lleugerament el desdoblament quadrupolar i la posició.

Pels dos tipus de proteïnes es pot obtenir una altra forma redox, que no és la biològicament activa. Per les de BP es pot obtenir una forma més oxidada que presenta espectre RSE, mentre que per les de AP es pot obtenir una forma més reduïda que presenta espectre RSE.

A nivell estructural els dos subgrups son similars, és a dir que la diferencia en el signe del  $E^{\circ}$  no depèn dels lligands terminals, com passa en el centre de Rieske, sinó que en aquest cas la diferencia és deguda als estats d'oxidació dels ions ferro.

Tenint en compte que hi ha 4 ions ferro, amb acoblaments AF entre ells, segons si el nombre total d'electrons és parell o senar, l'estat fonamental d'espín serà  $S_T = 0$  (no donarà senyal RSE) o  $S_T = 1/2$  (sí que donarà senyal RSE). Hi ha cinc possibles espècies que formen quatre parelles redox, anant des de l'espècie amb 4  $Fe^{III}$  fins a la que té 4  $Fe^{II}$ . D'aquestes cinc espècies tan sols dues poden presentar espectre RSE (Figura 6.7). A partir de les dades espectroscòpiques esmentades per cada tipus de proteïna, les de BP i les de AP, es pot deduir quina parella redox els hi correspon.

Les de BP presenten espectre RSE en la forma reduïda, i en una forma "més oxidada" (que no es troba a nivell biològic). Per tant la parella ha de ser 2  $Fe^{III}$  2  $Fe^{II}$  / 1  $Fe^{III}$  3  $Fe^{II}$ . Mentre que en les de AP és la forma oxidada i una forma "més reduïda" (que no es troba a nivell biològic) les que presenten espectre RSE. Per tant la parella redox ha de ser 3 $Fe^{III}$  1 $Fe^{II}$  / 2  $Fe^{III}$  2  $Fe^{II}$ .

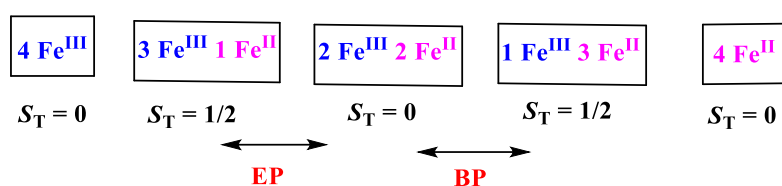


Figura 6.7 Possibles estats d'oxidació pel clúster [4Fe-4S] i estat fonamental d'espín.

Per tant la forma més favorable és, en ambdós casos, la forma 2  $Fe^{III}$ - 2  $Fe^{II}$ . Com més elevat és l'estat d'oxidació global del clúster més favorable és la reducció, potencial més gran.

El fet de que en l'espectre Mössbauer aparegui tan sols un senyal desdoblada, indica que tots els centres metàl·lics tenen el mateix estat d'oxidació. És a dir que, en aquesta família de proteïnes, la valència mixta està deslocalitzada. L'electró que guanya el clúster va a parar a un orbital molecular en el que hi contribueixen els quatre ions ferro. Això fa que hi hagi pocs canvis en les distàncies d'enllaç degut al procés redox, fet que facilita el transport d'electrons.

En aquestes proteïnes es veu que partint d'una mateixa estructura, quan varia l'estat d'oxidació del metall, es pot obtenir un sistema amb un potencial redox totalment diferent.

Finalment hi ha les **ferredoxines [3Fe-4S]**, la fórmula del centre actiu es pot escriure com  $[Fe(S-Cys)_3(\mu-S)_4]^{n-}$ . Aquesta proteïna té una estructura curiosa, un cub que ha perdut un vèrtex. Abans de tenir l'estructura cristal·lina es van fer molts elucubrades per intentar explicar les dades espectroscòpiques. Quan es va resoldre l'estructura cristal·lina d'un enzim anomenat aconitasa, que tenia en el centre actiu un cub en el que hi faltava un vèrtex, es va suposar que aquestes ferredoxines podien tenir aquesta mateixa estructura, ja que explicava perfectament les dades experimentals espectroscòpiques. Més tard s'ha pogut confirmar que realment és així. En la Figura 6.8 es mostra l'esquema d'aquest clúster, així com una proteïna que conté dos clústers, un [4Fe-4S] i un [3Fe-4S].

La informació espectroscòpica sobre aquesta proteïna és:

- Tan sols presenta espectre RSE quan està en la forma oxidada.
- L'espectroscòpia Mössbauer de la proteïna en la seva forma reduïda presenta 2 senyals (desdoblat degut al moment quadrupolar del nucli), un d'ells corresponent a  $Fe^{III}$  i l'altra més intens, en una posició intermèdia entre la típica de  $Fe^{II}$  i de  $Fe^{III}$ . En la forma oxidada tan sols apareix un senyal (desdoblada) típic de  $Fe^{III}$ .

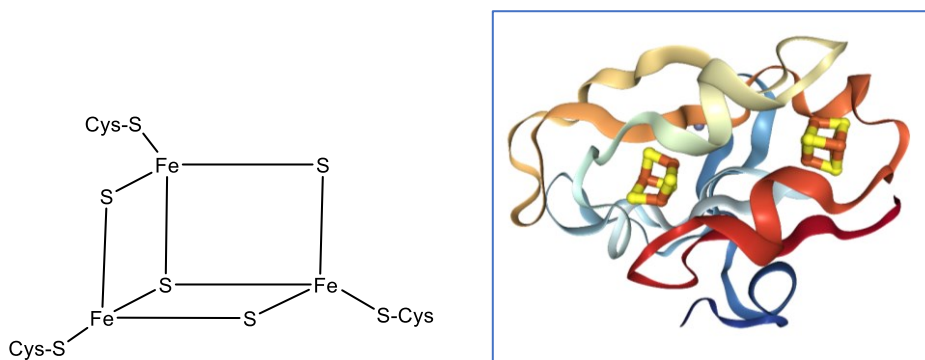


Figura 6.8 Centre actiu de les ferredoxines [3Fe-4S] i estructura d'una proteïna que conté dos clústers Fe-S diferents. Codi PDB: 2VKR.

Per aquest sistema amb 3 ions ferro, els possibles estats d'oxidació son:

$3\text{Fe}^{\text{III}}$ : donaria espectre RSE, ja que té un nombre senar d'electrons i un sol senyal Mössbauer desdoblats per efecte del moment quadrupolar del nucli.

$2\text{Fe}^{\text{III}}-1\text{Fe}^{\text{II}}$ : en aquest cas no donaria espectre RSE ja que el nombre total d'electrons es parell i en haver-hi interaccions AF no quedarien electrons desaparellats. En haver-hi dos estats d'oxidació, tenim un sistema de valència mixta i per tant es pot esperar que presenti dos senyals Mössbauer, si la valència està localitzada, o un de sol si està deslocalitzada.

$1\text{Fe}^{\text{III}}-2\text{Fe}^{\text{II}}$ : donaria espectre RSE ja que té un nombre senar d'electrons. Igual que abans podria presentar un o dos senyals Mössbauer depenent de si hi ha localització o deslocalització de la valència mixta.

$3\text{Fe}^{\text{II}}$ : en aquest cas no s'observaria espectre RSE ja que hi ha un nombre parell d'electrons. En l'espectre Mössbauer s'esperaria un sol senyal.

A partir d'aquestes dades es pot concloure que la forma oxidada és  $3\text{Fe}^{\text{III}}$  i la forma reduïda  $2\text{Fe}^{\text{III}}-1\text{Fe}^{\text{II}}$ . Ara be, en la forma reduïda un dels ions ferro és  $\text{Fe}^{\text{III}}$  mentre que els ions de la base del cub escapçat tenen un estat d'oxidació de +2,5. És a dir que l'electró que s'intercanvia prové o va a parar a un orbital molecular que conté el cor  $[\text{Fe}_2(\mu\text{-S})_2]$ .

El potencial redox d'aquest clúster és negatiu, el que indica que està més estabilitzada la forma oxidada, probablement degut a que la cavitat és rica en grups carregats negativament, com els  $\text{S}^{2-}$  i les  $\text{Cys-S}^-$ .

### 6.3 Citocroms

Els citocroms és una gran família de proteïnes de transport d'electrons que també tenen ferro en el centre actiu, però en aquest cas és un sistema mononuclear que es caracteritza pel lligand al que està coordinat el ferro, que és del tipus porfirina. O sigui que la base d'aquestes proteïnes és el grup Fe-hemo. Les posicions axials estan ocupades per aminoàcids de la cadena de proteïna. La coordinació del ferro en aquestes proteïnes és sempre octaèdrica,  $\text{NC} = 6$ . No s'ha de confondre amb un enzim que s'anomena citocrom  $\text{P}_{450}$  que té  $\text{NC} = 5$ .

Parlem d'una família de proteïnes tipus citocrom ja que en canviar els lligands axials canvia el seu potencial redox. També l'anell porfirínic pot presentar algunes variacions en els substituents i podem trobar anells tipus a, b i c (Figura 6.9). En el cas del grup hemo c l'anell està ancorat a la proteïna a través de dos lligands cisteïna. En la resta de casos el centre actiu queda enllaçat a la proteïna tan sols pels lligands que hi ha en les posicions axials.

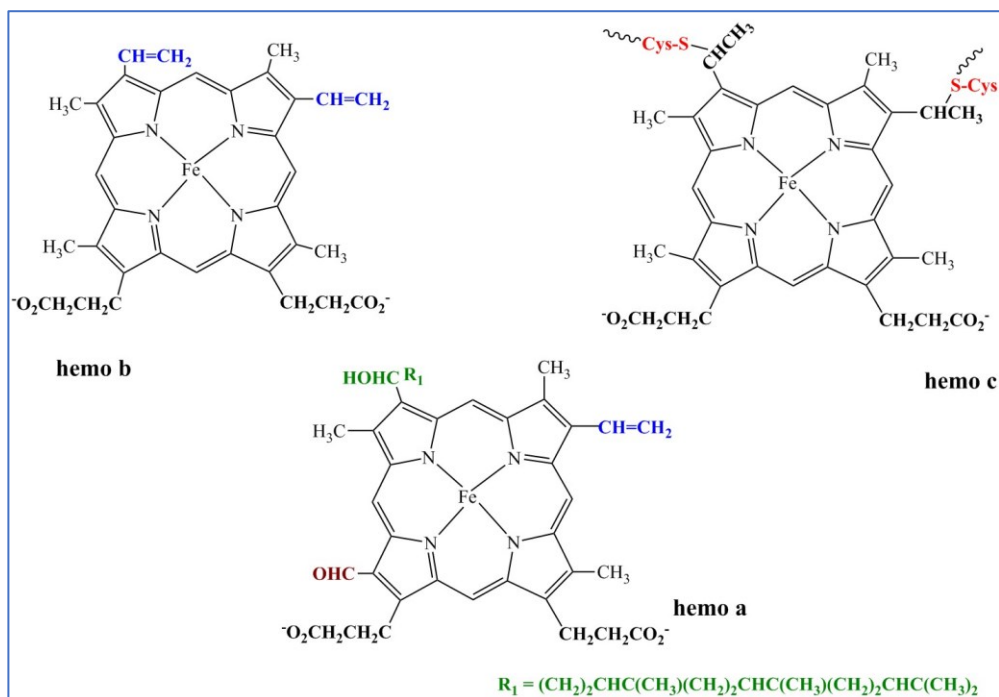


Figura 6.9 Diferències entre els grups hemo a, b i c, segons els substituents que hi ha en l'anell.

El nom que es dona a cada una d'aquestes proteïnes pot fer referència al tipus d'anell, a, b, c i/o a la longitud d'ona on apareix el màxim d'absorció de la banda  $\alpha$  en l'espectre visible, quan el sistema es troba en la forma reduïda. Així, per exemple, cit.  $b_{562}$  significa que hi ha un grup Fe-hemo amb un anell tipus b i que la seva banda  $\alpha$  quan està en forma de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  apareix a 562 nm.

En aquest cas en el que tan sols hi ha un centre metàl·lic el transport d'electrons ens dona una forma oxidada  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i una reduïda  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , i el potencial de reducció  $E^0$  ve modulats pel tipus d'anell (a, b o c) i els lligands en axial.

En la Figura 6.10 es pot veure l'entorn del ferro en un citocrom  $b_5$ , en que l'entorn octaèdric del ferro es completa amb dos lligands histidina.

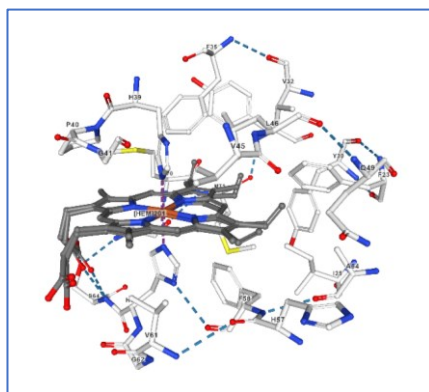


Figura 6.10 Centre actiu del citocrom  $b_5$  de mosca. Codi PDB: 2IBJ.

En la Figura 6.11 es pot veure l'entorn d'un citocrom c. En aquest cas l'entorn octaèdric del ferro es completa amb una histidina (N-His) i una metionina (S-Met).



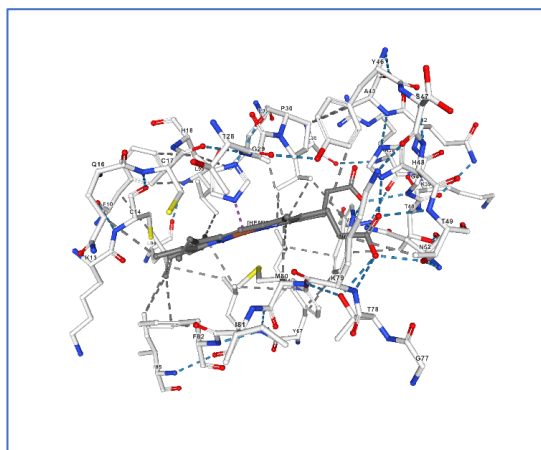


Figura 6.11 Estructura del centre actiu d'un citocrom c humà. Codi PDB: 5EXQ

Els citocroms de tipus b, amb 2 lligands histidina en axial·la (N-His) tenen valors de  $E^0$  petits i al voltant de zero,  $\sim \pm 20$  mV. Això indica que aquesta cavitat estabilitza gairebé per igual al  $\text{Fe}^{\text{III}}$  i al  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

En canvi, els citocroms tipus c que té una posició ocupada per N-His i l'altre per S-Met tenen potencials positius i més grans ( $E^0 \sim +280$  mV). En aquest cas la forma reduïda està més estabilitzada que la forma oxidada. A l'igual que en els citocroms b hi ha dos lligands neutres en axial, i en una de les posicions és el mateix. El que canvia és l'altra posició axial: pel citocrom b és un lligand N-donador i en el citocrom c és un lligand S-donador. En ser el S un àtom més voluminós que el N, té un caràcter de base tova més marcat que el N. En quant al caràcter àcid del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  és més tou que el del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  fet que pot explicar el diferent valor de potencial entre aquests dos citocroms.

La configuració electrònica del ferro en aquests sistemes és de spin baix, per tant només presentarà espectre RSE en la forma oxidada ( $S = 1/2$ ). El seu espectre visible presenta les tres bandes característiques (Figura 3.7) degudes a les transicions  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Hi ha lleugers desplaçaments de les bandes degut al tipus d'anell i als lligands en axial. En línies generals podem dir que la banda  $\alpha$  apareix entre 580-590 nm pels cit. a, a 550-560 nm pels cit. b i entre 548-552 nm pels cit. c.

#### 6.4 Proteïnes blaves de coure

Les proteïnes blaves de coure formen una altra família de proteïnes de transport d'electrons. Com el seu nom indica tenen una coloració blava intensa, característica de compostos amb banda de transferència de càrrega lligand-S  $\rightarrow \text{Cu}^{2+}$ . Hi ha tres proteïnes que formen part d'aquesta família: la **plastocianina**, que participa en el procés de la fotosíntesi, en plantes, l'azurina que també transporta electrons en els bacteris fotosintètics, i l'estellacianina que es troba en plantes.

Totes aquestes proteïnes tenen un centre actiu mononuclear, amb un ió coure que pot presentar nombre de coordinació 4 o 5. Al menys un dels lligands és cisteïna. El centre actiu es pot escriure com  $[\text{Cu}(\text{N-His})_2(\text{S-Cys})\text{L}_x]$  el que varia entre elles és el lligand o lligands L.

En la forma oxidada ( $\text{Cu}^{2+}$ ) presenten espectre RSE amb senyals a  $g \sim 2$ , i una banda intensa en el visible amb un màxim en la regió de 600-680 nm. En la forma reduïda ( $\text{Cu}^+$ ) no hi ha electrons desaparellats, i per tant no donen senyal RSE i com que és un ió  $d^{10}$  no presenten espectre visible.

En la Figura 6.12 es presenta l'estructura de la plastocianina i l'entorn del coure.

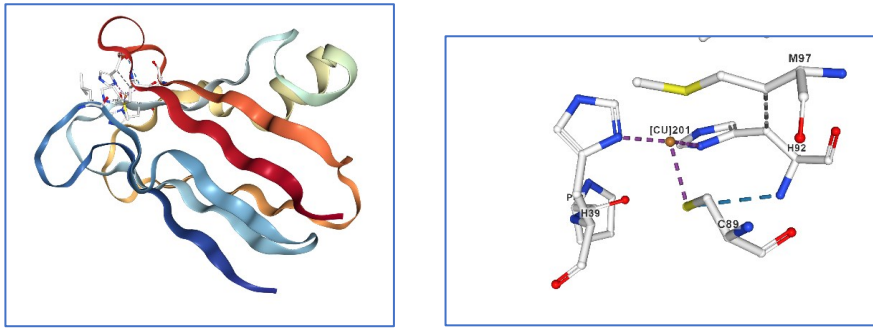


Figura 6.12 Estructura de la plastocianina i de l'entorn del coure. Codi PDB: 4R0O.

En la plastocianina el centre actiu és  $[\text{Cu}(\text{N-His})_2(\text{S-Cys})(\text{S-Met})]$  per tant, l'entorn del coure és  $\text{CuN}_2\text{S}_2$ . En el cas de l'azurina té els mateixos lligands que la plastocianina i a més té coordinat un grup carbonil de la proteïna, per tant l'entorn del coure en aquest cas és  $\text{CuN}_2\text{S}_2\text{O}$ . I per últim l'estellacianina té un centre actiu  $[\text{Cu}(\text{N-His})_2(\text{S-Cys})(\text{Gln})]$  sent Gln = glutamina, el grup  $-\text{CO-NH}_2$  que pot estar unit al coure per O o per N. Per tant en aquest cas l'entorn del coure és  $\text{CuN}_2\text{SX}$  (X = O o N).

Aquestes tres proteïnes tenen  $E^0$  positiu, el que indica que és més favorable la forma reduïda que l'oxidada i varia segons l'entorn: plastocianina ( $\sim 350$  mV) > azurina ( $\sim 250$  mV) > estellacianina ( $\sim 190$  mV). Un entorn ric en lligands tous, com els lligands S-donadors estabilitza millor el  $\text{Cu}^+$  que al  $\text{Cu}^{2+}$ .

## 7. PROTEÏNES DE TRANSPORT D'OXIGEN

### 7.1 Introducció: efecte de la presència d'oxigen en la vida

Quan va començar a aparèixer l'oxigen en el medi els organismes van adaptar-se a la presència d'aquest agent oxidant. Per una banda van desenvolupar un sistema de defensa, i per altra banda van aprofitar els avantatges que aportava aquest agent oxidant.

La utilització de l'oxigen com agent oxidant va comportar l'aparició d'enzims de tipus redox, com són les oxidases i oxigenases. Ara be, això va comportar la formació de subproductes ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ ) i com a conseqüència van aparèixer nous enzims, en aquest cas, de defensa contra aquestes espècies. Els enzims de defensa dels que es parlarà en capítols posteriors son:

- La superoxido dismutasa (SOD) que catalitza la desproporció de l'anió superòxid ( $O_2^-$ ).
- La catalasa que és la responsable de la desproporció del peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ )
- La peroxidasa que utilitza el  $H_2O_2$  com agent oxidant.
- La glutatió peroxidasa responsable de la destrucció dels radicals hidroxil ( $\cdot OH$ ).

En l'escala evolutiva, les cèl·lules, un cop desenvolupat el sistema per utilitzar l'oxigen van desenvolupar un sistema per transportar-lo i fer més eficient la seva utilització.

La molècula d'oxigen és poc soluble en aigua, per tant cal algun sistema que el pugui "solubilitzar", és a dir, que permeti tenir-lo en solució. Per tant cal una proteïna que el pugui transportar en solució. Les condicions que ha de complir aquesta proteïna són:

- Ha de poder unir i alliberar la molècula d'oxigen molt fàcilment, per poder-ne disposar ràpidament quan calgui.
- Ha de ser una metal·loproteïna que tingui una posició vacant on poder coordinar al  $O_2$ .

Aquestes metal·loproteïnes són les que es mostren a la taula 7.1. S'indica també el color que presenta la proteïna abans de coordinar l'oxigen (forma deoxi) i després de coordinar-lo (forma oxi).

*Taula 7.1 Proteïnes de transport d'oxigen i canvi de color observat pel fet de coordinar la molècula d'oxigen.*

Hemoglobina (Hb)	Hemeritrina (Hr)	Hemocianina (Hc)
$Hb + O_2 \rightarrow HbO_2$	$Hr + O_2 \rightarrow HrO_2$	$Hc + O_2 \rightarrow HcO_2$
Porpra $\rightarrow$ vermell	Incolor $\rightarrow$ bordeus	Incolor $\rightarrow$ blau

Aquestes tres proteïnes tenen com a prefix el terme hemo o heme, el que podria fer pensar en la presència del lligand porfirínic. Ara be, tan sols l'hemoglobina presenta color en les dues formes (deoxi i oxi), fet que ens indica que aquesta proteïna té el grup Fe-hemo. Les altres dues, que en la forma deoxi no tenen color, per tant no poden tenir el lligand porfirínic, que ell sol ja presenta coloració.

### 7.1 Hemoglobina i mioglobina

L'hemoglobina és la proteïna que transporta l'oxigen en la majoria d'éssers vius. Com ja s'ha dit el seu centre actiu és del tipus Fe-hemo i l'oxigen es coordina al ferro.

Al respirar inspirem  $O_2$  que passa dels capil·lars pulmonars als capil·lars sanguinis on es coordina al Fe-Hemo. En les artèries la pressió d'oxigen és alta i per tant tenim la forma  $HbO_2$ . En canvi en les

venes la  $P_{O_2}$  és baixa, i per tant la forma predominant és la Hb. Ara be, en les venes predomina el  $CO_2$ , la  $P_{CO_2}$  és alta i s'enllaça a la proteïna, a través d'un grup  $-NH_2$  per ser alliberat als pulmons. La molècula de  $CO_2$  no es transporta coordinada al ferro sinó enllaçada a la cadena proteica.

La solubilitat del  $O_2(g)$  en presència de l'hemoglobina és unes 50 vegades més gran que sense aquesta proteïna de transport:  $\sim 5$  mL  $O_2/L$  sang sense Hb i  $\sim 250$  mL  $O_2/L$  en presència de Hb.

Hi ha dos proteïnes que tenen el mateix centre actiu i coordinen la molècula d'oxigen:

- Hemoglobina (Hb), que transporta l' $O_2$ , té 4 subunitats.
- Mioglobina (Mb) que emmagatzema l' $O_2$  consta d'una sola subunitat.

En la Figura 7.1 es mostra l'estructura de la mioglobina, i el centre actiu Fe-hemo. Com es pot veure en la Figura el ferro té coordinat un lligand histidina en una de les posicions axials. L'altra posició està buida, pel que el  $NC = 5$ . Ara be, proper al ferro per la banda que té la posició vacant hi ha un altre grup histidina, la histidina distal, que com es veurà després també té importància.

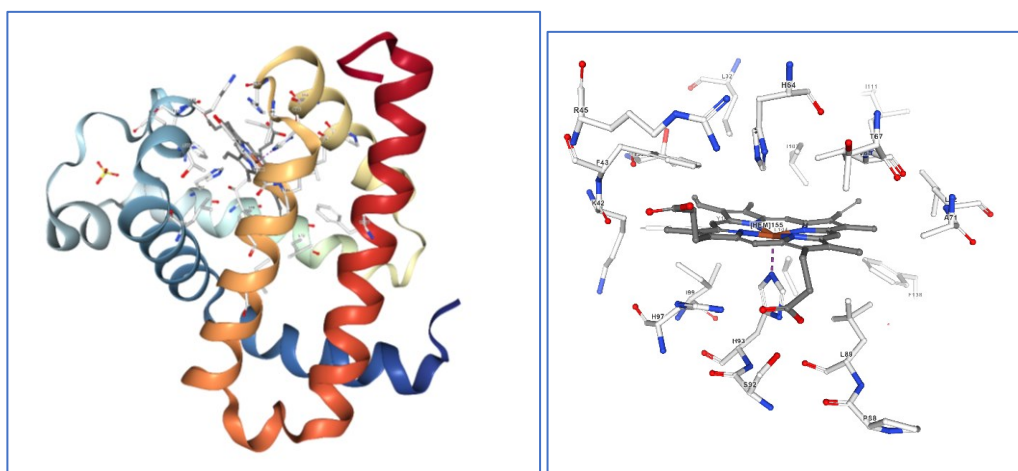


Figura 7.1 Estructura de la mioglobina i entorn del centre metàl·lic. Codi PDB: 1MBD.

Tant en la Mb com en la Hb el centre metàl·lic és  $Fe^{II}$  d'espín alt amb un  $NC = 5$  i no presenta espectre RSE ( $S = 2$ ), però el sistema és paramagnètic, ja que té 4 electrons desaparellats. El radi del  $Fe^{II}$  és més gran que la mida de la cavitat pel que queda lleugerament fora del pla.

Quan coordinen l'oxigen,  $MbO_2$  i  $HbO_2$ , el ferro passa de  $NC = 5$  a tenir un entorn octaèdric ( $NC = 6$ ) i el sistema és diamagnètic. La coordinació de la molècula d'oxigen comporta un canvi en el camp cristal·lí creat pels lligands, el desdoblament del camp cristal·lí es fa més gran, el que comporta un canvi en la configuració electrònica del ferro passant d'espín alt a espín baix.

La resolució estructural d'aquestes proteïnes oxigenades ha permès veure com es coordina la molècula d'oxigen (Figura 7.2). Es coordina per un sol àtom d'oxigen i l'altre àtom d'oxigen interacciona a través d'enllaç per pont d'hidrogen amb la histidina distal. Cal recordar que la histidina, té un enllaç H-N en l'anell (Figura 2.3) que és la posició per la que es pot donar aquesta interacció.

La molècula d'oxigen un cop coordinada al ferro forma un angle  $Fe-O-O$  menor de  $180^\circ$ . En la molècula de  $O_2$  cada oxigen té una geometria electrònica plana trigonal, (dos parells d'electrons solitaris + un enllaç  $\sigma$ ). Per tant l'angle esperat en coordinar-se per un dels parells d'electrons solitaris seria  $\sim 120^\circ$ . Experimentalment el que s'ha trobat és que per la  $MbO_2$  l'angle és de  $115^\circ$  mentre que per  $HbO_2$ , que té quatre subunitats, dos tipus  $\alpha$  i dos tipus  $\beta$ , presenta angles de  $153^\circ$  i  $159^\circ$  respectivament.

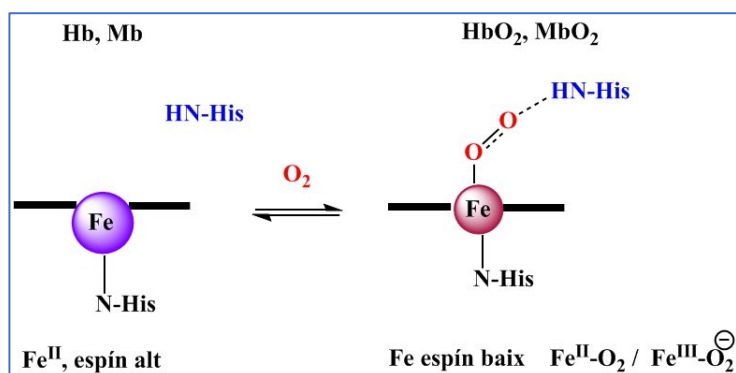


Figura 7.2 Canvis provocats per la coordinació de la molècula d'oxigen al grup Fe-hemo. En blau es mostra la histidina distal.

Com ja s'ha dit, en coordinar-se l'oxigen hi ha un canvi en la configuració electrònica. Aquest és l'únic canvi que hi ha? Pot haver-hi un canvi en l'estat d'oxidació? Té sentit plantejar-se aquesta qüestió? La resposta és que sí que té sentit la pregunta. El potencial de reducció del ferro quan està coordinat a l'hemoglobina és  $E^{\circ}(\text{HbFe}^{3+}/\text{HbFe}^{2+}) = 0,17 \text{ V}$ . És un valor de potencial petit. Tenint en compte que el  $E^{\circ}(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 0,82 \text{ V}$  i el  $E^{\circ}(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2) = 0,27 \text{ V}$  es podria esperar que l'oxigen oxidi el  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

Estudis amb compostos model indicaven que els compostos de  $\text{Fe}^{\text{II}}$  amb lligand porfirínic, en presència d'oxigen, tendeixen a oxidar-se i a dimeritzar, actuant el grup "O<sub>2</sub>" com a lligand pont entre dos molècules. A partir d'aquests estudis es va veure que l'estructura terciària de la proteïna juga un paper clau, creant una cavitat protectora al voltant del centre actiu, de forma que evita la dimerització i l'oxidació del centre metàl·lic.

Del resultat dels diferents anàlisis espectroscòpiques es proposa que en la forma MbO<sub>2</sub> i HbO<sub>2</sub>, hi ha una situació intermèdia, entre  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2$  i  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^-$ . La proteïna protegeix al  $\text{Fe}^{\text{II}}$  de l'oxidació i polimerització, però com que la molècula de O<sub>2</sub> és un lligand π-àcid pot haver-hi una certa retrodonació de densitat electrònica per part del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  cap al π\* del lligand. Això és possible gràcies a que hi ha un cert solapament entre orbitals *d* del Fe i el π\* del O<sub>2</sub> (Figura 7.3). L'espectroscòpia vibracional per la HbO<sub>2</sub> dona una  $\nu(\text{O-O}) = 1107 \text{ cm}^{-1}$ , valor proper al de l'anió superòxid.

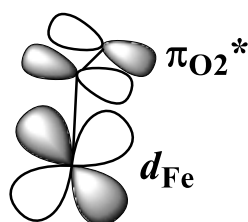


Figura 7.3 Via de solapament tipus π que propicia la transferència electrònica, via retrodonació, del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  al O<sub>2</sub>.

Des del punt de vista del centre actiu i la coordinació de la molècula de O<sub>2</sub>, el comportament de la Mb i Hb és igual. Ara be, hi ha una diferència substancial entre aquests dues proteïnes. La Mb consta d'una sola subunitat mentre que la Hb consta de 4 subunitats.

En passar de la forma deoxi (Mb, Hb) a la forma oxi (MbO<sub>2</sub>, HbO<sub>2</sub>) es passa d'una geometria de piràmide de base quadrada (pbq) a una geometria octaèdrica (Oh). En la geometria de pbq la configuració electrònica és d'espín alt, és a dir que els orbitals *d*  $x^2-y^2$  i el  $z^2$ , que estan en les direccions d'enllaç amb els lligands, estan semi-ocupats. En canvi en la geometria Oh, amb una configuració electrònica d'espín baix, aquests orbitals estan desocupats (Figura 7.4). Això comporta una disminució del radi del  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i

que la seva mida sigui similar a la de la cavitat, quedant gairebé ubicat al pla de l'anell porfirínic (Figura 7.2).

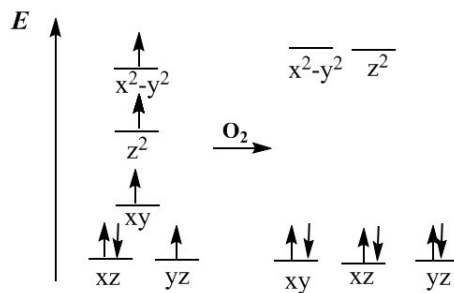


Figura 7.4 Canvi en la configuració electrònica en passar d'una geometria de piràmide de base quadrada a una geometria octaèdrica.

Tenint en compte que el  $\text{Fe}^{II}$  té coordinada en una de les posicions axials un lligand N-His que forma part de la proteïna, el canvi de radi de l'ió metàl·lic provoca un cert "moviment" en la cadena de proteïna a la que està unit. En el cas de la Mb, que té una sola subunitat, això no té massa importància, ara be, en el cas de l'hemoglobina és un factor rellevant.

### Efecte cooperatiu

Les quatre subunitats de l'hemoglobina ( $\alpha_2\beta_2$ ) estan interaccionant entre sí, a través de forces electrostàtiques i enllaços per pont d'hidrogen. Per altra banda, en la cavitat central creada per les quatre subunitats, quan la proteïna està en la forma deoxi (Hb) s'hi col·loca l'anió difosfoglicèrat (DFG) (Figura 7.5) que també està interaccionat amb les quatre subunitats de la Hb.

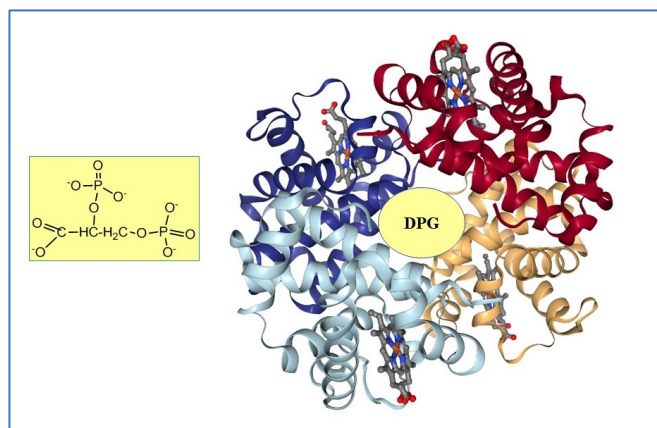


Figura 7.5 Les quatre subunitats de l'hemoglobina formen una cavitat on s'ubica l'anió difosfoglicèrat.

En la Figura 7.6 es mostren els aminoàcids que hi ha al voltant de l'anió DFG, amb els que pot formar enllaços per pont d'hidrogen. En el fetus, hi ha un dels aminoàcids en la cavitat que és diferent: en comptes d'una de les histidines protonades ( $\text{His-NH}^+$ ) hi ha una serina Ser-OH. Aquesta diferència comporta que en el fetus la interacció Hb-DFG sigui menor que en la mare, ja que hi ha menys atraccions electrostàtiques.

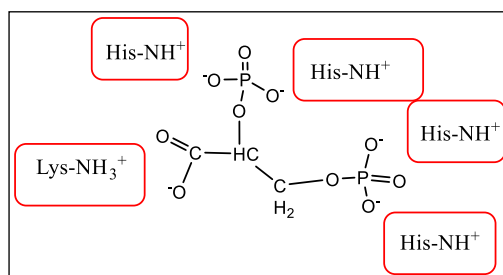
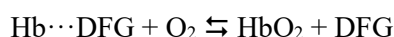


Figura 7.6 Entorn de l'anió difosfoglicerat en la cavitat creada per les 4 subunitats que formen l'hemoglobina.

La coordinació d'una molècula d'oxigen en una de les subunitats comporta el "moviment" de la cadena que penja en la posició axial, això comporta un cert moviment en les altres subunitats i provoca que es perdi la interacció amb el DFG.



La transferència de l'oxigen de la mare al fetus és deguda a que la interacció  $\text{Hb} \cdots \text{DFG}$  és més feble en el fetus, i per tant és més favorable la coordinació de l'oxigen (Figura 7.7).

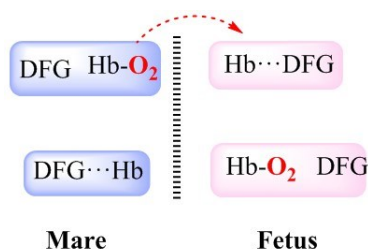
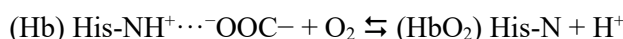


Figura 7.7 Transferència de l'oxigen de la mare al fetus.

L'afinitat de l'hemoglobina per coordinar l'oxigen també depèn del pH. En la subunitat  $\beta$  hi ha una interacció electrostàtica  $\text{His-NH}^+ \cdots \text{OOC}^-$  que es trenca quan es coordina l'oxigen i comporta el desprotonament de la histidina:



Per tant, quan el medi s'acidifica (per exemple en fer exercici físic) la histidina es protona i s'estableix la interacció  $\text{His-NH}^+ \cdots \text{OOC}^-$ , això provoca un cert desplaçament de la cadena de proteïna i s'afavoreix la descoordinació de la molècula d'oxigen. Per tant, el medi àcid afavoreix la mobilització de l'oxigen, la seva disponibilitat en altres processos.

El fet de que la Mb tingui tan sols una subunitat mentre que la Hb en tingui quatre afecta al grau de saturació d'oxigen que presenten. En la Figura 7.8 es mostra el diferent comportament d'aquestes dues proteïnes en funció de la pressió d'oxigen. La forma de la gràfica és diferent, per la Mb té forma hiperbòlica mentre que per la Hb la forma és sigmoïdal. Aquesta diferència és deguda a l'efecte cooperatiu que hi ha, en el cas de la Hb, entre les quatre subunitats.

El grau de saturació de la proteïna es defineix com  $\theta$  que és la relació que hi ha entre els llocs ocupats respecte als totals disponibles ( $\theta = \text{llocs ocupats} / \text{llocs totals}$ ).

En el cas de la Mb: la reacció de saturació de la proteïna  $\text{Mb} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{MbO}_2$  té una constant d'equilibri

$$K_{eq} = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}]P_{\text{O}_2}}$$

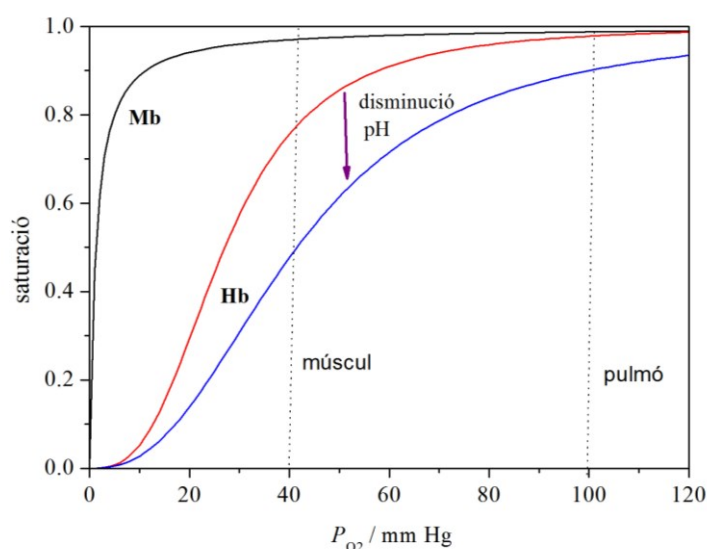
i per una determinada pressió d'oxigen les concentracions seran:

$$[\text{Mb}] = (1-\theta) \text{ i } [\text{MbO}_2] = \theta \text{ per tant, substituint en l'expressió anterior queda: } K_{eq} = \frac{\theta}{(1-\theta)P_{O_2}}$$

Ara be, en el cas de l'hemoglobina, la coordinació de la primera molècula d'oxigen comporta un cert desplaçament de la cadena de proteïna que està unida en la posició axial, i com que les subunitats estan interaccionant entre elles, hi ha un cert desplaçament que afavoreix l'entrada d'una segona molècula d'oxigen. El mateix passa amb les següents subunitats. Això és el que s'anomena efecte cooperatiu. I en aquest cas la constant d'equilibri és:

$$K_{eq} = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{Hb}]P_{O_2}^n} \text{ en que } n \text{ és el coeficient de Hill.}$$

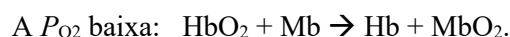
El coeficient de Hill dona informació sobre el grau de cooperativitat que presenta la proteïna. En el cas de la mioglobina  $n = 1$ . Quan  $n > 1$  indica que hi ha efecte cooperatiu. En el cas de l'hemoglobina  $n = 2.8$ .



*Figura 7.8 Simulació del grau de saturació de les proteïnes (Mb i Hb) en funció de la pressió d'oxigen. La corba per Mb és hiperbòlica i per la Hb sigmoïdal. Efecte del pH en la saturació d'oxigen per part de l'hemoglobina.*

Com es pot veure en la Figura 7.8 quan el pH disminueix, la Hb està menys saturada d'oxigen, que és el que s'havia comentat abans, l'oxigen s'allibera més fàcilment. També s'ha observat que el grau de saturació disminueix quan augmenta la temperatura. Quan es té febre, l'oxigen queda menys retingut per l'hemoglobina i per tant està més disponible per utilitzar-lo en el sistema de defensa cel·lular.

Comparant les corbes de saturació de Hb i Mb es veu que la Mb encara que la pressió d'oxigen sigui baixa se satura ràpidament (ja que tan sols té un lloc per ocupar). En canvi la Hb requereix més quantitat d'oxigen per arribar a saturació. En els pulmons, la quantitat d'oxigen és alta, les dues proteïnes presenten un grau de saturació similar. En canvi en el teixit muscular la quantitat d'oxigen és menor, i per tant té més afinitat per l'oxigen la Mb que la Hb i això afavoreix la transferència d'oxigen d'una proteïna a l'altra. La Hb transporta l'oxigen mentre que la Mb l'emmagatzema.



Per últim cal remarcar que la molècula d'oxigen  $O_2$  és un lligand  $\pi$ -àcid i que per tant pot ser substituïda per altres lligands del mateix tipus, com per exemple el CO o el  $CN^-$ . La inhalació de CO(g) o HCN(g) és altament tòxica ja que poden coordinar-se al  $Fe^{II}$  en l'hemoglobina.



**Com a curiositat**, el canvi de lligand comporta un cert canvi en l'espectre visible del compost format. Això es posa de manifest en la coloració de la pell quan hi ha una intoxicació amb aquests compostos. Una mala combustió del carbó comporta la formació de CO(g) que en formar Hb(CO) dona una coloració més rosada a la pell, mentre que si el que es coordina és l'anió  $\text{CN}^-$  la tonalitat de la pell és més blavosa.

La histidina distal, que hem comentat que està propera al centre actiu però no coordinada al ferro, té un paper clau en la protecció contra aquestes espècies. Tant el CO com el  $\text{CN}^-$  tenen un sol parell d'electrons solitaris sobre el carboni, per tant el mode de coordinació més favorable seria en una disposició lineal Fe-C-O. En aquesta disposició el CO presenta un enllaç amb el grup Fe-hemo (no en l'entorn de la proteïna) de l'ordre de 25.000 vegades més fort que el  $\text{O}_2$ . Ara bé, quan interacciona amb el mateix centre actiu però que forma part de la proteïna, la presència de la histidina distal modifica la seva disposició, degut a la formació d'un enllaç per pont d'hidrogen i l'enllaç  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -CO és molt més feble. Tot i així, segueix sent més unes 200 vegades més fort que l'enllaç amb l'oxigen (Figura 7.9).

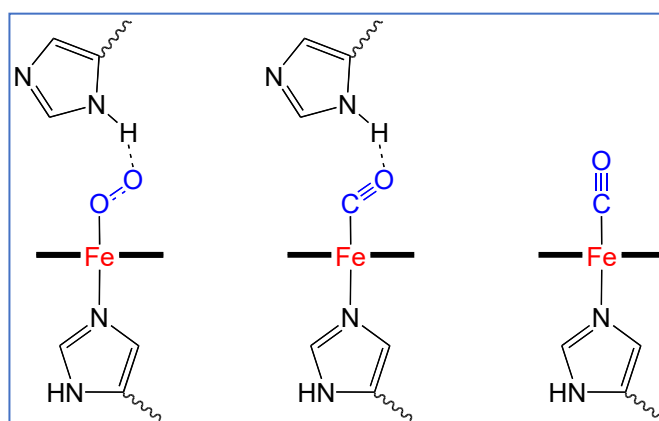


Figura 7.9 Paper de la histidina distal en la coordinació de lligands similars a l'oxigen.

## 7.2 Hemeritrina (Hr)

La proteïna responsable del transport d'oxigen en els invertebrats marins s'anomena hemeritrina. El seu centre actiu està format per un sistema dinuclear de ferro. La forma deoxi, Hr, té dos lligands carboxilat pont ( $\text{Asp-CO}_2^-$  i  $\text{Glu-CO}_2^-$ ) i un grup  $\text{OH}^-$  pont. Un dels ions ferro té  $\text{NC} = 5$  i l'altre  $\text{NC} = 6$ . Tant un com l'altre completen la coordinació amb lligands N-His.

Aquesta proteïna pot tenir diferent nombre de subunitats, segons en quina espècie es trobi: 1, 3 o 8 subunitats. En la Figura 7.10 es presenta l'estructura d'una subunitat d'hemeritrina en la forma deoxi (Hr) i el centre actiu d'una altra hemeritrina en les dues formes, Hr (deoxi) i  $\text{HrO}_2$  (oxi).

La forma Hr no té color, per tant no hi ha lligands que puguin donar bandes de transferència de càrrega. Presenta acoblament antiferromagnètic (AF) feble, el que indica que la configuració electrònica del ferro és  $\text{Fe}^{\text{II}}$  d'espín alt. El valor de  $\chi_{\text{MT}}$  a temperatura ambient indica que són ions  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Si fossin d'espín baix no serien paramagnètics ja que cada ferro tindria tots els electrons aparellats ( $S = 0$ ).

La forma  $\text{HrO}_2$  presenta color intens, el que indica que quan es coordina l'oxigen hi ha una banda de transferència de càrrega lligand  $\rightarrow$  metall.

En passar de Hr a  $\text{HrO}_2$  hi ha canvis en l'espectre Mössbauer: tant el desplaçament isomèric ( $\delta$ ) com el desdoblament quadrupolar ( $\Delta E_{\text{Q}}$ ) disminueixen. Això suggereix un canvi en l'estat d'oxidació dels ions ferro.

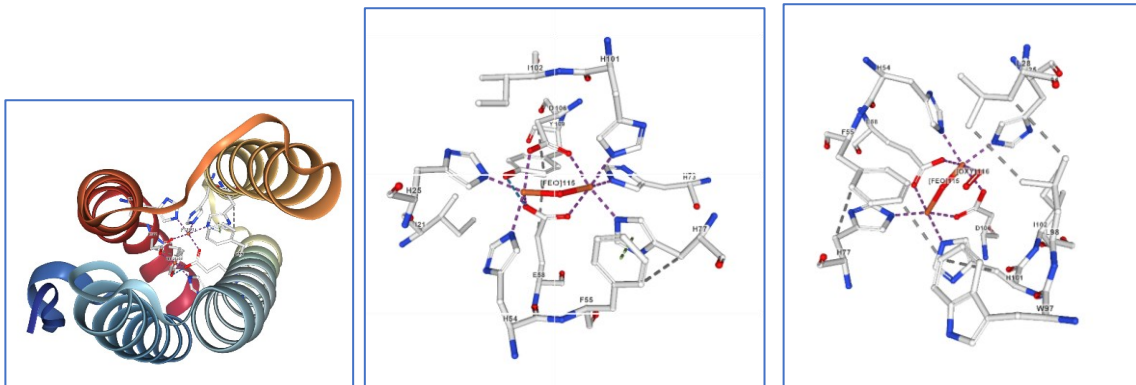


Figura 7.10 Estructura d'una subunitat d'hemeritrina (Hr). Codi PDB: 4XPX. Estructura del centre actiu d'una hemeritrina en la forma Hr i HrO<sub>2</sub>. Codis PDB: 1HMD i 1HMO.

En passar de Hr a HrO<sub>2</sub> l'acoblament AF s'intensifica. Això indica un canvi en els lligands pont (pas de OH<sup>-</sup> a O<sup>2-</sup>) i també suggereix un canvi en l'estat d'oxidació dels ions ferro, de Fe<sup>II</sup> a Fe<sup>III</sup>; ambdós fets fan disminuir la distància Fe...Fe, fet que afavoreix la interacció AF.

L'espectroscòpia vibracional dona una freqüència de vibració  $\nu(\text{O-O}) \sim 850 \text{ cm}^{-1}$ , que és un valor proper al corresponent a un anió peroxo (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>).

Per tant, en base a aquestes dades espectroscòpiques es proposa el mecanisme que es mostra en la Figura 7.11. L'oxigen es coordina al Fe<sup>II</sup> que té una posició vacant (NC = 5), de forma monodentada. L'àtom d'oxigen no coordinat forma un enllaç per pont d'hidrogen amb el grup OH pont i això porta a una redistribució electrònica: els dos ions Fe<sup>II</sup> s'oxiden i el O<sub>2</sub> passa a l'anion peròxid HO<sub>2</sub><sup>-</sup> protonant-se o compartint el H amb el oxo pont.

Per tant, en l'hemeritrina quan transporta l'oxigen hi ha una redistribució d'electrons, a nivell intern en el conjunt del complex. No es guanyen ni perden electrons, tan sols es redistribueixen entre el centre metàl·lic i el O<sub>2</sub>. Quan s'ha d'alliberar l'oxigen torna a haver-hi reordenament electrònic.

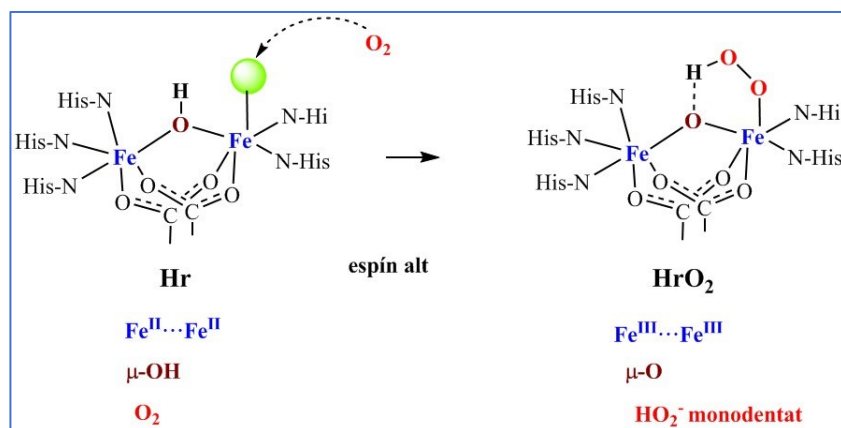


Figura 7.11 Mecanisme proposat per l'hemeritrina en el transport d'oxigen.

Quan hi ha més d'una subunitat, hi ha efecte cooperatiu, a l'igual que passa en l'hemoglobina. El valor del coeficient Hill ( $n$ ), que ens indica el grau de cooperativitat depèn de dos factors:

- El nombre de subunitats: com més n'hi hagi més gran serà l'efecte cooperatiu.
- Els canvis estructurals: com més grans siguin els canvis en l'entorn dels ions ferro, que són els que estan units a la proteïna, més afectarà la coordinació de l'oxigen a les altres subunitats, i per tant més gran serà l'efecte cooperatiu.

En l'hemeritrina, el canvi de radi dels ions ferro en oxidar-se i el canvi en el pont, fa que s'apropin els dos ions, arrossegant la cadena de proteïna en el seu moviment. Ara be, el canvi no és molt marcat pel que l'efecte cooperatiu és relativament petit i depèn molt del nombre de subunitats,  $n = 1, 1-2, 1$ .

### 7.3 Hemocianina (Hc)

L'hemocianina és la proteïna que transporta oxigen en mol·luscs i artròpodes. Aquesta proteïna es caracteritza per tenir moltes subunitats. En artròpodes pot tenir entre 6–45 subunitats mentre que en mol·luscs el rang és de 10–20 subunitats. Per tant ja es pot suposar que l'efecte cooperatiu en el transport d'oxigen serà important.

El centre actiu d'aquesta proteïna conté dos ions coure que tenen com a lligands terminals tres histidines. (Figura 7.12). La forma deoxi (Hc) és incolora i diamagnètica, i això correspon a un centre dinuclear de  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

La forma oxi,  $\text{HcO}_2$ , té un color blau intens, amb una banda a 345 nm amb un coeficient d'extinció elevat, que correspon a una banda de transferència de càrrega lligand  $\rightarrow$  metall. Per tant indica que al menys un dels ions metàl·lics té un orbital  $d$  parcialment ocupat, o sigui que s'ha oxidat a  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

En la forma  $\text{HcO}_2$  no presenta RSE i les seves propietats magnètiques indiquen un fort acoblament AF. Això indica que els dos ions coure s'han oxidat a  $\text{Cu}^{\text{II}}$  i degut a l'acoblament AF no s'observa RSE.

Si el sistema  $\text{Cu}^{\text{I}} \cdots \text{Cu}^{\text{I}}$  ha passat a  $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Cu}^{\text{II}}$  els dos electrons que es perden passen a la molècula d'oxigen i forma l'anió peròxid. L'espectroscòpia vibracional confirma aquest fet, ja que la  $\nu(\text{O}-\text{O}) \sim 750 \text{ cm}^{-1}$ . És a dir que a l'igual que passa en l'hemeritrina, hi ha una redistribució electrònica interna durant el transport de l'oxigen.

El fet de que en la forma  $\text{HcO}_2$  hi hagi un fort acoblament AF indica que l'anió peròxid actua de lligand pont. Fins que no es va tenir l'estructura cristal·lina de la  $\text{HcO}_2$  es van estar fent estudis i comparació amb compostos model per tal d'esbrinar com es coordinava aquest ió peròxid, ja que hi ha diverses possibilitats. Ara se sap que es coordina pels dos oxígens i cada oxigen als dos ions  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

Per tant, en la forma Hc els ions  $\text{Cu}^{\text{I}}$  tenen un  $\text{NC} = 3$  i no ho ha cap lligand pont; en la forma  $\text{HcO}_2$  els ions  $\text{Cu}^{\text{II}}$  presenten  $\text{NC} = 5$ , i el lligand pont és el grup  $\text{O}_2^{2-}$ .

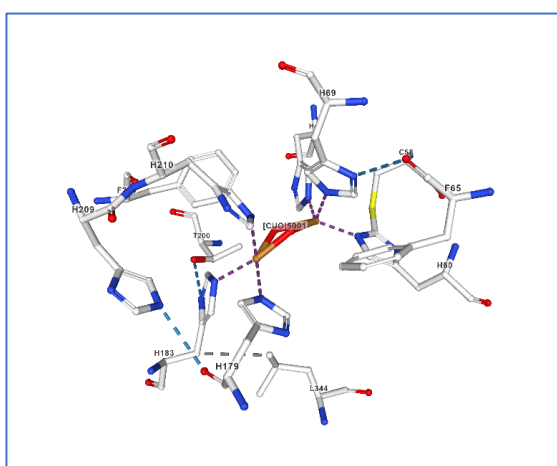


Figura 7.12 Centre actiu de la  $\text{HcO}_2$ . Codi PDB: 4yD9.

Així doncs, el mecanisme que es planteja pel transport d'oxigen amb la hemocianina és el que es mostra en la Figura 7.13. Hi ha dos factors que afecten significativament a la distància  $\text{Cu} \cdots \text{Cu}$ : per una banda el canvi d'estat d'oxidació (el radi:  $\text{Cu}^{\text{I}} > \text{Cu}^{\text{II}}$ ) i per altra i molt més important, l'absència o presència

de lligand pont. La coordinació del grup peroxo com a lligand pont bis bidentat obliga a un apropament important dels dos ions metàl·lics.

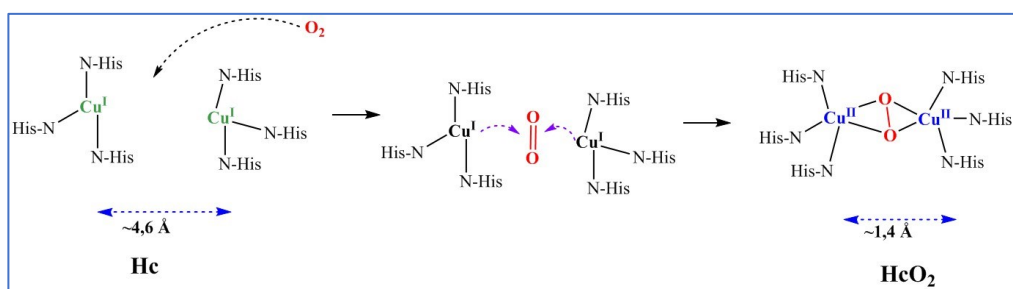


Figura 7.13 Mecanisme del transport d'oxigen amb l'hemocianina.

Per tant, en aquestes proteïnes l'efecte cooperatiu és molt important ja que el canvi en la distància  $\text{Cu}\cdots\text{Cu}$  que es produeix en oxigenar-se l'hemocianina, provoca un desplaçament significatiu de la cadena proteica a la que estan units els ions metàl·lics. A això s'hi suma el fet de que hi ha un nombre elevat de subunitats, per tant, l'efecte cooperatiu en el transport d'oxigen és gran i es poden arribar a trobar valors de  $n \sim 9$ .

#### 7.4 Comparativa entre els diferents sistemes de transport d'oxigen

Els tres tipus de proteïnes de transport d'oxigen tenen algunes característiques en comú i altres que les diferencia. En la taula 7.2 es presenta un resum comparant aquests tres sistemes, posant l'èmfasi en el tipus de lligands, en el metall i en la forma en que es redistribueix la densitat electrònica.

Taula 7.2 Comparativa entre les proteïnes de transport d'oxigen (NC= nombre de coordinació del metall;  $n$  = coeficient de Hill que indica el grau de cooperativitat).

	<b>Hb</b>	<b>Hr</b>	<b>Hc</b>
Lligands	hemo	$\mu\text{-OH}^-$ , $\mu\text{-CO}_2^-$	No hi ha lligands pont
Metall	$\text{Fe}^{\text{II}}$ espín alt	$\text{Fe}^{\text{II}}\cdots\text{Fe}^{\text{II}}$ espín alt	$\text{Cu}^{\text{I}}\cdots\text{Cu}^{\text{I}}$
NC	5	6, 5	3, 3
	<b>HbO<sub>2</sub></b>	<b>HrO<sub>2</sub></b>	<b>HcO<sub>2</sub></b>
	$\text{Fe}^{\text{II}}\text{-O}_2 / \text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}_2^-$ Espín baix $\text{O}_2 / \text{O}_2^-$ monodentat	$\text{Fe}^{\text{III}}\cdots\text{Fe}^{\text{III}}$ $^-\text{OOH}$ monodentat	$\text{Cu}^{\text{II}}\cdots\text{Cu}^{\text{II}}$ $\text{O}_2^{2-}$ bis bidentat
$n$	Moderat 2,8	Baix 1,1–2,1	Molt elevat, fins a 9

## 8. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'OXIGEN

### 8.1 Introducció a l'activació de la molècula d'oxigen

La presència d'oxigen al medi va portar a l'adaptació per part dels organismes i a la utilització d'aquest agent oxidant. Per poder-lo utilitzar cal trencar el doble enllaç que presenta aquesta molècula (O=O) i és a aquest fet al que ens referim quan parlem d'activació: afeblir aquest enllaç per poder utilitzar els "O".

Hi ha diversos enzims que utilitzen la molècula O<sub>2</sub> com agent oxidant, per tal d'oxidar diferents tipus de substrats. Ara be, podem diferenciar dos grups:

- a) **Oxidases**: només hi ha l'**oxidació del substrat** i el O<sub>2</sub> es redueix a H<sub>2</sub>O (oxidases blaves) o a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidases no blaves).
- b) **Oxigenases**: a l'igual que en el cas anterior, hi ha l'**oxidació del substrat** i a més, la **inserció d'àtoms d'oxigen** ("O") en el substrat. Dins d'aquest grup diferenciem
  - **Dioxygenases**: quan insereixen els dos "O" al substrat.
  - **Monoxygenases**: quan insereixen un sol "O" al substrat.

Hi ha tres monooxygenases interessants, ja que tenen un centre actiu similar al de les proteïnes de transport d'oxigen (Taula 8.1). Per trencar la molècula d'oxigen cal aportar electrons a l'orbital  $\pi^*$  i al  $\sigma^*$ , per tant cal que la molècula d'oxigen es coordini a un ió metàl·lic ric en electrons, o sigui en estat d'oxidació baix. En les proteïnes de transport d'oxigen, que coordinen al O<sub>2</sub>, el metall ja està en estat d'oxidació baix (Fe<sup>II</sup> o Cu<sup>I</sup>) i en totes elles, en menor (Hb) o major grau hi ha transferència de densitat electrònica del metall cap a l'oxigen. Per tant, utilitzant un sistema similar es pot arribar a trencar la molècula.

Taula 8.1. Monooxygenases i el centre actiu equivalent en proteïnes de transport d'oxigen.

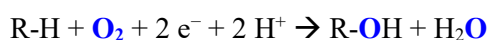
<b>Monooxygenasa</b>	Citocrom P <sub>450</sub> ( <b>cit P<sub>450</sub></b> )	Metanomonooxygenasa ( <b>MMO</b> )	Tirosinasa ( <b>Ty</b> )
Proteïna de transport O <sub>2</sub>	Hb (Fe-hemo)	Hr (Fe-Fe)	Hc (Cu-Cu)

### 8.2 Monooxygenases

#### *Citocrom P<sub>450</sub>*

El citocrom P<sub>450</sub> és l'enzim d'activació de la molècula d'oxigen més estudiat. Té una gran importància en el metabolisme dels mamífers, tot i que es troba en molts organismes diferents (plantes, fongs, bacteris). En mamífers es troba en membranes, la membrana del retícul endoplasmàtic, la mitocondrial i la citoplasmàtica.

La reacció que catalitza aquest enzim és la inserció d'un àtom d'oxigen en un substrat (R-H) i l'altre oxigen forma aigua:



Aquesta reacció requereix la presència de protons i d'electrons. Per tant, cal que hi hagi un sistema que transporti els electrons necessaris fins aquí. En molts casos el sistema de transport emprat és el dinucleòtid NADH/NAD<sup>+</sup>.

Les reaccions que catalitza aquest enzim són molt diverses, però en línies generals podem dir que funcionalitza el substrat, és a dir insereix un grup funcional més polar. Algunes de les funcions que realitza són: síntesi d'hormones, metabolització de fàrmacs, o participar en processos de detoxificació. En aquest sentit, compostos que hagin pogut quedar retinguts en les membranes, en inserir-hi una funció més polar poden mobilitzar-se i sortir de la membrana.

Degut a la gran varietat de reaccions que catalitza i la diversitat de funcions que té, en l'home es troba distribuït en diferents punts de l'organisme, i n'hi ha al voltant de 60.

Com el seu nom indica, citocrom, aquest sistema té un grup Fe-hemo com a centre actiu. El valor de 450 correspon a la longitud d'ona on apareix el màxim de la banda de Soret en l'espectre visible, quan el centre actiu està en la seva forma reduïda,  $Fe^{II}$  i té coordinat el CO.

El primer cit  $P_{450}$  del que es va resoldre l'estructura cristal·lina l'any 1985, es va aïllar del bacteri *pseudomona pútida*. Aquest citocrom catalitza la reacció d'hidroxilació de la càmfora. En la Figura 8.1 es pot veure l'estructura d'aquesta proteïna en absència de substrat, i el centre actiu en absència i en presència de substrat.

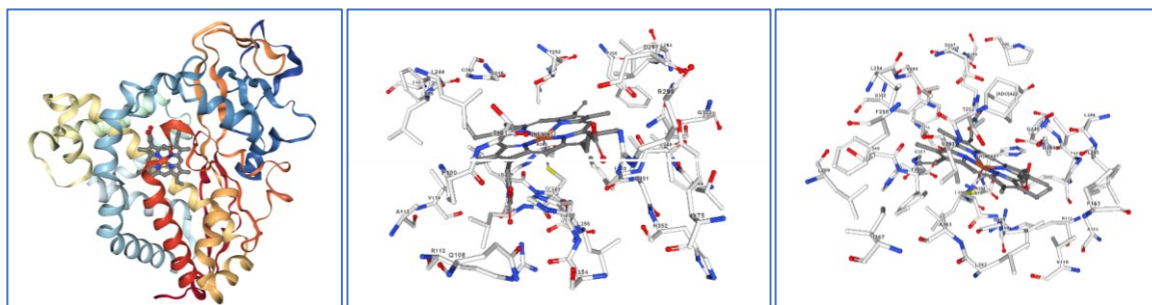


Figura 8.1 Estructura del citocrom  $P_{450}$  del bacteri *pseudomona putida* en absència de substrat (Codi PDB: 1PHC) i en presència de càmfora (Codi PDB: 5CPP).

El Fe en el citocrom  $P_{450}$  té una posició axial ocupada per una cisteïna ( $^-S-Cys$ ). L'altre posició en absència del substrat (càmfora) està ocupada per un agregat de molècules d'aigua (que no es mostren en la Figura 8.1). Quan la càmfora arriba a la cavitat on hi ha el centre actiu aquest clúster de molècules d'aigua es desplaça i el Fe queda amb  $NC = 5$ . La càmfora no es coordina al centre metàl·lic (Figura 8.2). Hi ha un canvi significatiu en l'espectre RSE. En absència del substrat hi ha un senyal a  $g \sim 2$ , el que indica un espín  $S = 1/2$  i per tant correspon a  $Fe^{III}$  d'espín baix. La presència de la càmfora en la cavitat canvia significativament l'espectre i apareixen senyals a  $g \gg 2$ , el que indica que tenim un espín fraccionari i major que  $1/2$  ( $S > 1/2$ ). Per tant, hi ha un canvi d'espín baix a espín alt que s'explica pel canvi en el nombre de coordinació  $NC = 6 \rightarrow NC = 5$ .

El potencial de reducció del  $Fe^{III}$  en una configuració electrònica d'espín baix és més negatiu que quan té configuració electrònica d'espín alt. És més favorable la reducció del  $Fe^{III}$  a  $Fe^{II}$  quan té configuració d'espín alt que quan és d'espín baix. Cal recordar que per activar la molècula d'oxigen es requereix que el metall es trobi en forma en estat d'oxidació baix,  $Fe^{II}$ .

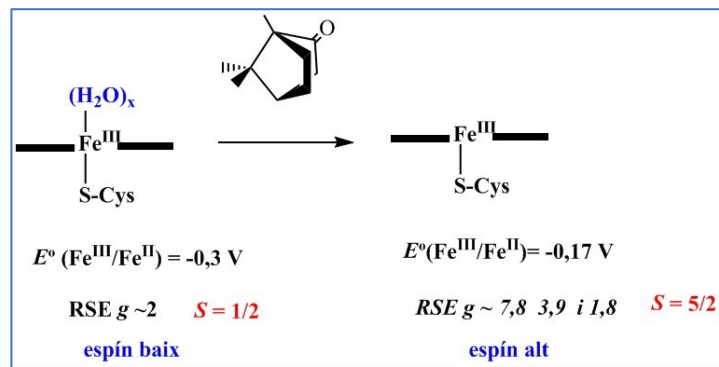


Figura 8.2 Efecte de la presència de la càmfora en el centre actiu del citocrom  $P_{450}$ . No s'indiquen les dues càrregues negatives que té l'anell.

El mecanisme que es proposa per la hidroxilació de la càmfora a partir de l'oxigen es presenta en la Figura 8.3. El procés es pot resumir en diferents etapes:

- Quan entra el substrat a la cavitat el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  passa d'espín baix a espín alt i de  $\text{NC} = 6$  a  $\text{NC} = 5$ .
- Arribada del primer electró provinent del sistema de transport d'electrons, i que redueix el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  espín alt a  $\text{Fe}^{\text{II}}$  espín alt.
- Coordinació de la molècula d'oxigen i canvi a configuració electrònica d'espín baix.
- Reducció del  $\text{O}_2$  a peròxid ( $\text{O}^-\text{O}^-$  coordinat en forma monodentada). Es necessiten 2 electrons: un és el segon electró que arriba per medi del sistema de transport d'electrons i l'altre l'aporta el  $\text{Fe}^{\text{II}}$  oxidant-se a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .
- Trencament de l'enllaç  $\sigma$  del peròxid. Cal aportar 2 electrons a l'orbital  $\sigma^*$ , un d'ells prové del  $\text{Fe}^{\text{III}}$  que s'oxida a  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  i l'altre prové del sistema  $\pi$  de l'anell porfirínic. En trencar-se l'enllaç  $\text{O}-\text{O}$  un dels "O" queda unit al  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  amb doble enllaç i l'altre, amb 2  $\text{H}^+$  que arriben al medi, forma aigua.

L'estat d'oxidació  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  està estabilitzat pel lligand aniónic en axial ( $\text{S-Cys}$ ) que aporta densitat electrònica. Per altra banda, cal recordar que l'anell del grup hemo té dues càrregues negatives; en perdre un electró, queda un electró desaparellat en el sistema  $\pi$ , un radical i l'anell ha perdut una de les càrregues negatives, però segueix estabilitzant l'estat d'oxidació poc usual del ferro. La formació del radical en l'anell porfirínic es proposa a partir dels canvis observats en l'espectre visible.

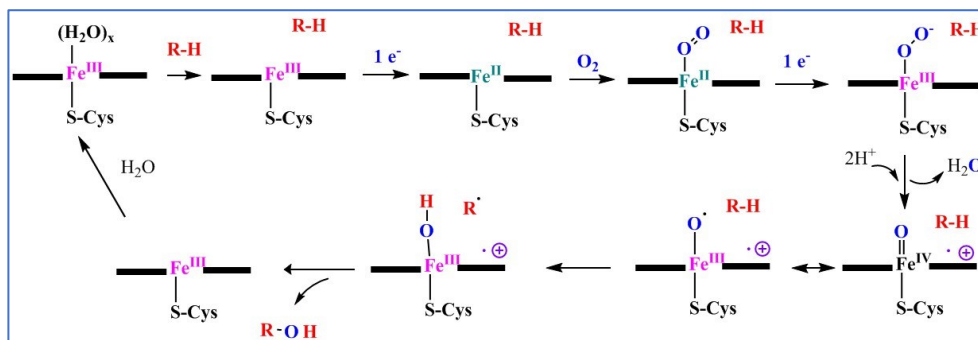


Figura 8.4 Mecanisme proposat pel citocrom  $P_{450}$ . No s'indiquen les dues càrregues negatives que té l'anell porfirínic.

- Hi poden haver dues formes ressonants per l'espècie intermèdia "FeO":  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O} \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}-\text{O}^{\cdot}$ .

- Un radical tendeix a trencar enllaços per aparellar l'electró, i per tant genera un nou radical. En aquest cas, la forma radical pot trencar l'enllaç R-H del substrat generant el radical R· i quedant el grup del ferro com Fe<sup>III</sup>-OH.

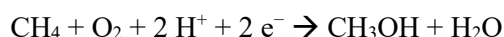
- A continuació és el radical R· el que trenca l'enllaç Fe<sup>III</sup>-OH de forma homolítica formant-se el producte desitjat (R-OH). Per altra banda l'altre electró de l'enllaç Fe<sup>III</sup>-OH retorna al sistema π de l'anell i en la posició vacant del Fe<sup>III</sup> s'hi coordina el clúster d'aigües, retornant al punt de partida.

La proposta d'aquest mecanisme via radical es basa en estudis fets utilitzant càmfora deuterada, en que tant si es deuter la posició en axial com l'equatorial, el producte dona sempre el mateix. Això indica que hi ha un intermedi pla trigonal, trencament homolític de l'enllaç i formació del radical.

### *Metanomonooxigenasa (MMO)*

La metanomonooxigenasa (MMO) és un enzim que es troba en bacteris metanotròfics. Aquests bacteris són aeròbics i utilitzen el metà com a font d'energia i com a font de carboni. No s'han de confondre amb uns altres bacteris, que són metanogènics; aquests són anaeròbics (vida sense oxigen) i sintetitzen el metà a partir de H<sub>2</sub> i CO<sub>2</sub>.

El nom de metanomonooxigenasa ja indica quina reacció catalitza: la funció monooxigenasa, inserció d'un àtom d'oxigen, sobre el metà. Per tant el producte d'aquesta reacció és el metanol. La reacció que catalitza aquest enzim és:



Tal i com es pot veure en aquesta reacció el procés requereix de la presència de protons i d'electrons. Per tant en el conjunt enzimàtic hi intervé algun sistema de transport electrònic, com és el dinucleòtid NADH/NAD<sup>+</sup>.

És interessant remarcar que el citocrom P<sub>450</sub> és capaç d'hidroxilar molts hidrocarburs diferents, però no pot hidroxilar al metà. En tots els casos cal trencar un enllaç C-H, però l'energia de dissociació disminueix a mesura que augmenta la substitució, CH<sub>4</sub> > CH<sub>3</sub>CH<sub>3</sub> > CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> > CH(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.<sup>20</sup> És a dir que de tots els hidrocarburs el que presenta un enllaç C-H més fort és el metà, i és el que requereix un enzim específic per hidroxilar-lo.

En qualsevol reacció enzimàtica cal que almenys un dels reactius interaccioni amb l'enzim. En aquest cas, és la molècula d'oxigen la que interacciona amb l'enzim, s'activa i llavors és quan pot reaccionar amb el metà. Per tant, a l'igual que en el citocrom P<sub>450</sub> cal un enzim que tingui afinitat per coordinar el O<sub>2</sub>. En aquest cas, el centre actiu de la MMO és similar al centre actiu de la proteïna de transport d'oxigen hemeritina (Hr). És a dir que és un centre dinuclear, amb dos ions Fe units per almenys un lligand carboxilat en forma μ<sub>1,3</sub> (cada O unit a un Fe). Per poder coordinar al O<sub>2</sub> cal que siguin ions Fe<sup>II</sup>, amb una configuració electrònica d'espín alt, com en la Hr, i cal també que hi hagi una posició vacant o làbil per on coordinar-se el O<sub>2</sub>.

Cada ió ferro té coordinat un lligand histidina (N-His) i un carboxilat monodentat (Glu-CO<sub>2</sub><sup>-</sup>). A més un dels ions Fe té coordinat un altre carboxilat, que actua com a lligand bidentat i com a pont: un dels àtoms d'oxigen està coordinat al Fe, i l'altre oxigen està actuant de pont entre els dos ions Fe (pont tipus μ<sub>1,1</sub>). Les altres posicions de coordinació estaran ocupades per molècules d'aigua, sense descartar que hi pugui haver algun altre lligand pont tipus OH (Figura 8.5).<sup>21</sup> Inicialment l'enzim en la seva forma oxidada, Fe<sup>III</sup>...Fe<sup>III</sup> té un acoblament AF fort mentre que quan es redueix l'acoblament magnètic és ferromagnètic (F). És a dir que en ambdós casos els ions ferro tenen configuració electrònica d'espín alt però en la forma oxidada inicial l'estat fonamental d'espín és S<sub>T</sub> = 0, mentre que en la forma activa en que coordina al O<sub>2</sub>, la reduïda, és S<sub>T</sub> = 4. La diferència en el grau d'acoblament és deguda als lligands pont; en la forma oxidada el cor central és [Fe<sub>2</sub>(μ-OH)<sub>2</sub>(μ<sub>1,3</sub>-RCO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.



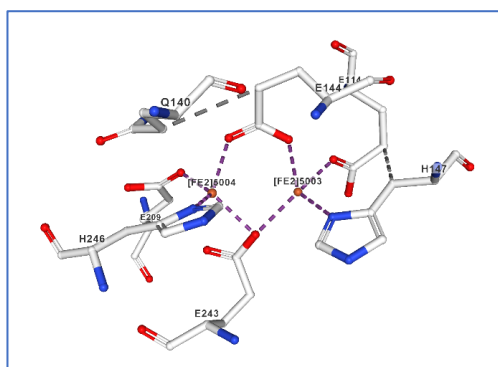


Figura 8.5 Estructura del centre actiu d'una MMO soluble. No es mostren els lligands  $H_2O$  o possibles lligands pont OH (Codi PDB: 1FYZ).

El mecanisme per aquest enzim encara no està del tot clar, hi ha algunes evidències que indiquen que es forma un intermedi  $[Fe^{III}_2(O_2)]$  però no es té informació suficient com per saber el mode de coordinació del grup peroxo, si està actuant com a lligand monodentat o be com a lligand pont. Es proposa que passa per un intermedi on els ions  $Fe^{III}$  s'oxiden a  $Fe^{IV}$  i seria aquesta espècie la que donaria la inserció de l'oxigen al metà, però no està clar si el mecanisme és via radicalària com en el cit  $P_{450}$  o no. El  $Fe^{IV}$  estaria estabilitzat gràcies als lligands carboxilat que aporten densitat electrònica al centre metàl·lic (Figura 8.6).

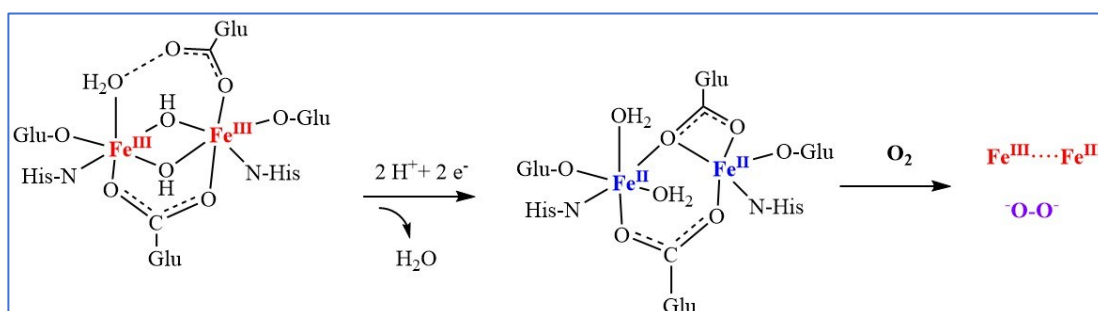


Figura 8.6 Esquema del centre actiu en la forma oxidada i la reduïda de la MMO.<sup>21</sup>

### Tirosinasa (Ty)

La tirosinasa és una monooxigenasa que té un centre actiu similar al de l'hemocianina (Hc), o sigui un centre dinuclear de coure. La tirosinasa es troba en pràcticament tots els éssers vius, en els que catalitza dos reaccions fonamentals: per una banda catalitza la hidroxilació de la tirosina (L-tirosina) convertint-la en L-dopa (3,4-hidroxifenil alanina); per altra banda també catalitza l'oxidació de la L-dopa a dopaquinona (Figura 8.7). La L-dopa és un precursor de diferents neurotransmissors, com la dopamina i l'adrenalina.

L'oxidació de la L-dopa a la dopaquinona inicia el procés d'enfosquiment de fruites i vegetals, així com la polimerització d'aquesta quinona que dona lloc a la síntesi de la melanina, responsable de la pigmentació de la pell.

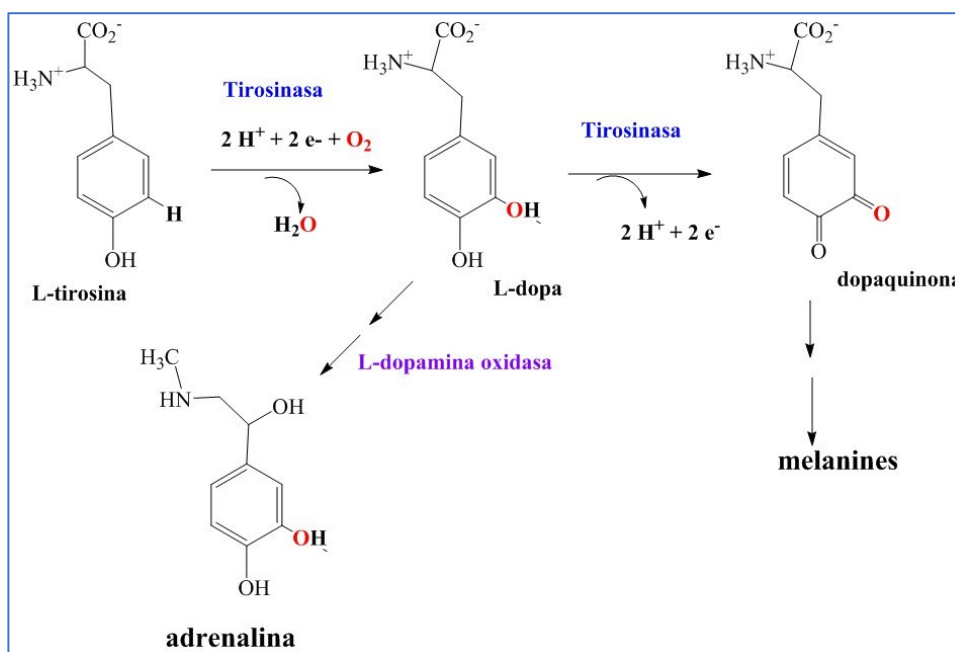


Figura 8.7 Reaccions catalitzades per la tirosinasa i productes derivats de gran rellevància.

A l'igual que en les altres monooxigenases per activar i trencar la molècula d'oxigen cal aportar al centre actiu dos electrons i dos protons. Un dels àtoms d'oxigen s'insereix en l'enllaç C-H de la tirosina i l'altra forma aigua. Per poder trencar l'enllaç O=O cal aportar electrons als orbitals  $\pi^*$  i  $\sigma^*$ , pel que cal que els ions coure estiguin en estat d'oxidació baix (ric en electrons). Així doncs, a l'igual que s'ha comentat per la proteïna de transport d'oxigen Hc, la molècula d'oxigen es coordinarà quan el centre actiu estigui en la forma reduïda  $\text{Cu}^1 \cdots \text{Cu}^1$ .

En la forma reduïda els ions  $\text{Cu}^1$  tenen tres N-His coordinades i no hi ha lligands pont. El mecanisme que es proposa és que la molècula d'oxigen es coordina de la mateixa forma que en la Hc, o sigui com a lligand peroxo bis-bidentat; els electrons que ha guanyat la molècula d'oxigen provenen de l'oxidació dels ions  $\text{Cu}^1$  a  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .

En la Figura 8.8 es mostra el mecanisme proposat per aquest enzim. Consta de diferents etapes:

- Coordinació del  $\text{O}_2$  i redistribució d'electrons, de forma similar al que passa en la Hc.
- Coordinació de la tirosina (Tyr-OH) a un dels ions  $\text{Cu}^{\text{II}}$ . En coordinar-se es desprotona i actua com a lligand aniónic monodentat.
- La coordinació del substrat tipus fenolat provoca un canvi conformacional que situa l'enllaç C-H on s'ha d'insertar el "O" proper al lligand peroxo pont.
- Interacció entre el lligand pont peroxo i l'enllaç C-H del substrat, de forma que es trenca l'enllaç O-O formant-se un pont fenoxo i un pont hidroxu. Els ions coure segueixen sent  $\text{Cu}^{\text{II}}$ .
- A partir d'aquí pot donar dues reaccions:
  - \* protonació i descoordinació del catecolat que s'ha format, per donar la L-dopa.
  - \* o be pot haver-hi una redistribució electrònica reduint-se els ions  $\text{Cu}^{\text{II}}$  a  $\text{Cu}^1$  i oxidant-se el catecolat a quinona.

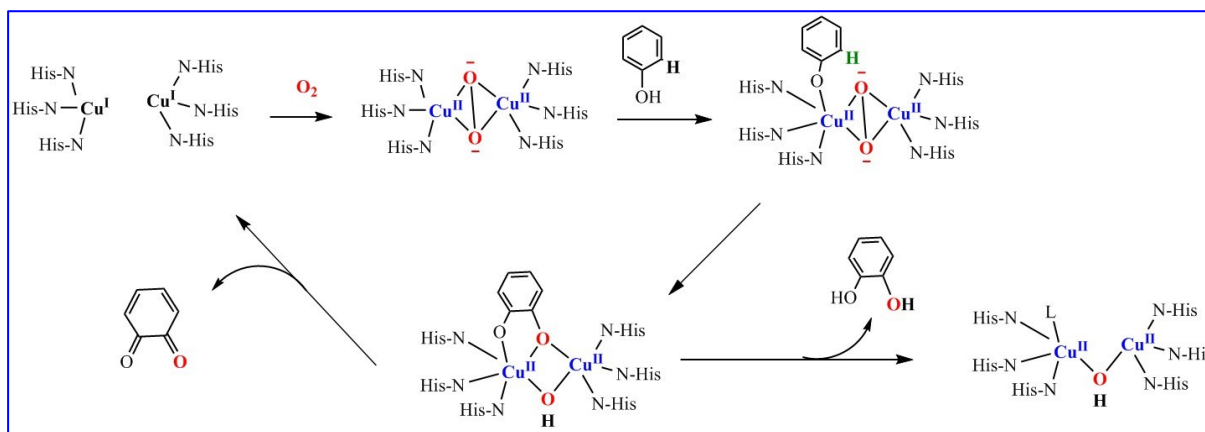


Figura 8.8 Mecanisme proposat per la tirosinasa.<sup>22</sup>

### 8.3 Oxidases Blaves: lacasa (Lac)

Les oxidases són enzims que oxiden un substrat per acció de l'oxigen. A diferència de les oxigenases, en les oxidases no hi ha inserció d'àtoms d'oxigen. Les oxidases es classifiquen segons el tipus de centre actiu, si presenta banda de transferència de càrrega  $S \rightarrow Cu$  (color blau intens) o no:

- oxidases blaves, en les que l'oxigen es redueix a aigua
- oxidases no blaves, en les que la molècula d'oxigen es redueix a peròxid d'hidrogen.

Aquí ens centrarem únicament en les oxidases blaves, que contenen més d'un ió coure en el centre actiu, i més concretament en la lacasa, que va ser la primera oxidasa blava que es va caracteritzar. El seu nom deriva de que es va aïllar de l'arbre de la laca del Japó.

Hi ha altres enzims en aquesta família d'oxidases blaves, com són l'ascorbat oxidasa o la ceruloplasmina, aquesta última és una proteïna que es troba en el plasma sanguini i que conté sis ions coure.

La lacasa és un enzim que s'ha trobat en fongs, plantes, insectes i en alguns bacteris. Catalitza l'oxidació de substrats aromàtics, com els polifenols i poliamines. Té aplicació en camps diversos, per una banda en la indústria paperera, ja que degrada la lignina, però també en altres camps, com és l'alimentari, cosmètica, tèxtil, etc.<sup>23</sup>

La reacció d'oxidació d'un difenol es dona per trencament homolític de l'enllaç O-H, amb el que es genera un radical en el substrat i s'allibera un protó i un electró. Ara bé, la reducció de l'oxigen per formar aigua requereix 4 electrons i 4 protons, pel que la reacció global és que s'oxiden 4 molècules de substrat amb una molècula d'oxigen. Ara bé, el radical format pot desproporcionar regenerant el producte de partida i formant la quinona (Figura 8.9). En altres casos el radical inicia processos de polimerització.

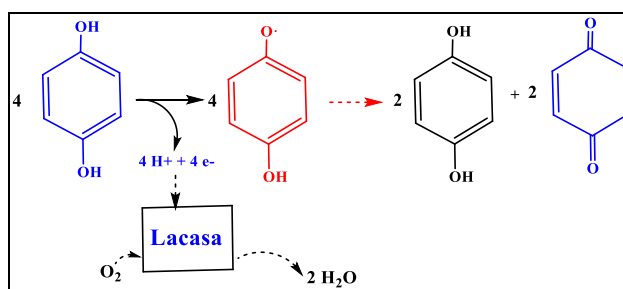


Figura 8.9 Reacció que catalitza l'oxidasa blava lacasa.

El centre actiu de la lacasa està format per 4 ions coure de tres tipus diferents.<sup>23,24</sup>

**Cu tipus 1:** en la forma oxidada té color blau intens i espectre RSE. El color blau correspon a la transferència de càrrega  $S \rightarrow Cu^{II}$  i la presència d'espectre RSE indica que el sistema té un espín  $S = 1/2$ , per tant que aquest ió no està interaccionant amb cap altre centre paramagnètic. La resolució estructural ha permès confirmar la presència de lligands S-donador. El coure té un entorn pla trigonal amb dos N-His i un  $^-S-Cys$ .

**Cu tipus 2:** en la forma oxidada presenta espectre RSE però no té la coloració blava característica de les bandes de transferència de càrrega que apareixen quan hi ha lligands S-donadors. Té un entorn pla trigonal format per dos N-His i un  $OH^-$ .

**Cu tipus 3:** en la forma oxidada no presenta espectre RSE. Aquest tipus de coure correspon a dos ions  $Cu^{II} \cdots Cu^{II}$  que presenten un acoblament AF entre ells, amb el que l'estat fonamental d'espín és  $S_T = 0$  i per això no hi ha espectre RSE. A l'igual que el coure tipus 2, no presenta coloració intensa, el que concorda amb la presència de lligands N-His. Cada ió té tres lligands N-His i entre els dos ions coure hi ha un grup  $OH^-$  actuant com a lligand pont.

Els coures tipus 2 i tipus 3 estan propers, i separats del coure tipus 1. Els potencials de reducció d'aquests centres de coure segueix la següent tendència:  $E^0(Cu \text{ tipus } 1) \sim E^0(Cu \text{ tipus } 2) > E^0(Cu \text{ tipus } 3)$ . Per altra banda, el Cu tipus 1 està proper al punt on arriba el substrat, pel que el mecanisme que es proposa és basa en els diferents potencials i la disposició dels ions en la proteïna:

- El Cu tipus 1 té una funció de transport d'electrons.

- Els Cu tipus 2 i 3 tenen dues funcions: transport d'electrons i centre de reacció amb l'oxigen.

Com ja s'ha comentat per les monooxigenases, per trencar la molècula d'oxigen cal aportar electrons als orbitals  $\pi^*$  i  $\sigma^*$ , per tant cal que els ions metàl·lics del centre actiu estiguin en un estat d'oxidació baix (ric en electrons). En aquest cas, el triangle format pel Cu tipus 2 i els de tipus 3 han d'estar en forma de  $Cu^I$  per poder activar i trencar la molècula d'oxigen (Figura 8.10).

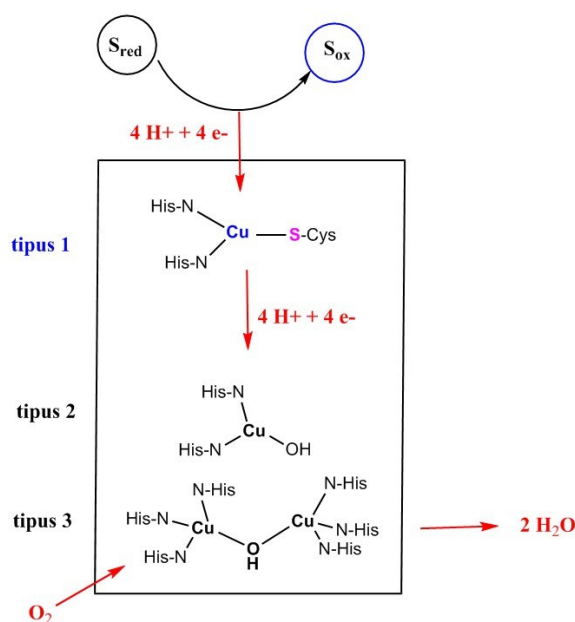


Figura 8.10. transferència d'electrons entre els diferents centres de l'oxidasa lacasa.

Tot i que aquest enzim no catalitza la inserció d'àtoms d'oxigen sí que hi ha la coordinació de la molècula d'oxigen al centre actiu, format pel Cu tipus 2 i els de tipus 3.

## 8.4 Citocrom c oxidasa

La font d'energia pels diferents processos que tenen lloc en les cèl·lules és la molècula de ATP (trifosfat d'adenosina) i la seva reacció d'hidròlisi ( $\text{ATP}^{4-} \rightarrow \text{ADP}^{2-} + \text{HPO}_4^{2-}$ ) que allibera  $\sim 8$  kcal. Ara be, aquesta reacció d'hidròlisi va acoblada a altres processos, de forma que l'energia alliberada no es perd. Hi ha dues vies per les que els diferents organismes utilitzen l'energia de l'entorn per sintetitzar aquesta molècula: la fotosíntesi i la respiració. Aquests dos processos tenen alguns punts en comú, que es comentaran més endavant quan es parli de la fotosíntesi. En aquest capítol ens centrem en el procés de la respiració.

Un 95 % de l'oxigen que respirem es fa servir per generar energia, sintetitzant el ATP, en el procés de respiració cel·lular que té lloc en els mitocondris. En la Figura 8.11 es presenta de forma esquemàtica, un mitocondri. Aquest orgànu té una membrana externa, una interna i la matriu.

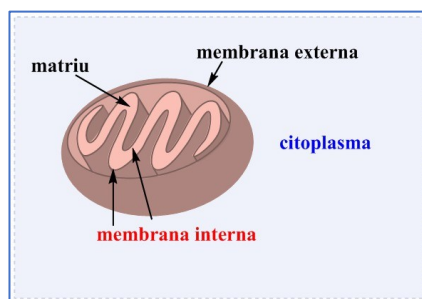


Figura 8.11 Esquema d'un mitocondri.

Els aliments són la nostra font d'energia. Els components dels aliments, proteïnes, greixos i polisacàrids es fragmenten primer en molècules més petites, que després formen l'acetil coenzim A (acetil-CoA) i a continuació en el cicle de l'àcid cítric (o cicle de Krebs) es finalitza l'oxidació formant-se  $\text{CO}_2$ . Tots aquests processos tenen lloc en la matriu mitocondrial. Aquest conjunt de reaccions comporta l'alliberament d'electrons i protons, que van cap a la membrana interna i participen en els processos de membrana; l'etapa final correspon a la reducció de la molècula d'oxigen per formar aigua i el pas de protons a través de la membrana.

Des del punt de vista de la bioinorgànica centrem l'atenció en la membrana interna, que conté un conjunt de proteïnes de membrana que participen en el transport d'electrons cap a la molècula d'oxigen. La Figura 8.12 mostra de forma esquemàtica els diferents conjunts de proteïnes, anomenats complexos, des del I fins al IV que és el que es coneix com citocrom c oxidasa.

La disposició d'aquests grups de proteïnes és important, trobant-se ordenades en funció del seu potencial de reducció, des de les de menor potencial, amb  $E^\circ < 0$  fins a les de  $E^\circ > 0$ .

En el procés de la respiració cel·lular es redueixen de l'ordre de 250 molècules d'oxigen per segon. És a dir que hi ha un flux constant d'electrons des de la matriu cap al complex I i des d'aquí, a través dels sistemes de transport d'electrons, complexos I-III arriba al centre enzimàtic que és la citocrom c oxidasa.

Com es pot veure en la Figura 8.12 el complex I conté dos tipus de proteïnes de transport electrònic Fe-S, de diferent nuclearitat, i per tant diferent  $E^\circ$ . També hi participa un dels nucleòtids amb una base nitrogenada redox (FMN). El complex II conté també un nucleòtid i proteïnes de transport d'electrons, Fe-S i citocroms: dos tipus de proteïnes amb potencials diferents. Els electrons passen a través de quinones que també presenten reacció redox i arriben al complex III. Aquest complex ja té major  $E^\circ$ ;

conté tres citocroms diferents, pel que varia lleugerament el  $E^\circ$  i una proteïna Fe-S de  $E^\circ > 0$ , una ferredoxina que en un dels ions Fe té com a lligands terminals N-Histidina enlloc dels  $^-S-Cys$  (centre de Rieske). El complex III passa els electrons a un altre citocrom, en aquest cas un citocrom c que els transfereix a la citocrom c oxidasa.

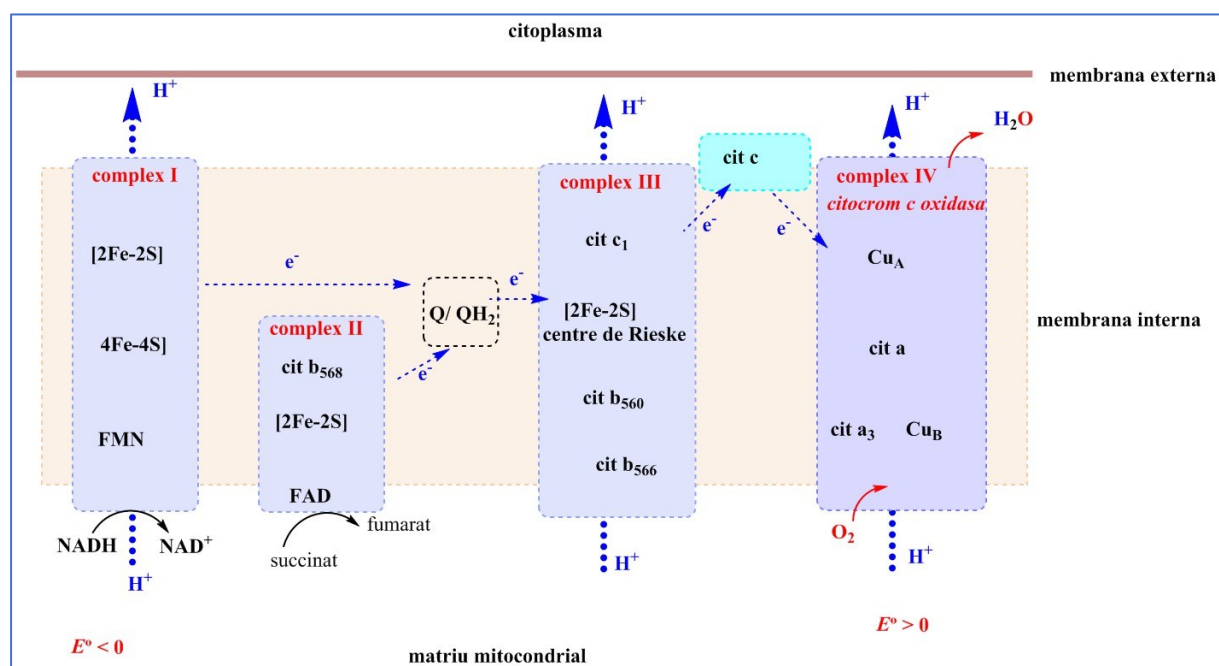


Figura 8.12 Esquema de la membrana mitocondrial interna.

El complex IV rep els electrons del citocrom c, per tant, el complex IV oxida al citocrom c veí. D'aquí ve el nom de citocrom c oxidasa. Mentre els complexos I-III tenen tan sols una funció de transport d'electrons, el complex IV té una funció oxidasa: reducció de l'oxigen a aigua.

La **citocrom c oxidasa** és una proteïna dimèrica, en la que cada subunitat té quatre centres metàl·lics (Figura 8.13).

**Cu<sub>A</sub>**: inicialment es pensava que era un centre mononuclear ja que presenta espectre RSE quan està en la forma oxidada, però en estudiar amb detall l'espectre es va observar que presentava desdoblament hiperfí amb 7 bandes. Tenint en compte que l'espín nuclear del coure és  $I = 3/2$  si fos un sistema mononuclear esperaríem 4 bandes ( $2nI+1$ ). Per tant l'acoblament hiperfí indica que l'electró desaparellat veu dos nuclis de coure, el que indica que és un sistema dinuclear de valència mixta ( $Cu^{II} \cdots Cu^I$ ) deslocalitzada. Que l'electró pugui veure dos nuclis de coure indica que els dos ions metàl·lics estan units a través de lligands pont, i si fossin els dos ions  $Cu^{II}$  no s'observaria espectre RSE ja que hi hauria acoblament magnètic entre ells. La resolució estructural ha demostrat que és un sistema dinuclear amb dos lligands cisteïna pont ( $^-S-cys$ ). Els dos ions coure presenten entorn tetraèdric.

**Cit a**: l'entorn del Fe en aquest citocrom és octaèdric,  $NC = 6$ , i per tant presenta configuració d'espín baix. En la forma oxidada presenta espectre RSE amb una banda a  $g \sim 2$ .

**Cu<sub>B</sub>**: presenta un entorn amb  $NC = 3$  i en la forma oxidada no presenta espectre RSE, el que indica que l'electró desaparellat està acoblat amb alguna altra espècie paramagnètica.

**Cit a<sub>3</sub>**: en aquest citocrom el ferro presenta un  $NC = 5$ . A l'igual que passa amb el  $Cu_B$ , no presenta espectre RSE en la seva forma oxidada, i tampoc en la reduïda. Tant si té configuració electrònica d'espín alt com d'espín baix es podria esperar que donés senyal en RSE. El fet de que no en doni indica que hi ha un acoblament magnètic amb un altre centre paramagnètic.

Tant el  $\text{Cu}_B$  com el citocrom  $a_3$  presenten posicions vacants, i és on té lloc l'activació i trencament de la molècula d'oxigen. Aquests dos centres metàl·lics estan propers, fet que facilita la coordinació de la molècula d'oxigen i la interacció magnètica entre el  $\text{Cu}^{\text{II}} \cdots \text{Fe}^{\text{III}}$ .

A diferència d'aquests dos centres metàl·lics ( $\text{Cu}_B$  i cit  $a_3$ ), el  $\text{Cu}_A$  i el cit  $a$ , tenen totes les posicions de coordinació ocupades, la seva funció és el transport d'electrons i estan relativament separats entre ells.

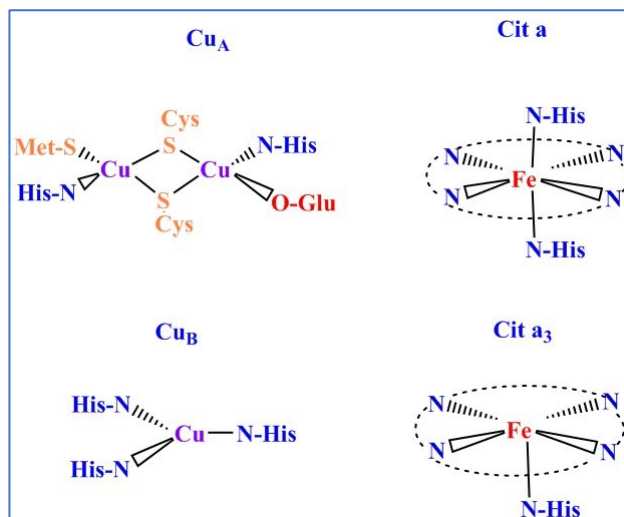


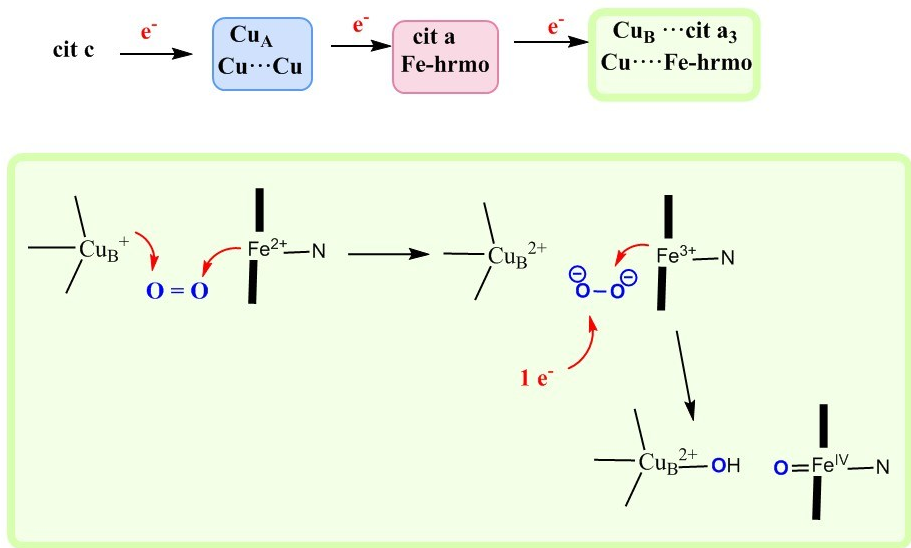
Figura 8.13 Entorn dels diferents centres metàl·lics involucrats en el procés d'activació de la molècula d'oxigen en la citocrom c oxidasa.

El mecanisme que es proposa és que el  $\text{Cu}_A$  que és el que està més proper al citocrom  $c$ , rep els electrons d'aquesta proteïna de transport d'electrons i els transfereix al grup cit  $a$ , que és també una proteïna de transport d'electrons. Els electrons van passant d'un centre a l'altre, amb petites variacions de potencial redox, fins que arriben al centre de reacció  $\text{Cu}_B \cdots \text{Cit } a_3$ . (Figura 8.14).

Quan el centre de reacció té els dos ions en la forma reduïda ( $\text{Cu}^{\text{I}}$  i  $\text{Fe}^{\text{II}}$ ) és quan pot interaccionar amb la molècula de  $\text{O}_2$  i aportar dos electrons als seus orbitals  $\pi^*$  formant-se l'anió peròxid que probablement estarà interaccionant amb els dos centres metàl·lics.

Per trencar l'enllaç  $\sigma$  cal una nova aportació de 2 electrons. En aquest cas es proposa que un electró prové del grup Fe-hemo, en el que s'oxida el  $\text{Fe}^{\text{III}}$  a  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ , mentre que l'altre electró vindrà a través del sistema de transport electrònic:  $\text{Cu}_B$  i cit  $a$ . Un dels àtoms d'oxigen quedarà unit al  $\text{Cu}^{\text{II}}$  i l'altre al  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  en forma de  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ . Aquest estat d'oxidació poc usual del Fe està estabilitzat per les dues càrregues negatives que té l'anell porfirínic.

El trencament de la molècula d'oxigen per formar aigua ( $\text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$ ) requereix de 4 electrons i 4 protons. Els protons i electrons provinents de les reaccions que es donen en la matriu mitocondrial son els que arriben al centre citocrom c oxidasa per donar aquesta reacció.



*Figura 8.14 Mecanisme proposat per la citocrom c oxidasa*



## 9. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA DE NITROGEN

### 9.1 Nitrogenasa

El nitrogen és un element essencial per tots els éssers vius, ja que forma part de proteïnes, àcids nucleics, diferents tipus d'anells aromàtics (grup hemo, sistema B<sub>12</sub>, clorofil·la), etc. En tots aquests sistemes es troba en la forma reduïda, com per exemple en els derivats del amoníac. Ara be, la font natural de nitrogen més abundant és el N<sub>2</sub> que forma part de l'aire (78%), i per convertir-lo en els diferents components biològics cal reduir-lo primer a NH<sub>3</sub>.

La molècula de nitrogen és molt estable i inert, gràcies al triple enllaç que hi ha entre els dos àtoms de nitrogen. En el laboratori la reacció d'obtenció d'amoniac a partir de N<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> ( $N_2 + 3 H_2 \rightarrow 2 NH_3$ ) requereix de condicions enèrgiques, com son pressió i temperatura elevada, així com la presència de catalitzador.

Tot i la gran estabilitat de la molècula de nitrogen hi ha una sèrie de bacteris que són capaços de reduir la molècula de N<sub>2</sub> trencant el triple enllaç present entre els dos àtoms. La reacció que té lloc és:

$N_2 + 6 e^- + 6 H^+ \rightarrow 2 NH_3$  i aquest procés és coneix com la "fixació" del nitrogen.

Hi ha diferents processos involucrats en el cicle biològic del nitrogen (Figura 9.1) que duen a terme diversos tipus de bacteris: un és la fixació del nitrogen (reducció) que s'acaba de comentar, però hi ha altres processos, com són la nitrificació (formació de nitrats), l'assimilació dels nitrats (reducció dels nitrats fins amoníac), la desnitrificació (reducció dels nitrats fins a N<sub>2</sub>).

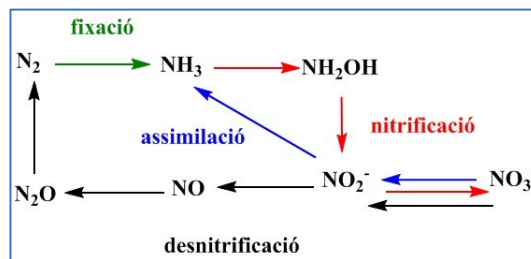


Figura 9.1 Principals processos involucrats en el cicle del nitrogen.

La fixació del nitrogen la realitzen bacteris anaeròbics o aeròbics que es troben confinats en espais on hi ha poc oxigen, per exemple en nòduls en arrels d'algunes plantes. Per aquests bacteris la seva font de nitrogen és directament el N<sub>2</sub> atmosfèric. Hi ha altres bacteris que incorporen el nitrogen a partir de la seva forma oxidada, el nitrat. Així doncs hi ha un conjunt de microorganismes que van transformant el N<sub>2</sub> i els seus derivats, incorporant-lo a les cèl·lules o regenerant el N<sub>2</sub> atmosfèric. D'aquesta forma es tanca el cicle, mantenint-se l'equilibri entre el nitrogen atmosfèric i el nitrogen disponible en sols. El nitrogen dels sols s'incorpora als diferents organismes a través de les plantes.

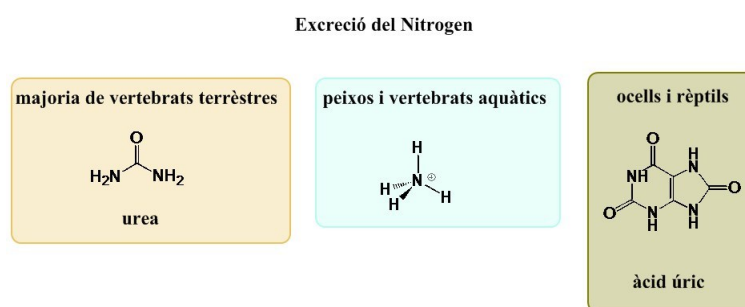
Ara be, aquest cicle del nitrogen pot alterar-se per efectes externs deguts a l'activitat humana. Per una banda, processos industrials en els que hi hagi emissió de gasos nitrogenats (òxids de nitrogen), per altra banda els fertilitzants, que són bàsicament sals amòniques.

Es parla sovint de la contaminació d'aigües per purins. S'anomenen purins als fems líquids, que contenen una barreja de coses: excrements animals, orina, restes de menjar, palla, etc. Com que aquesta barreja és rica en tres dels elements essencials P, N, i K s'utilitza sovint com a fertilitzant. Una part d'aquests purins enriqueix el sol en aquests elements i s'incorporen a les plantes, que és l'objectiu que es pretén en fertilitzar el sol. Ara be, una altra part es perd, arrossegada per aigües de pluja, i va a parar als rius i llacs. Això provoca la proliferació d'espècies vegetals en aquestes aigües, augmenta el

fitoplàncton, que consumeix oxigen dissolt a l'aigua. La disminució de l'oxigen dissolt en l'aigua de rius i llacs afecta a la vida animal.

Les espècies animals incorporem el nitrogen a través de la dieta. El metabolisme, conjunt de reaccions que tenen lloc en l'organisme, es divideix en dos grups. El catabolisme engloba les reaccions que tenen lloc per degradar les biomolècules procedents dels aliments, per oxidació amb l'oxigen. És un procés que allibera energia. En canvi l'anabolisme, és un procés que requereix energia, ja que és el conjunt de reaccions que porta a la síntesi de les noves biomolècules.

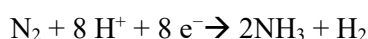
El procés de degradació dels diferents lligands biològics que contenen nitrogen acaba generant ions amoni. Ara be, l'eliminació del catió  $\text{NH}_4^+$  de l'organisme es fa de diferents formes segons de quina espècie es tracti. En la majoria de vertebrats terrestres s'elimina en forma d'urea,  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , mentre que en peixos i altres vertebrats aquàtics s'elimina directament com a ió amoni. Els ocells i rèptils eliminen el nitrogen en forma d'àcid úric. (Figura 9.2)



*Figura 9.2 Diferents formes d'excreció del nitrogen.*

El grup de bacteris capaços de fixar el nitrogen és força ampli, no obstant tenen en comú el fet de tenir l'enzim nitrogenasa, responsable de la reacció de fixació del nitrogen. Com ja s'ha comentat abans, la reacció de reducció del  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  requereix de 6 electrons i 6  $\text{H}^+$ , per tant, a l'igual que en la citocrom c oxidasa, hi haurà uns grups o proteïnes que participaran en el transport d'electrons i un altre centre que serà on es donarà la reacció de trencament de la molècula de  $\text{N}_2$  o activació d'aquesta molècula.

Ara be, la nitrogenasa també dona la formació d'hidrogen (funció hidrogenasa):  $2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ , així que la reacció global que catalitza la nitrogenasa és:



i aquest procés consumeix 16 molècules d'ATP, que s'hidrolitzen.

Hi ha diferents tipus de nitrogenases, essent la nitrogenasa Fe-Mo la més estudiada. Aquest enzim consta de diferents clústers metàl·lics (Figura 9.3):

\* **Proteïna de de Fe:** és una proteïna de transport d'electrons del tipus [4Fe-4S] de baix potencial ( $E^\circ < 0$ ) que no presenta espectre RSE en la forma oxidada.

\* **Proteïna FeMo:** consta de dos clústers,

- **cúmulo P** que és una proteïna Fe-S que conté el grup [8Fe-7S], que es pot visualitzar com la fusió de dos cubs compartint un vèrtex, i que pot acumular fins a 8 electrons.

- **cofactor FeMo** que és el centre de reacció. Aquest centre consisteix en un clúster  $[\text{Fe}_7\text{S}_9\text{CMo}]$ , que es pot veure com una combinació de dos cubs. Per una banda hi ha el fragment  $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$  que amb el Fe terminal està ancorat a la proteïna a través d'un sofre de cisteïna ( $^-S\text{-cys}$ ). Per l'altre banda hi ha un fragment  $[\text{Fe}_3\text{S}_3\text{Mo}]$ , ancorat a la proteïna pel N-His coordinat al molibdè, i aquest metall té també coordinat, en forma bidentada, un lligand homocitrat. En la part central del clúster coFeMo hi ha la

cavitat creada per tres Fe de cada grup i tres  $S^{2-}$  que actuen de pont entre ells. Recentment s'ha trobat que en aquesta cavitat hi ha també un carboni intersticial, en realitat en forma de carbur que està actuant de pont. El molibdè es troba en estat d'oxidació III, mentre que els ions ferro una part té estat d'oxidació II i l'altre III. Així doncs, el clúster del cofactor FeMo és  $[Fe^{II}_3Fe^{III}_4Mo^{III}S_9C]^{-1}$ .<sup>25</sup>

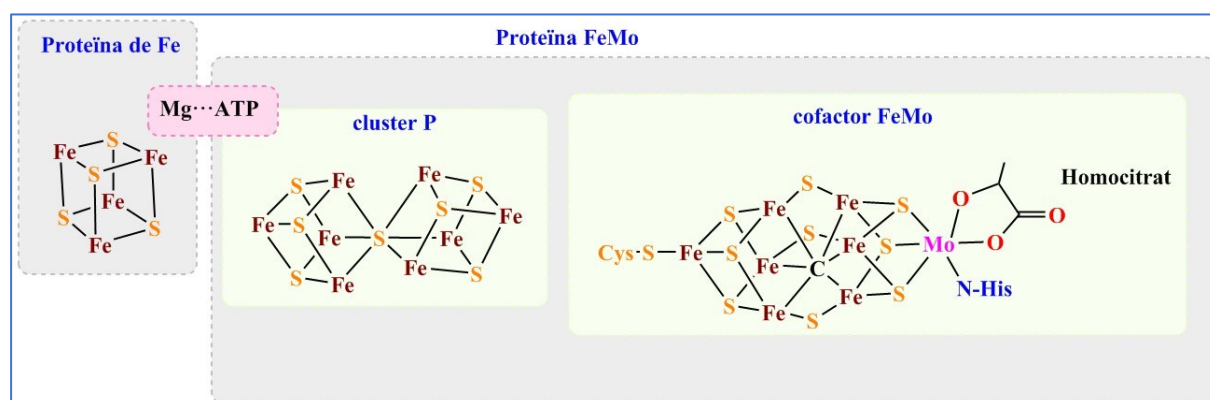


Figura 9.3 Centres que formen part de la nitrogenasa FeMo.

Entre la proteïna de Fe i el cúmulo P hi ha un ió Mg, que pot interaccionar amb la molècula d'ATP. Quan la proteïna de Fe ( $[4Fe-4S]$ ) s'oxida hi ha un lleuger canvi estructural que provoca la interacció del  $Mg^{2+}$  amb l'ATP; aquesta interacció afavoreix la hidròlisi del ATP. Aquesta reacció comporta un altre petit canvi estructural que afavoreix la transferència d'un electró des de la proteïna de Fe al cúmulo P. Quan el cúmulo P ha rebut 8 electrons i està tot en la forma reduïda (tots els ions ferro com  $Fe^{II}$ ) comença la transferència dels electrons al centre de reacció, el cofactor FeMo.

Per trencar la molècula de nitrogen cal aportar electrons als orbitals  $\pi^*$  i  $\sigma^*$ , per tant, a l'igual que quan s'activa la molècula d'oxigen, cal que els ions metàl·lics amb els que interacciona aquesta molècula siguin rics en densitat electrònica, o sigui que han d'estar en estat d'oxidació baix ( $Fe^{II}$ ). De totes formes, el mecanisme pel que es dona el procés encara no està clar.

Com ja s'ha comentat en el cofactor FeMo tenen lloc dos processos, el trencament de la molècula de  $N_2$  i la formació de la molècula de  $H_2$ . En alguns dels estudis realitzats s'havia vist que aquests dos processos són independents. L'estudi de la nitrogenasa és difícil ja que és molt sensible a l'oxigen. Això és lògic ja que tant la molècula de  $N_2$  com la de  $O_2$  poden actuar com lligands  $\pi$ -àcid i per tant ocupar les mateixes posicions de coordinació en el centre actiu.

El punt d'interacció del  $N_2$  sembla que pot ser en la cavitat central, on hi ha els 6  $Fe^{n+}$  i els  $S^{2-}$  i  $C^{4-}$  pont. Probablement la molècula de  $N_2$  en el procés de reducció passi per diferents estats:  $N_2$ ,  $N_2H_2$ ,  $N_2H_4$  i finalment 2  $NH_3$ . El trencament dels enllaços  $\pi$  pot donar-se per transferència d'electrons dels orbitals  $d$  dels ions  $Fe^{II}$  de la cavitat als orbitals  $\pi^*$  del  $N_2$  (Figura 9.4). Al llarg del procés pot haver-hi protonació dels lligands pont de la cavitat ( $S^{2-}$  i  $C^{4-}$ ).<sup>26</sup>

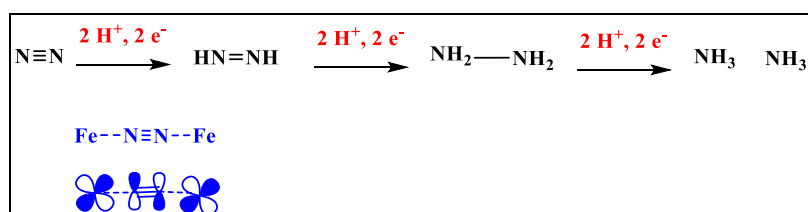
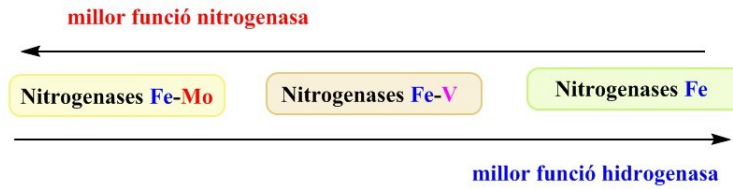


Figura 9.4 Etapes de reducció de la molècula de nitrogen.

El paper del molibdè tampoc està massa clar. S'han trobat diferents tipus de nitrogenases, en les que canvia aquest ió metàl·lic. Les més estudiades són les de Fe-Mo, però n'hi ha que contenen vanadi, nitrogenases Fe-V i altres en les que tots els ions són Fe, nitrogenases de Fe. Els tres tipus de nitrogenases presenten les dues funcions: nitrogenasa i hidrogenasa, però les de Fe-Mo tenen millor activitat nitrogenasa que les de Fe i aquestes són les que tenen millor funció hidrogenasa (Figura 9.5).



*Figura 9.5 Diferents tipus de nitrogenases segons els metalls presents en el centre actiu.*

## 10. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'HIDRÒGEN

### 10.1 Hidrogenases

Hi ha una sèrie de microorganismes que utilitzen els protons com a agent acceptor d'electrons per donar lloc a la formació de la molècula d'hidrogen, com s'ha vist en l'enzim nitrogenasa. Altres organismes donen la reacció inversa, utilitzen l'hidrogen ( $H_2$ ) com agent reductor. La majoria d'organismes que utilitzen o generen  $H_2$  son procariotes anaeròbics, tot i que hi ha algunes espècies aeròbiques que utilitzen la molècula d'hidrogen.

En general els sistemes aeròbics utilitzen el  $H_2$  com agent reductor ( $H_2 \rightarrow 2 H^+ + 2 e^-$ ) mentre que els organismes anaeròbics poden donar els dos processos: utilització del  $H_2$  com agent reductor o formació del  $H_2$  ( $H_2 \rightleftharpoons 2 H^+ + 2 e^-$ ).

L'enzim responsable de la reacció de formació i/o utilització del  $H_2$  és la hidrogenasa. Aquest enzim es considera que és dels més primitius a nivell evolutiu.

Les hidrogenases es poden trobar en membranes o be en el citosol, solubles. Hi ha organismes que tenen més d'un tipus d'hidrogenases. En tots els casos la funció hidrogenasa va associada a un altre procés redox, com en el cas de la nitrogenasa (conversió de  $N_2$  a  $NH_3$ ), o be altres processos de reducció com són: el pas de  $CO_2$  a  $CH_4$ , el de  $SO_4^{2-}$  a  $S^{2-}$  o el de  $O_2$  a  $H_2O$ .

Per tant, les hidrogenases estan involucrades en diversos processos biològics com son:

- Fixació del nitrogen.
- Fosforilació microbiana.
- Fermentació per generar metà.
- Regulació del gradient de  $H^+$ .

La majoria d'hidrogenases contenen clústers Fe-S i es classifiquen en funció dels ions metàl·lics que formen el centre de reacció: Ni-Fe o Fe-Fe, sent les Ni-Fe les més freqüents i les més estudiades ja que son menys sensibles a l'oxigen. A més, en el grup de les hidrogenases Ni-Fe és distingeix el subgrup de les que contenen selenocisteïna (SeCys), en que aquest aminoàcid substitueix a la cisteïna, son les hidrogenases Ni-Fe-Se.

A l'igual que en els altres sistemes dels que s'ha parlat, en ser un enzim redox cal un sistema de transport d'electrons, que com ja hem dit son proteïnes Fe-S. Poden contenir diferents proteïnes d'aquest tipus, amb potencials de reducció lleugerament diferents, el que permet la transferència d'electrons entre els dos sistemes enzimàtics redox associats. Per exemple la de *desulfovibrio gigas* conté 1 clúster [3Fe-4S] ( $E^0 = -0,70$  V), i dos clústers [4Fe-4S] ( $E^0 = -0,29$  V i  $-0,34$  V).<sup>27</sup>

El centre actiu d'aquests enzims conté els ions Ni i Fe units a través de dos lligands pont Cys-S<sup>-</sup>. Hi ha una forma oxidada d'aquest enzim que no presenta activitat catalítica, (forma A) en que el níquel està en la seva forma oxidada, Ni<sup>III</sup> i hi ha un altre lligand pont oxo-derivat, que pot ser un grup <sup>-</sup>OH o HO<sub>2</sub><sup>-</sup>. El Fe completa la seva coordinació amb dos Cys-S<sup>-</sup> mentre que el Ni la completa amb lligands CO i CN<sup>-</sup>) (Figura 10.1). El Fe es troba en estat d'oxidació II i té configuració electrònica d'espín baix. El Ni és el metall involucrat en el procés redox. L'espècia activa és la forma reduïda Ni<sup>II</sup>.<sup>28,29</sup>

Les hidrogenases son sensibles a l'oxigen i en presència d'aquesta molècula o d'algun altre agent oxidant fort, l'espècia activa (B) s'oxida per donar l'espècia A (oxidada) que no és activa. El fet de que aquest enzim sigui sensible a l'oxigen dificulta el seu estudi, però també el fet de que el Ni<sup>II</sup> en ser un ió  $d^8$  no presenta espectre RSE, en canvi quan és Ni<sup>I</sup> o Ni<sup>III</sup> sí que en presenta.

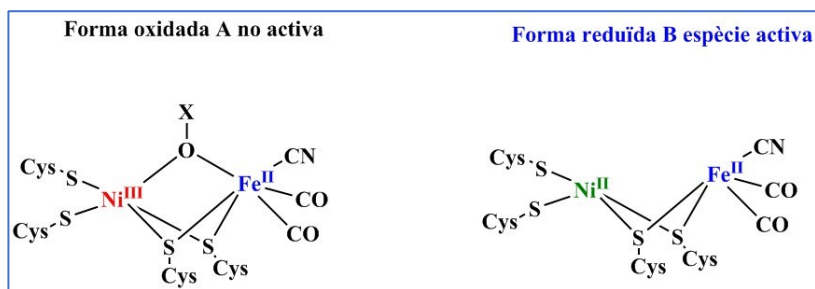


Figura 10.1 Centre actiu de les hidrogenases Fe-Ni.

El mecanisme del cicle catalític  $\text{H}_2 \rightleftharpoons 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$  encara no està clar. Es proposa que el trencament de l'enllaç H-H ve propiciat per la interacció d'un dels àtoms d'hidrogen amb els ions metàl·lics de l'espècie B ( $\text{Ni}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$ ) i la interacció de l'altre àtom d'hidrogen amb un grup bàsic, que pot ser un lligand  $\text{Cys-S}^-$  terminal o algun altre aminoàcid amb caràcter bàsic (amb un parell electrons solitari). Aquesta interacció amb un grup àcid, per una banda, i un grup bàsic, per l'altre, polaritza l'enllaç H-H afavorint el trencament per donar  $\text{H}^+$  (que quedarà unit a la base) i  $\text{H}^-$  que actuarà com a lligand pont. No està clar si l'espècie amb lligand hidrur és de  $\text{Ni}^{\text{II}}$  o  $\text{Ni}^{\text{III}}$  o si passa per les dues formes (Figura 10.2).<sup>29,30</sup>

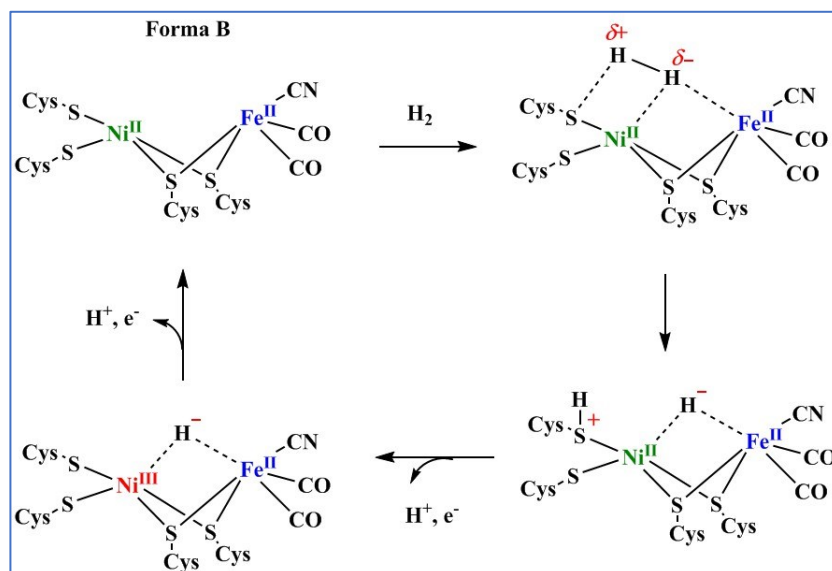
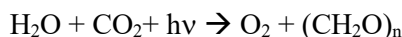


Figura 10.2 Possible via d'interacció del  $\text{H}_2$  amb el centre actiu de les hidrogenases.

## 11. ACTIVACIÓ DE LA MOLÈCULA D'AIGUA PER FORMAR OXIGEN

### 11.1 Fotosíntesi

La fotosíntesi és un procés fotoquímic que té lloc en plantes, algues i cianobacteris. Aquest procés consisteix en que per acció de la llum fixen el  $\text{CO}_2$ , reduint-lo per formar els polisacàrids, i en el procés se sintetitzen molècules reserva d'energia com són el ATP i el NADPH. És a dir que en el procés de la fotosíntesi es converteix l'energia solar en energia química. En molts organismes fotosintètics l'agent reductor del  $\text{CO}_2$  és l'aigua que s'oxida a  $\text{O}_2$ .



Ara bé, no sempre és així. Hi pot haver el procés de la fotosíntesi sense que es generi oxigen. Això passa quan l'agent reductor és una altra espècie diferent a l'aigua, com pot ser el  $\text{H}_2\text{S}$  que s'oxida a sofre.

El procés de la fotosíntesi en realitat consta de dos processos: el que depèn de la llum, que és l'oxidació de l'aigua, i el que no requereix de la radiació solar, tot i que s'accelera en presència de llum, que és la fixació i reducció del  $\text{CO}_2$  (cicle de Calvin).

En les cèl·lules dels organismes fotosintètics hi ha uns orgànuls anomenats cloroplasts que tenen una membrana plegada al seu interior, anomenada membrana tilacoïdal; els plecs que forma, una mena de discos plans, reben el nom de tilacoïdes. És en el tilacoïdes on té lloc l'oxidació de l'aigua, la reacció que requereix de la radiació. El fluid que hi ha al voltant dels tilacoïdes s'anomena estroma i és on es dona la reducció del  $\text{CO}_2$  i les reaccions del cicle de Calvin. En l'interior dels tilacoïdes hi ha el lumen (Figura 11.1).

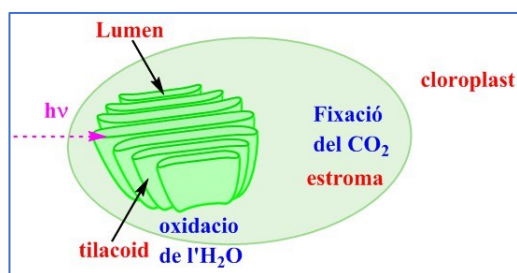


Figura 11.1 Esquema dels components d'un cloroplast.

Des del punt de vista de la bioinorgànica el que interessa és el conjunt de processos que es donen per efecte de la radiació solar, i que tenen lloc en els tilacoïdes. En realitat hi ha dos punts claus a remarcar:

- Efecte de la radiació solar sobre els tilacoïdes i les proteïnes i grups que es troben en aquesta membrana.
- Quina relació té la incidència de la radiació solar sobre el sistema fotosintètic i l'oxidació de l'aigua.

En aquest apartat es comentarà el primer punt, és a dir, l'efecte de la radiació solar, i els diferents components del sistema fotosintètic, mentre que en l'apartat següent es comentarà la informació més rellevant sobre el centre d'oxidació de l'aigua.

Les plantes i en general els diferents organismes fotosintètics converteixen l'energia solar en energia química, per tant, la captura de radiació ha de ser el més eficaç possible. O sigui que disposen d'un conjunt de pigments que absorbeixen radiació de diferent energia, per tal de cobrir tot l'espectre visible i que no es perdi part de la radiació solar incident.

## Clorofil·la

La clorofil·la és un dels pigments fonamentals en el procés de la fotosíntesi. Aquesta proteïna conté un lligand macrocicle derivat de la porfirina, anomenat clorina, que té un ió  $Mg^{2+}$  unit als 4 àtoms de nitrogen (Figura 11.2). La coordinació octaèdrica del  $Mg^{2+}$  es completa amb un N-His de la cadena de proteïna, i una molècula d'aigua. Els substituents que hi ha en l'anell modifiquen lleugerament el seu espectre visible. Un d'aquests substituents és una cadena de fitol. Hi ha tres tipus de clorofil·les: a, b, bacterioclorofil·la. Totes elles presenten dues bandes en l'espectre visible, una en la regió entre 400-500 nm i l'altra entre 600-700 nm. És a dir que absorbeixen en la regió del blau i en la regió del vermell. Per això el color que veiem en les plantes riques en clorofil·la és el verd-groc, la radiació no absorbida.

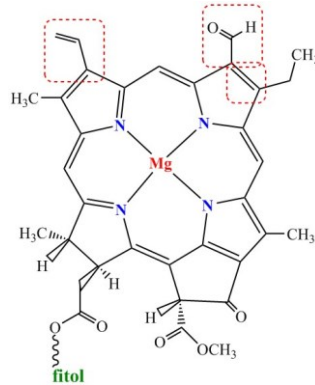


Figura 11.2 Anell macrocicle de la clorofil·la b. En vermell s'indiquen les zones de l'anell que canvien segons el tipus de clorofil·la (a, b o de bacteris).

La molècula d'aigua en una de les posicions axials juga un paper clau en la disposició dels anells de les diferents molècules de clorofil·la, ja que pot formar enllaços per pont d'hidrogen amb el grup C=O que hi ha en l'anell. Degut a aquesta interacció les molècules de clorofil·la es disposen de forma esglaonada, com es mostra en la Figura 11.3 de forma que totes elles poden actuar com a receptors de la llum.

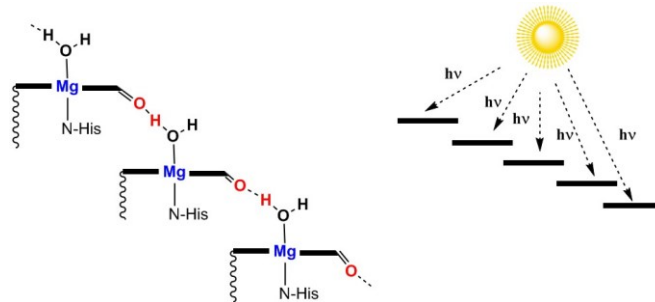


Figura 11.3 Apilament de les molècules de clorofil·la.

En medi àcid el lligand macrocicle es protona (dos dels N de l'anell) i l'ió  $Mg^{2+}$  es descoordina. Aquesta molècula que ha perdut el catió metàl·lic s'anomena feofitina i presenta un color lleugerament diferent: un color verd més apagat, menys brillant, tirant a caqui. És el que passa quan alguns vegetals perden el seu color verd característic. Canvia lleugerament l'energia dels orbitals  $\pi$  i  $\pi^*$  i per tant l'energia de la transició.

Hi ha un colorant alimentari, la clorofil·lina, que s'utilitza per donar o potenciar el color verd. És un derivat de la clorofil·la en la que s'ha substituït el  $Mg^{2+}$  per  $Cu^{2+}$  i en el procés perd també la cadena de fitol. El complex amb coure és més estable i és més soluble en aigua que la clorofil·la. Els metalls de transició, com és el cas del  $Cu^{2+}$  tenen tendència a formar complexos, i presenten l'energia



d'estabilització del camp cristal·lí creat pels lligands. Per això és més estable el complex amb un catió metàl·lic de transició (orbitals  $d$  parcialment ocupats) que amb cations metàl·lics del bloc  $s$  o  $p$ .

En llibres antics de cuina es recomanava bullir els pèsols en recipients de coure. Probablement havien observat que el color que adquiria aquest aliment era més bonic, degut a la substitució del magnesi pel coure. Tot i que el  $\text{Cu}$  té un potencial de reducció  $E^\circ(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu})$  positiu, i per tant no s'oxida fàcilment, el fet de poder formar complexos molt estables amb el lligand clorina disminueix el seu potencial de reducció.

Tot i que el pigment fonamental per la fotosíntesi és la clorofil·la, per afavorir la captació del màxim de radiació solar possible, les plantes tenen també altres pigments que absorbeixen radiació visible de diferents longituds d'ona. Aquests pigments tenen en comú el fet de presentar un important sistema  $\pi$  i per tant presenten transicions entre orbitals  $\pi \rightarrow \pi^*$  que absorbeixen radiació visible.

Un d'aquests pigments són els carotens, que absorbeixen entre 400-500 nm (regió del blau-verd). Altres pigments, com la ficocianina absorbeix entre 600-700 nm (taronja-vermell) o la ficoeritrina entre 500-600 nm (groc-taronja). Entre tots ells cobreixen l'espectre visible. Quan a la tardor les clorofil·les descomponen, que ho fan abans que els carotens, s'observa essencialment aquest pigment, que com que absorbeix radiació entre el blau i el verd, es veu el color complementari, groc-taronja.

Tots aquests pigments, juntament amb una sèrie de molècules de clorofil·la que fan d'antena, capten la llum solar i transmeten l'energia fins al centre de reacció. Quan la radiació incideix sobre una molècula de pigment es pot excitar un electró i després:

- Pot desexcitar-se emeten radiació, i aquesta radiació emesa excita l'electró de la molècula veïna.
- O be pot desexcitar-se passant a un estat excitat, de menor energia, de la molècula veïna.

Un esquema d'aquests dos processos es mostra en la Figura 11.4. Això genera un flux d'electrons i/o radiació cap al centre de reacció.

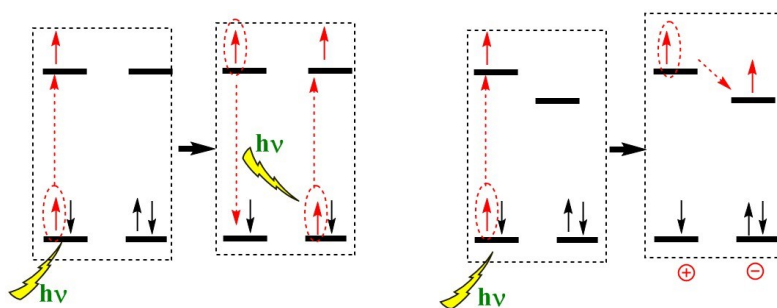


Figura 11.4 Efecte de la radiació sobre els pigments fotosintètics.

En la membrana tilacoidal hi ha dos fotosistemes, FSII i FSI que són els receptors de la radiació solar. En tots dos hi ha dues clorofil·les, amb una longitud d'ona d'absorció lleugerament diferent: en el FSII el receptor se'l coneix com  $P_{680}$  mentre que el del FSI és el  $P_{700}$ . Aquests dos fotosistemes estan separats per un conjunt de proteïnes i molècules de transport d'electrons. En el FSII es dona la reacció d'oxidació de l'aigua i en el FSI la reducció del  $\text{NADP}^+$ . El  $\text{NADPH}$  i el  $\text{ATP}$  sintetitzats participen després en la reducció del  $\text{CO}_2$ . Per tant, els electrons alliberats en oxidar-se l'aigua són els que arriben fins al  $\text{CO}_2$  en el FSI (Figura 11.5).

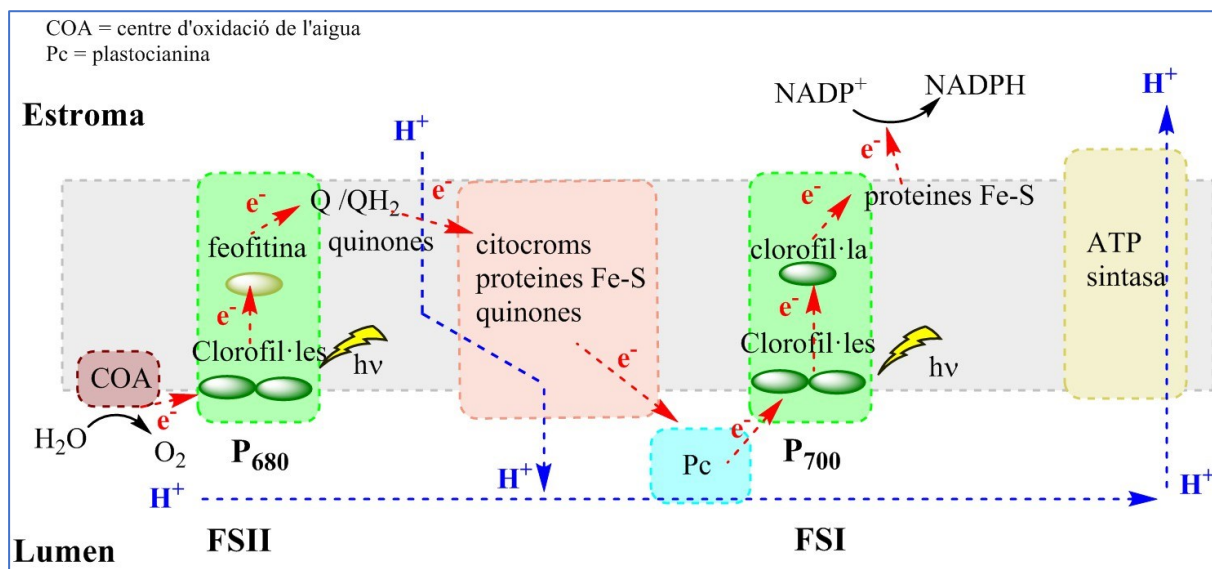


Figura 11.5 Esquema de la membrana mitocondrial en el que es poden veure els dos fotosistemes i el flux d'electrons i protons en el procés de la fotosíntesi de les plantes verdes. (COA = centre d'oxidació de l'aigua, Pc = plastocianina).

En el FSI la radiació solar excita un electró en les clorofil·les que es transfereix a la molècula veïna, una nova clorofil·la, i a través d'un sistema de transport d'electrons (quinones i diverses proteïnes Fe-S) arriba al  $\text{NADP}^+$  donant-se la seva reducció.

Les clorofil·les del FSI que s'han oxidat es regeneren a partir dels electrons provinents del FSII. El procés en el FSII és similar al que es dona en el FSI. En primer lloc hi ha l'excitació dels electrons de les clorofil·les i la seva transferència a una molècula veïna. En aquest cas és una feofitina, és a dir una clorofil·la sense l'ió  $\text{Mg}^{2+}$  al centre. Això vol dir que el lligand està protonat i no té les dues càrregues negatives; aquest fet pot ser rellevant per explicar la major afinitat per captar els electrons provinents de la clorofil·la excitada. A continuació els electrons van passant per un sistema de transport d'electrons, que inclou quinones, citocroms i proteïnes Fe-S. Al final d'aquesta cadena de transport d'electrons hi ha una altra proteïna de transport electrònic, en aquest cas de coure, la plastocianina (Pc). I des d'aquí els electrons arriben a la clorofil·la del FSI per regenerar-la.

És interessant remarcar que mentre a la membrana mitocondrial el sistema de transport d'electrons són quinones, citocroms i proteïnes Fe-S, en la membrana tilacoide, a més d'aquestes molècules i proteïnes hi ha la proteïna de coure plastocianina.

Per últim, per regenerar les clorofil·les del FSII es requereixen electrons que provenen de l'oxidació de l'aigua; aquest procés té lloc en el que s'anomena *centre d'oxidació de l'aigua* (COA) o *centre d'alliberament d'oxigen* (OEC en anglès). Entre el COA i les clorofil·les del FSII hi ha una tirosina que participa en el transport electrònic. La tirosina, que té el grup fenol (Tyr-OH), pot donar reacció redox per trencament homolític de l'enllaç O-H:



La presència del radical  $\text{Ty-O}\cdot$  s'ha posat de manifest en l'espectre de RSE. Com ja s'ha comentat, els radicals orgànics donen un senyal molt estret a  $g = 2$ .

En la Figura 11.6 es mostra un diagrama esquemàtic dels potencials de reducció de les diferents etapes. Cal fer esment de que l'escala de potencials va des dels valors positius al negatiu.

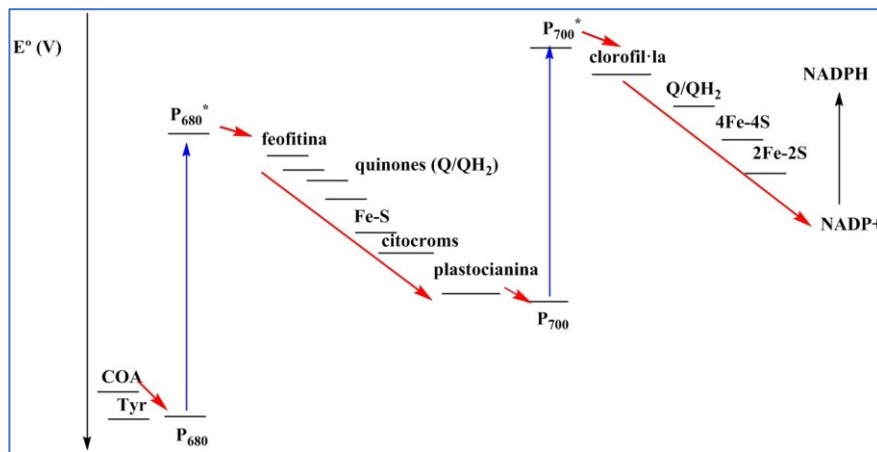


Figura 11.6 Esquema del flux d'electrons que té lloc en el procés de la fotosíntesi. Les fletxes vermelles indiquen la transferència d'electrons, les fletxes blaves l'excitació dels electrons per acció de la radiació.

## 11.2 Centre d'oxidació de l'aigua (COA)

Fa uns tres bilions d'anys que els organismes fotosintètics converteixen l'aigua en oxigen. Ara be, com es dona aquest procés d'oxidació segueix presentant encara qüestions no resoltes.

Ja fa bastants anys que se sap que el centre d'oxidació de l'aigua (COA), també anomenant centre d'alliberament d'oxigen (oxygen evolving center, OEC), conté 4 ions manganès, ara be s'ha trigat molt en poder conèixer l'estructura del centre actiu.<sup>31,32</sup> Abans d'això s'havien fet molts estudis per entendre el procés. Es van observar dos fets importants:

- El COA passa per diferents estats abans de l'alliberament de l'oxigen, en que el clúster de manganès es va oxidant. Això és el que es descriu com el cicle de Kok<sup>33</sup> (Figura 11.7).
- S'han de fer incidir quatre flashos de llum per tal de que hi hagi l'alliberament d'oxigen.

Per tant, cada quantum de llum arrenca un electró del COA, que correspon a cadascun dels estats  $S_i$ . Cal tenir present que aquesta  $S_i$ , que va des de  $S_0$  fins al  $S_4$ , no representa un espín, sinó que és una forma d'anomenar les diferents etapes per les que passa el centre actiu d'aquest enzim.

En el procés d'oxidació de l'aigua ( $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ + 4 \text{e}^-$ ) s'alliberen 4 electrons i  $4 \text{H}^+$ , i el clúster de manganès, es va oxidant, perdent el mateix nombre de protons i electrons. És a dir que el COA transfereix els electrons i protons cap al FSII, i l'aigua en el seu procés d'oxidació regenera el clúster de manganès.

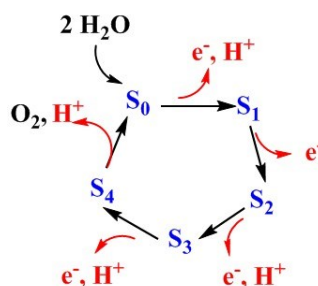


Figura 11.7 Cicle de Kok: diferents estats pels que passa el clúster de manganès (COA) per convertir l'aigua en oxigen.

L'estat  $S_2$  és el que té un temps de vida més llarg i ha sigut el més estudiat. Presenta un espectre RSE un tant complex, observant-se un senyal a  $g \sim 2$  que té més de 16 línies, degudes a l'acoblament hiperfí, ja que el manganès té un espín nuclear  $I = 5/2$ . En RSE el desdoblament degut a l'acoblament hiperfí dona  $2nI+1$  senyals (o línies), sent  $n$  el nombre de nuclis que hi ha amb espín nuclear  $I$ . Per tant, la multisenyal que apareix a  $g \sim 2$  posa de manifest que hi ha més de tres ions manganès. Molt abans de que hi hagués la resolució estructural del COA ja es proposava que era un clúster amb 4 ions Mn.

Com ja s'ha comentat, l'any 2011 es va poder tenir una bona estructura del centre de reacció.<sup>31</sup> Hi ha efectivament 4 ions Mn i a més, hi ha un ió Ca que forma part del clúster. L'estructura és curiosa ja que hi ha un cub, similar al de les proteïnes Fe-S, en aquest cas format per Ca i Mn, i els lligands pont oxígens,  $[\text{CaMn}_3\text{O}_4]$  i el quart Mn està unit a un dels oxígens dels vèrtexs i a través d'un altre grup "oxo" pont unit a un altre Mn del cub, així que el centre actiu es pot descriure com un clúster  $[\text{CaMn}_4\text{O}_5]$ . Tant el Mn terminal com el Ca tenen coordinades dues molècules d'aigua. En la Figura 11.8 es pot veure l'entorn del COA i un esquema del clúster.

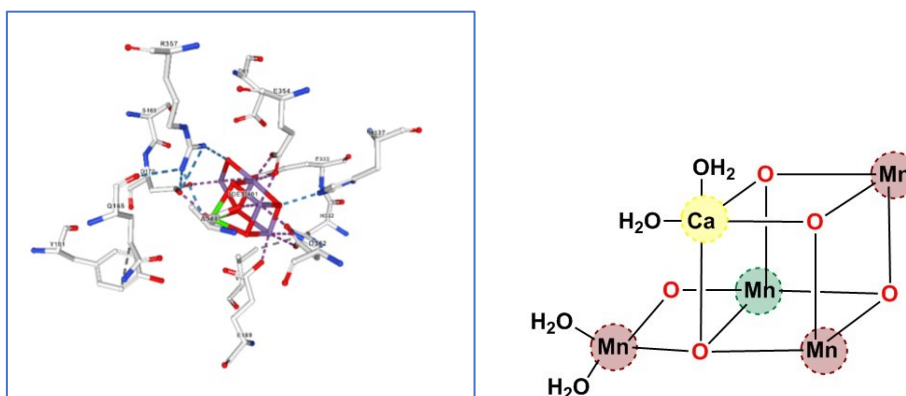


Figura 11.8 Estructura cristal·lina del centre d'oxidació de l'aigua (PDB 3WU2) i detall del clúster de calci-manganès.<sup>31,32</sup>

Tot i que actualment es coneix l'estructura cristal·lina del centre de reacció, el mecanisme pel que es dona el procés encara és motiu de controvèrsia. Hi ha 4 ions manganès, i el sistema pateix la pèrdua de 4 electrons. Ara be, quins estats d'oxidació presenten els ions Mn en l'estat  $S_0$  i en les diferents etapes segueix sense estar clar. Una de les propostes que hi ha és l'estat  $S_0$  sigui  $[3\text{Mn}^{\text{III}}-1\text{Mn}^{\text{IV}}]$ ,<sup>34</sup> ara be pels altres estats no hi ha massa unanimitat, i es poden trobar propostes de mecanismes molt diferents. fins i tot, recentment algun autor apunta a que el Mn podria arribar a tenir estat d'oxidació VII.<sup>35</sup>

## 12. METAL·LOENZIMS QUE PARTICIPEN EN EL SISTEMA DE DEFENSA CEL·LAR

### 12.1 Introducció als sistemes de defensa cel·lular

L'aparició de l'oxigen, degut a la presència dels organismes fotosintètics va comportar l'adaptació dels organismes a aquest agent oxidant. Es van formar una sèrie d'enzims que aprofitaven les propietats oxidants de l'oxigen (oxidases) i altres que a més permetien funcionalitzar diferents substrats (oxigenases). Per tal d'optimitzar la utilització de l'oxigen calia un sistema de transport d'aquesta molècula que fos eficient, ja que l'oxigen és poc soluble en aigua (proteïnes de transport d'oxigen). Ara be, la utilització de la molècula de  $O_2$  com agent oxidant genera una sèrie de subproductes,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  i  $HO\cdot$ ; aquestes espècies se les coneix com "espècies reactives d'oxigen" ROS, del seu nom en anglès. Com es pot veure en la Figura 12.1 aquestes espècies tenen un potencial de reducció  $E^0 > 1,5$  V, per tant són altament oxidants i poden malmetre diferents biomolècules; poden oxidar proteïnes, fosfolípids i també l'ADN.

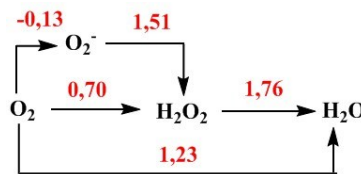


Figura 12.1 Diagrama de Latimer en medi àcid per l'oxigen.

Per altra banda, dos d'aquestes espècies són radicals, el radical hidroxil  $\cdot OH$  i l'anió superòxid  $O_2^-$ . El caràcter de radical de l'anió superòxid es pot veure fàcilment utilitzant el diagrama d'orbitals moleculars de la molècula d'oxigen (Figura 3.2) i afegint-hi un electró més. Els radicals tendeixen a reaccionar per aparellar aquest electró solitari i això ho fan provocant el trencament d'enllaços covalents. O sigui que també poden fer malbé molècules i lligands biològics.

Una de les reaccions que té lloc també per acció dels radicals, per exemple del  $\cdot OH$ , és que trenqui un enllaç C-H d'algun fosfolípid de la membrana cel·lular, i a continuació el radical format pot reaccionar amb la molècula d'oxigen que també és un radical (té 2 electrons desparellats en els orbitals  $\pi^*$ , Figura 3.2). Això dona lloc a la propagació del radical i la formació de peròxids orgànics. En el cas que estàvem considerant, un fosfolípid de membrana, la inserció d'aquest grup polar en la seva cadena provoca un trencament de la membrana, degut a que el grup polar tendeix a sortir cap a l'exterior, que és polar, i provoca una deformació en la cadena de fosfolípid i en l'estructura de la membrana (Figura 12.2).

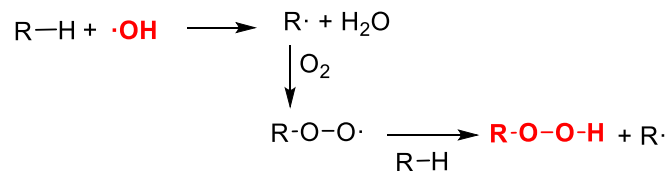
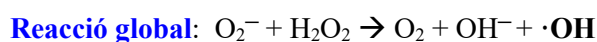
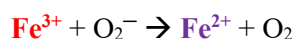


Figura 12.2 Formació de peròxids orgànics per acció del radical hidroxil.

Aquesta mateixa reacció és la que té lloc quan la mantega o altres greixos es tornen rancs i canvia el seu color en contacte amb l'aire.

La formació dels radicals hidroxil pot venir afavorida per la presència de certs ions metàl·lics "lliures", és a dir que no estan coordinats a alguna proteïna. Per exemple, la presència de ions  $Fe^{3+}$  pot catalitzar la reacció entre el superòxid i el peròxid, segons la reacció de Fenton:



De forma anàloga, els ions  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  i els ions  $\text{Ni}^{3+}/\text{Ni}^{2+}$  també poden catalitzar aquesta reacció. Per això és molt important el sistema de transport dels ions essencials per tal d'evitar reaccions secundàries.

Els organismes han generat un ampli **sistema de defensa** contra aquestes espècies reactives d'oxigen:

- Molècules antioxidants.** Són molècules que presenten propietats redox, és a dir presenten una forma oxidada i una reduïda, però cap de les dues és nociva per l'organisme. En aquest grup hi ha, entre d'altres molècules, la vitamina C (àcid ascòrbic), la vitamina E i els carotens.
- Enzims.** Hi ha quatre enzims que actuen contra aquestes ROS.
  - **Catalases:** son les responsables de la desproporció del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ . En la majoria d'organismes el centre actiu és del tipus Fe-hemo.
  - **Peroxidases:** utilitzen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  com agent oxidant, reduint-lo a aigua. El seu centre actiu també és del tipus Fe-hemo.
  - **Superoxidodismutasa (SOD):** catalitza la desproporció de l'anió superòxid  $\text{O}_2^-$  en  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hi ha tres tipus de SOD, les de Fe, les de Mn, i la que es presenta aquí que és la de Cu i Zn.
  - **Glutatióperoxidasa:** responsable de la destrucció dels peròxids orgànics. El seu centre de reacció és una selenocisteïna, que com el seu nom indica conté seleni.

Tots aquests sistemes de defensa es troben distribuïts en els diferents compartiments i espais cel·lulars. Hi ha molècules antioxidants i enzims, en les membranes, en els orgànuls cel·lulars, i també en el citosol. En la Figura 12.3 es pot veure un esquema de la distribució d'algunes d'aquestes molècules i enzims en la cèl·lula.

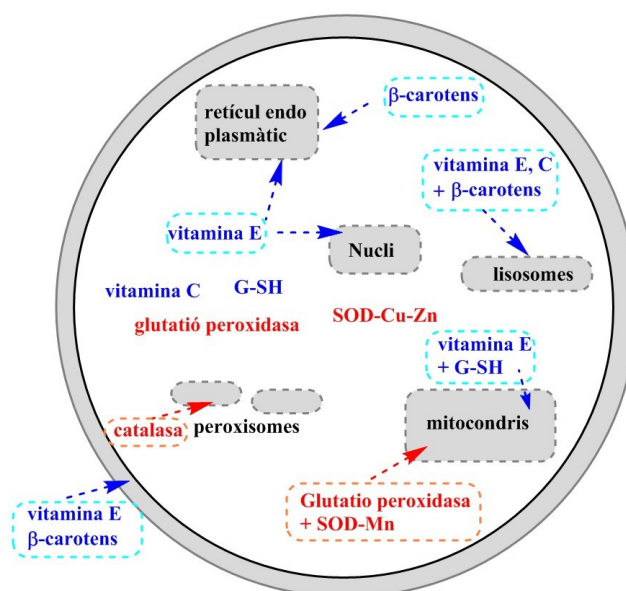


Figura 12.3 Distribució d'algunes de les molècules antioxidants i enzims en la cèl·lula.

La presència d'aquestes espècies antioxidants és fonamental de forma especial en els orgànuls cel·lulars on hi ha processos redox, com son els mitocondris, o els peroxisomes. Un altre punt sensible son les

membranes, en les que s'ha d'evitar la formació de peròxids, per això es requereix la presència de molècules antioxidants.

## 12.2 Superoxido dismutasa (SOD)

Com ja s'ha comentat la superoxido dismutasa és l'enzim responsable de la desproporció de l'anió superòxid ( $O_2^-$ ) en  $O_2$  i  $H_2O_2$ . Aquest enzim pot tenir un centre actiu de tipus mononuclear, que pot ser de Fe (SOD-Fe) o de Mn (SOD-Mn), o bé contenir dos ions metàl·lics en el centre actiu, Cu i Zn. En aquest text ens centrem en l'estudi de la SOD-CuZn.

La reacció que catalitza aquest enzim és una reacció redox, per tant, dels dos ions metàl·lics presents en aquest enzim el que participa en el procés redox és el coure, que pot presentar dos estats d'oxidació:  $Cu^{II}$  i  $Cu^I$ . Així doncs el cicle catalític es pot presentar de forma esquemàtica tal i com es mostra en la Figura 12.4.

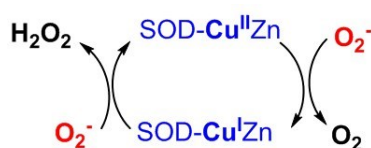


Figura 12.4 Cicle catalític de la desproporció de l'anió superòxid per medi de la SOD-CuZn.

La desproporció de l'anió superòxid es dona en dues etapes:

- La seva oxidació a  $O_2$ , en la que tan sols perd un electró:  $O_2^- \rightarrow O_2 + 1 e^-$  que passa a l'ió  $Cu^{2+}$  de l'enzim, per reduir-se a  $Cu^+$ .
- La seva reducció a  $H_2O_2$ , procés que requereix de l'aportació de dos protons i un electró que prové de l'enzim en la seva forma reduïda.

L'estructura del centre actiu es pot veure en la Figura 12.5. Com es pot observar, hi ha un lligand pont inusual: és un lligand histidina.



Figura 12.5 Detall del centre actiu de la SOD-CuZn en la forma oxidada i reduïda.

L'aminoàcid histidina, tot i tenir dos N en l'anell amb un parell d'electrons lliure sobre cadascun d'ells, en la major part de sistemes es coordina tan sols per un d'aquests àtoms de nitrogen actuant com a lligand monodentat. Ara bé, en el cas de la SOD-CuZn el lligand histidina pot estar desprotonat, tal i com es mostra en la Figura 12.6 i això afavoreix la seva coordinació pels dos àtoms de nitrogen, actuant com a lligand pont.

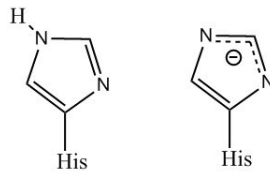


Figura 12.6 Les dues formes en que es pot trobar l'aminoàcid histidina. A l'esquerra, la forma neutre habitual. A la dreta la forma anònica, desprotonada, que es troba en la SOD-CuZn.

En la seva forma oxidada l'enzim presenta l'ió  $\text{Cu}^{2+}$  amb un nombre de coordinació 5, amb una geometria de piràmide de base quadrada distorsionada, amb una de les posicions ocupada per una molècula d'aigua i les altres per lligands histidina (N-His). L'entorn de l'ió  $\text{Zn}^{2+}$  és tetraèdric, format per lligands histidina i el grup carboxilat del lligand aspartat coordinat de forma monodentada.

El mecanisme proposat es mostra en la Figura 12.7. En presència de l'aní superòxid es perd la molècula d'aigua coordinada al  $\text{Cu}^{2+}$ , ja que és la posició més làbil, i en el seu lloc s'hi coordina l'aní  $\text{O}_2^-$ . Com ja s'ha comentat, en aquesta etapa el substrat ( $\text{O}_2^-$ ) cedeix un electró al  $\text{Cu}^{2+}$  reduint-lo a  $\text{Cu}^+$ .

En la forma reduïda l'enzim presenta l'ió  $\text{Cu}^+$  en un entorn pla trigonal, ja que s'ha descoordinat el lligand histidina que actuava de pont en la forma oxidada. La reacció del  $\text{Cu}^+$  amb el segon ió  $\text{O}_2^-$  no es dona per coordinació de l'aní de substrat al centre metàl·lic. En la seva forma reduïda l'ió metàl·lic té tots els orbitals  $d$  ocupats i per això és menys favorable la coordinació del superòxid. La presència del lligand histidina protonada (antic pont) afavoreix el posicionament del substrat proper al  $\text{Cu}^+$ . La orientació que l'hi dona al  $\text{O}_2^-$  proper a l'orbital  $d_{22}$  del  $\text{Cu}^+$  afavoreix la transferència d'un electró des d'aquest orbital a l'orbital  $\pi^*$  del  $\text{O}_2^-$  que està parcialment ocupat (Figura 12.7).

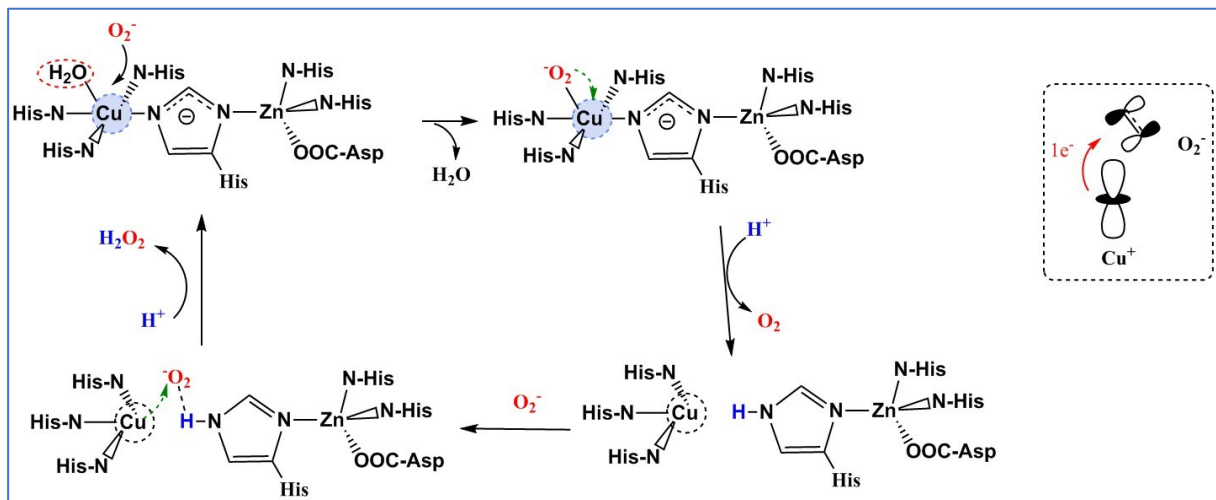


Figura 12.7 Mecanisme proposat per la desproporció del superòxid per medi de la SOD-CuZn. En el requadre esquema de la transferència electrònica des del  $\text{Cu}^+$  a l'orbital  $\pi^*$  de l'aní superòxid.

### 12.3 Catalases i peroxidases Fe-hemo

Les catalases (Fe-hemo) i peroxidases, tot i ser dos enzims diferents, es poden estudiar conjuntament ja que presenten el mateix tipus de centre actiu, i a més, una de les etapes de la reacció és similar.

Les catalases són els enzims que catalitzen la desproporció del  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{O}_2$ . Per tant, el peròxid d'hidrogen s'oxida i es redueix. Les dues reaccions que tenen lloc són:





Les peroxidases utilitzen el  $\text{H}_2\text{O}_2$  per oxidar a diferents tipus de substrats. Per tant el peròxid d'hidrogen oxida a l'enzim reduint-se a aigua:  $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$  i la forma oxidada de l'enzim és la responsable de l'oxidació dels substrats (citocrom c,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , molècules orgàniques, en general  $\text{AH}_2$ ).

Per tant tots dos enzims tenen una etapa en comú: la reducció del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  i pas de l'enzim a la seva forma oxidada.

La segona etapa de la reacció és l'oxidació del substrat. Aquí és on es diferencien:

- Les catalases oxiden al  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{O}_2$ .
- Les peroxidases oxiden a altres substrats: per exemple, un compost  $\text{AH}_2$  a  $\text{A}$  o en el citocrom c de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ .

Per tant, en la primera etapa de la reacció, que és anàloga en els dos enzims, cal que l'enzim interaccioni amb el  $\text{H}_2\text{O}_2$  i pugui aportar 2 electrons per trencar l'enllaç sigma O-O.

El grup Fe-hemo quan presenta una posició vacant interacciona fàcilment amb l'oxigen. Ja s'ha vist que en l'hemoglobina i mioglobina el  $\text{O}_2$  es coordina al  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -hemo. En el cas de la monooxigenasa citocrom  $\text{P}_{450}$  aquest grup, en la forma  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -hemo, també coordina a l'oxigen. La diferència amb les catalases i peroxidases és que el substrat no és  $\text{O}_2$  sinó  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En el cas del cit  $\text{P}_{450}$  s'havia vist que un intermedi de la reacció era  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ , i l'etapa següent comportava el trencament de l'enllaç O-O a l'igual que en el cas de catalases i peroxidases. Per tant, per aquests enzims es proposa:

- Per interaccionar amb el  $\text{H}_2\text{O}_2$  l'enzim ha d'estar en la forma  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -hemo i ha de tenir una posició vacant.
- El trencament de l'enllaç O-O es donarà de la mateixa forma que en el cit  $\text{P}_{450}$ , és a dir que els dos electrons necessaris per omplir l'orbital  $\sigma^*$  del  $\text{O}_2^{2-}$  provenen un de l'anell porfirínic i un del  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . El sistema  $\pi$  de l'anell perd un dels electrons i per tant queda un radical a l'anell.

El centre actiu de la catalasa i les diferents peroxidases varia en el lligand que ocupa la posició axial (L). Per les catalases és una tirosina desprotonada ( $\text{Tyr-O}^-$ ), mentre que en les peroxidases pot ser una cisteïna desprotonada ( $\text{Cys-S}^-$ ) o una histidina ( $\text{N-His}$ ). El mecanisme de reacció que es proposa es presenta en la Figura 12.8.

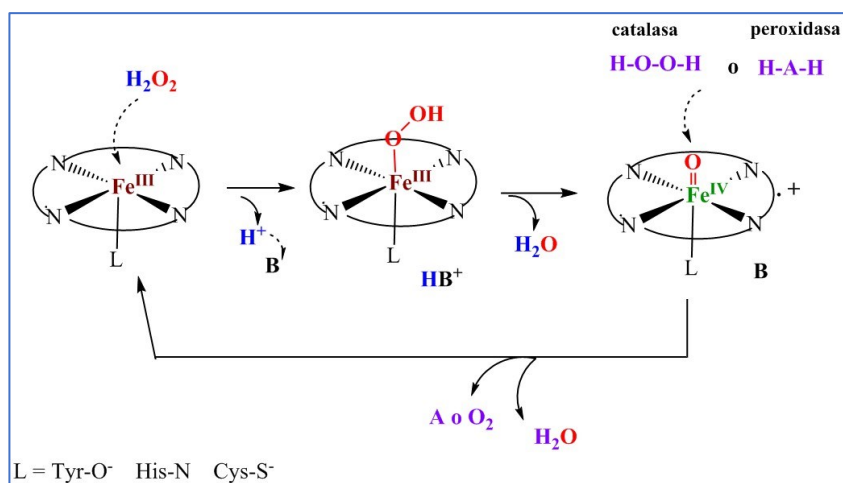


Figura 12.8 Mecanisme proposat per les catalases i peroxidases.

L'intermedi de reacció  $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , amb el radical en l'anell es posa de manifest en el canvi en l'espectre visible i en la coloració verda d'aquesta intermedi. Aquest intermedi és anàleg al que apareix en el mecanisme reacció del cit  $\text{P}_{450}$ . Els lligands en axial (L) aniònics estableixen l'estat d'oxidació elevat

del ferro. En el cas del sistema amb N-His, que és un lligand neutre, s'ha observat que aquest lligand presenta enllaços per pont d'hidrogen que aporten densitat electrònica extra sobre el N coordinat.

És aquest intermedi deficient en electrons ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$  i l'anell ha perdut també un electró), que oxidarà al substrat reduint-se de nou a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ . Aquesta transferència electrònica ve propiciada per la interacció per enllaços per pont d'hidrogen entre el substrat i el grup "oxo".

## 12.4 Glutatió peroxidasa

La glutatió peroxidasa és un enzim que conté seleni en el centre actiu. Més concretament, el punt rellevant del seu mecanisme és la presència d'una selenocisteïna ( $\text{Cys-SeH}$ ). Una selenocisteïna és una cisteïna en la que el seleni està substituint al sofre ( $\text{Cys-SH}$ ). Una diferència important entre aquests dos aminoàcids és el seu caràcter àcid. El seleni, en trobar-se al mateix grup de la taula periòdica que el sofre però en un període superior, té un major radi. Per tant, la distància  $\text{Se-H} > \text{S-H}$ , i això explica el major caràcter àcid de la selenocisteïna que es troba desprotonada ( $\text{Cys-Se}^-$ ), mentre que la  $\text{Cys-SH}$  només està desprotonada quan es coordina a ions metàl·lics.

La glutatió peroxidasa és l'enzim responsable de l'eliminació dels peròxids orgànics. Es troba en molts punts diferents, tant en l'espai extracel·lular, per exemple, en el plasma sanguini, o a l'interior cel·lular, en el mateix citosol o en orgànuls, com els mitocondris.

El responsable del trencament del peròxid és el grup  $\text{Cys-Se}^-$  de l'enzim que actua com agent nucleòfil. Ara be, per regenerar l'enzim cal la presència del glutatió. El glutatió és un pèptid format per glutamat, glicina i cisteïna ( $\text{Glu-Cys-Gly}$ ) i que s'acostuma a representar com  $\text{G-SH}$ , posant de manifest que el grup important és el tiol de la cisteïna.

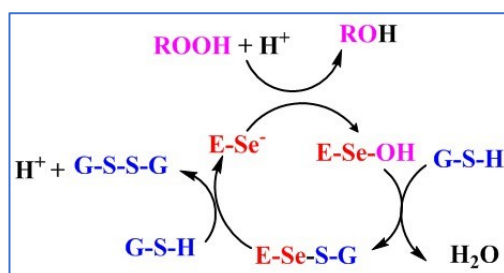


Figura 12.9 Mecanisme de la glutatió peroxidasa ( $\text{GSH} = \text{glutatió}$ ).

En el procés de regeneració de l'enzim, es necessiten dos molècules de glutatió. En primer lloc es forma l'enllaç  $\text{Se-S}$ , entre l'enzim i el glutatió, i la segona molècula de glutatió desplaça l'enzim, ja que és més favorable la formació de l'enllaç  $\text{S-S}$  que el  $\text{Se-S}$ . Hi ha un millor solapament entre els orbitals de dos  $\text{S}$ , que entre els de  $\text{S}$  i  $\text{Se}$ , degut al diferent radi i electronegativitat.

## 13. METAL·LOENZIMS QUE PARTICIPEN EN PROCESOS D'ISOMERITZACIÓ

### 13.1 El sistema B<sub>12</sub>

L'any 1926 es va veure que hi havia un tipus d'anèmia que es podia revertir administrant fetge. Es va procedir a aïllar el principi actiu i se'l va anomenar vitamina B<sub>12</sub>.

Una vitamina és un compost necessari pels organismes superiors però que no el sintetitzen sinó que cal incorporar-lo a través de la dieta. Això passa amb la vitamina B<sub>12</sub>, el nostre organisme no en sintetitza en prou quantitat i cal adquirir-la a través de la dieta. Ara bé, la vitamina no és l'espècie activa, sinó que s'ha de convertir al coenzim o a l'espècie activa per la reacció en la que estigui involucrada.

El sistema B<sub>12</sub>, té en el seu centre actiu el cobalt unit a un lligand nitrogenat macrocicle, derivat de la porfirina (grup hemo) però amb certes diferències (Figura 13.1).

- La cavitat de l'anell és menor ja que té un àtom de carboni menys.
- L'anell tan sols té una càrrega negativa quan es desprotona.
- No té un sistema π complet, per tant és un anell molt més flexible que el de la porfirina.

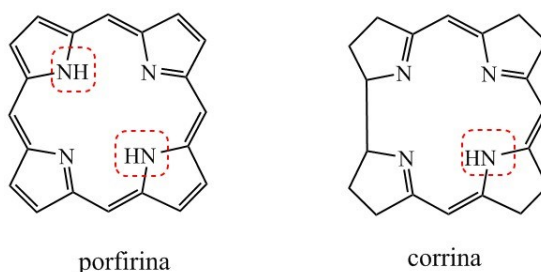


Figura 13.1 Comparació entre el lligand porfirina i el lligand corrina.

L'ió metàl·lic que es coordina als 4 nitrògens de l'anell és el Co<sup>III</sup>. La gran majoria de compostos de Co<sup>III</sup> presenten una configuració electrònica d'espín baix, i el sistema B<sub>12</sub> no és cap excepció: té un ió Co<sup>III</sup> d'espín baix, per tant el seu estat fonamental d'espín és  $S = 0$ . Comparat amb el Fe<sup>III</sup> el Co<sup>III</sup> d'espín baix té un radi menor (està més a la dreta a la taula periòdica) i per tant es pot ajustar millor a la cavitat, que com hem comentat té una mida més petita que en la porfirina..

El nombre de coordinació del cobalt en el sistema B<sub>12</sub> és NC = 6. És a dir que les dues posicions axials estan ocupades. Una d'aquestes posicions l'ocupa un grup dimetilbenzimidazol, la base nitrogenada d'un nucleòtid que penja de l'anell corrina. L'altra posició (R) varia, donant lloc al que es coneix com la família de les cobalamines. En la vitamina B<sub>12</sub> R = CN<sup>-</sup>, però també podem tenir R = H<sub>2</sub>O o OH<sup>-</sup>. Les dues espècies actives són: coenzim B<sub>12</sub>, quan R = adenosil i el sistema Me-B<sub>12</sub> o metilcobalamina quan R = Me (Figura 13.2).

Per tant els enzims B<sub>12</sub> tenen un grup R orgànic (adenosil o Me) i per tant hi ha un enllaç Co<sup>III</sup>-C; és a dir que aquests enzims són sistemes organometàl·lics. Aquest és un dels pocs sistemes que hi ha de compostos organometàl·lics en éssers vius. En general els compostos organometàl·lics són força reactius. Per aquest sistema (compostos model) s'ha vist que l'enllaç Co-C es pot trencar amb certa facilitat per acció de la llum o l'escalfor.

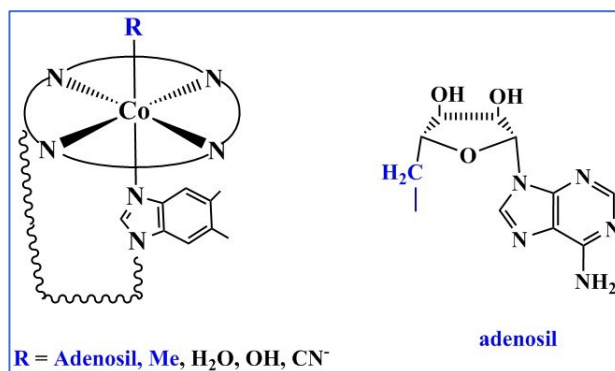


Figura 13.2 centre actiu dels sistemes B<sub>12</sub>.

Un altre fet rellevant d'aquest sistema és l'estat d'oxidació del metall. El Co<sup>III</sup> en solució aquosa és molt oxidant,  $E^{\circ}(\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}) = 1,95 \text{ V}$  i per tant si es trobés com aquocatió seria altament agressiu. En canvi, en el sistema B<sub>12</sub> el seu potencial de reducció disminueix significativament,  $E^{\circ}(\text{B}_{12}\text{-Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}) \sim -0,04 \text{ V}$ .

### 13.2 Reaccions de reordenament o isomerització: coenzim B<sub>12</sub>

El coenzim B<sub>12</sub> catalitza reaccions de reordenament o d'isomerització, en les que s'intercanvia un H unit a un carboni amb un grup X unit al carboni veí com es mostra en la Figura 13.3.

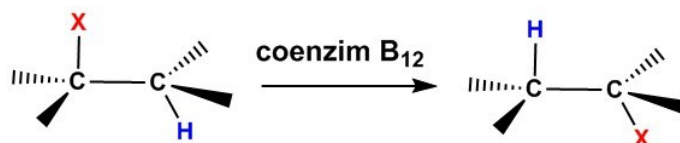


Figura 13.3 Reacció catalitzada pel coenzim B<sub>12</sub>.

Seguint la reacció per RSE s'observa:

- la presència d'un radical orgànic, ja que hi ha una banda estreta a  $g = 2$ .
- un senyal degut a la presència de Co<sup>II</sup> amb acoblament hiperfí que dona lloc a 8 línies. El cobalt té un espín nuclear  $I_{\text{Co}} = 7/2$ , per tant, l'acoblament de l'espín electrònic amb l'espín nuclear dona  $2nI+1$  senyals, que correspon a les 8 senyals que s'observen.

Per tant, en aquesta reacció hi ha un trencament homolític de l'enllaç Co<sup>III</sup>-C<sub>adenosil</sub> reduint-se el Co<sup>III</sup> a Co<sup>II</sup> i formant-se el radical adenosil, que podem representar com R-CH<sub>2</sub>· tal i com es pot veure en la Figura 13.4.

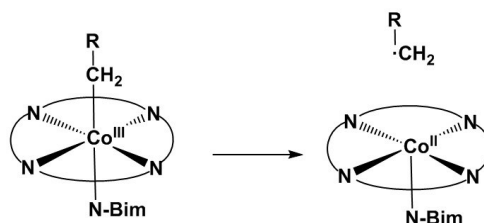


Figura 13.4 Trencament homolític de l'enllaç Co-C en el coenzim B<sub>12</sub>.

Com ja s'ha comentat, l'anell del sistema B<sub>12</sub> presenta més flexibilitat que la porfirina, això pot propiciar que l'apropament del substrat (el compost que s'ha d'isomeritzar) debiliti l'enllaç Co-C i pugui produir el trencament.

L'ió Co<sup>2+</sup> format segueix presentant configuració d'espín baix i per tant, en ser un ió *d*<sup>7</sup> presenta un espín electrònic  $S = 1/2$ .

Per altra banda, un radical és una espècie molt reactiva, que tendeix a trencar enllaços per tal d'aparellar l'electró solitari. Així que es proposa que el radical adenosil (R-CH<sub>2</sub>·) trenca l'enllaç C-H del substrat generant un radical en el substrat i formant el R-CH<sub>3</sub>.

Es proposa que el reordenament o isomerització que té lloc en el substrat es dona via radical, tal i com es mostra en la Figura 13.5.

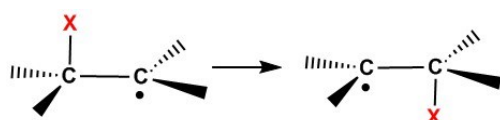


Figura 13.5 Reordenament del radical en el substrat

El mecanisme pel que es dona aquest intercanvi en la posició del radical no està clar, i no es pot descartar que també hi intervingui el centre de cobalt.

El mecanisme global proposat per les reaccions de reordenament es mostra en la Figura 13.6. D'aquest mecanisme cal tenir clar dos punts: és un procés radicalari que comporta el procés redox Co<sup>III</sup>/Co<sup>II</sup>.

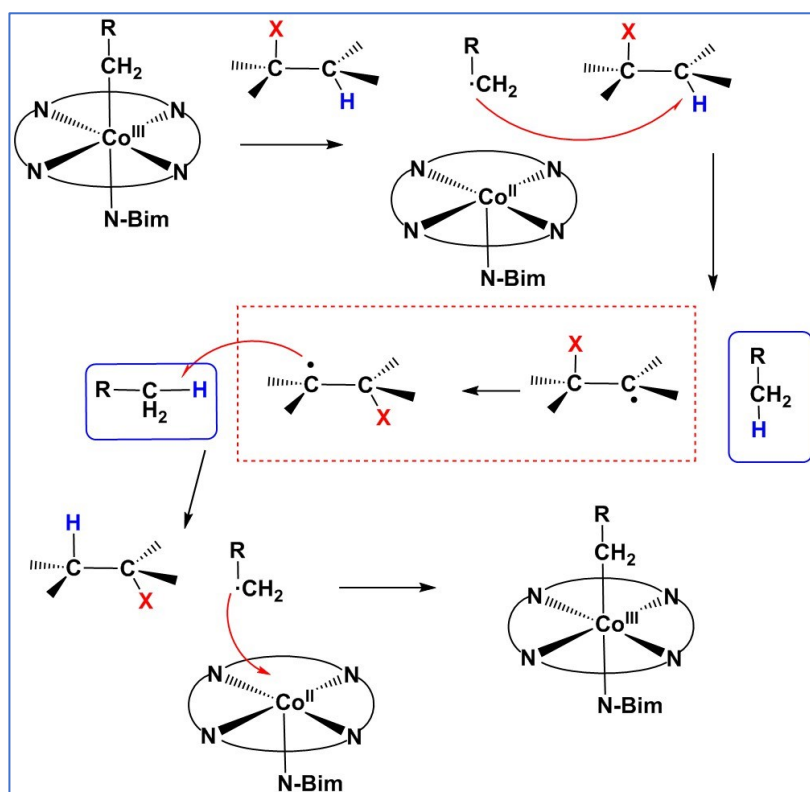


Figura 13.6 Mecanisme de reacció pel procés d'isomerització catalitzat pel coenzim B<sub>12</sub>.

### 13.3 Reaccions de transferència de grups metil: Me-B<sub>12</sub>

Com ja s'ha comentat hi ha un altre enzim del sistema B<sub>12</sub>, que és el Me-B<sub>12</sub>. Aquest enzim catalitza reaccions de transferència de grups metil.

Una de les reaccions de transferència de metil és la conversió de l'aminoàcid cisteïna (Cys-SH) en l'aminoàcid metionina (Met-S-CH<sub>3</sub>). La reacció la catalitza el sistema Me-B<sub>12</sub> que és el que aporta el grup metil.



En aquest tipus de reaccions no s'observa senyal RSE, el que indica que no hi ha un trencament homolític de l'enllaç Co<sup>III</sup>-CH<sub>3</sub> sinó que en aquest cas el trencament és heterolític, formant-se Co<sup>I</sup> i el carbocatió CH<sub>3</sub><sup>+</sup>.

A l'igual que en el cas de les reaccions catalitzades pel coenzim B<sub>12</sub>, l'apropament del substrat pot provocar una certa deformació en l'anell, debilitant l'enllaç Co-C. La reacció vindrà propiciada per la interacció entre la cisteïna i el carbocatió (Figura 13.7).

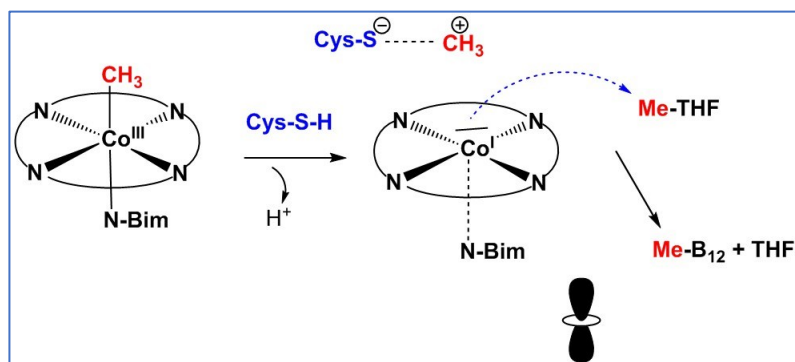


Figura 13.7 Mecanisme de reacció per la transferència de metil catalitzada pel Me-B<sub>12</sub> (THF = tetrahidrofolat).

En el procés de trencament de l'enllaç Co-C s'observa un allargament de la distància Co-N del grup benzimidazol (N-Bim) que hi ha en la posició axial. Això corrobora que hi ha hagut la reducció del Co<sup>III</sup> a Co<sup>I</sup>, col·locant-se els dos electrons en l'orbital d<sub>22</sub> i per tant, la repulsió amb el lligand en axial és major, augmentant la distància d'enllaç. L'aparellament dels dos electrons en aquest orbital dona un estat d'espín S = 0, que concorda amb el fet de que no s'observi senyal RSE.

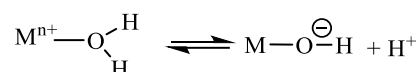
La regeneració de l'enzim es dona per interacció amb una altre molècula, metil tetrahidrofolat, Me-THF, que és la que transfereix el grup metil.

Per tant, en aquest tipus de reaccions de transferència de metil el trencament de l'enllaç Co-C és heterolític i la reacció no es dona via radical. El estats d'oxidació pels que passa l'ió metàl·lic són Co<sup>III</sup>/Co<sup>I</sup>.

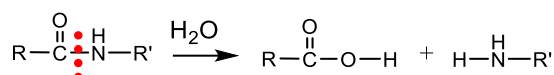
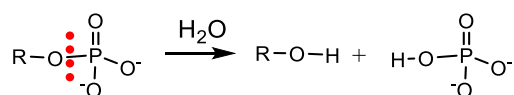
## 14. METAL·LOENZIMS QUE CATALITZEN REACCIONS ÀCID-BASE

En aquest capítol es parla dels enzims que catalitzen reaccions de tipus àcid-base, en el sentit ampli de l'expressió. La gran majoria són reaccions d'hidròlisi, és a dir reaccions en les que hi ha el trencament d'un enllaç provocat per la reacció amb aigua.

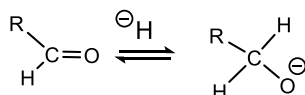
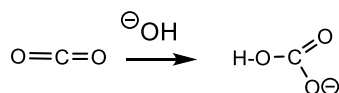
Per tal de trencar enllaços covalents l'aigua ha d'actuar com a nucleòfil. Ara be, la molècula d'aigua lliure, sense coordinar a un ió metàl·lic, té poc caràcter nucleofílic; en canvi, quan està coordinada a un ió metàl·lic amb un cert caràcter polaritzant augmenta el seu caràcter àcid, i per tant el seu poder com a nucleòfil ( $^-\text{OH}$ ).



En els éssers vius es donen moltes reaccions d'hidròlisi, com per exemple d'esters de fosfats, o el trencament d'enllaços peptídics.



Ara be, hi ha altres reaccions que són també d'atac nucleòfil però en les que no es dona el trencament d'un enllaç, com és la conversió del  $\text{CO}_2$  en  $\text{HCO}_3^-$  o be el pas d'aldehid a alcohol o viceversa.



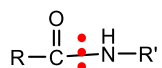
Un dels problemes que presenten aquest tipus d'enzim és que són difícils de caracteritzar, ja que molts d'ells tenen zinc com a ió metàl·lic en el centre actiu. El  $\text{Zn}^{2+}$  en tenir una configuració electrònica  $d^{10}$  no presenta espectre visible, ni senyal RSE. Es podria pensar en la caracterització per RMN, ja que el  $^{67}\text{Zn}$  té un espín nuclear  $I = 5/2$ , però té l'inconvenient de que aquest isòtop és molt poc abundant en el zinc natural (4%). Una forma de caracteritzar aquests enzims és substituint l'ió metàl·lic del centre actiu per un altre similar però que sigui un metall de transició (que tingui els orbitals  $d$  parcialment ocupats). El  $\text{Co}^{2+}$  és un bon candidat ja que té un radi similar.

Els enzims que es tracten en aquest text són enzims de  $\text{Zn}^{2+}$  i un enzim que conté  $\text{Ni}^{2+}$ . Hi ha un altre element que ja s'ha comentat que participa en reaccions d'hidròlisi, és el  $\text{Mg}^{2+}$  que està involucrat en la hidròlisi del ATP i en general en processos on intervenen fosfats.

## 14.1 Carboxipeptidasa A

La carboxipeptidasa A va ser un dels primers enzims que es va descobrir i es van realitzar nombrosos estudis, espectroscòpics i no espectroscòpics, per tal de conèixer l'entorn de l'ió metàl·lic i el mecanisme de la reacció.

El seu nom fa referència a la funció que realitza: *peptidasa* es refereix a que trenca l'enllaç peptídic i *carboxi* que ho fa en l'extrem de la proteïna on hi ha el grup carboxilat terminal.



Aquest enzim forma part de la gran família d'enzims digestius, responsables de la fragmentació i degradació dels diferents tipus de polímers biològics.

Aquest enzim es troba en l'espai extracel·lular. Com qualsevol altre enzim, la seva funció és actuar com a catalitzador. La reacció d'hidròlisi de l'enllaç peptídic té una constant de velocitat molt petita,  $k = 10^{-11} \text{ s}^{-1}$  quan no hi ha la presència de catalitzador, en canvi la reacció enzimàtica té una constant de velocitat de molt més gran,  $k = 10^4 \text{ s}^{-1}$ .

Com ja s'ha comentat, abans de tenir l'estructura es van fer diversos estudis amb l'enzim. En un d'ells es va veure que la reacció no es donava en presència d'algun lligand bidentat. Això vol dir que hi ha dos lligands làbils (o un lligand làbil i una posició vacant) que es poden substituir per lligand bidentat i llavors no es dona la reacció. Per tant vol dir que aquest lligand làbil és fonamental per que tingui lloc la reacció. Quan es va resoldre l'estructura cristal·lina es va veure que efectivament hi ha un lligand monodentat,  $\text{H}_2\text{O}$ , i que el nombre de coordinació del  $\text{Zn}^{2+}$  és  $\text{NC} = 5$ . En presència d'un lligand bidentat, com que l'ió metàl·lic té encara una posició vacant (pot arribar a  $\text{NC} = 6$ ), es pot coordinar aquest lligand desplaçant la molècula d'aigua, ja que la coordinació d'un lligand bidentat dona major estabilitat al complex.

En la Figura 14.1 es presenta l'estructura cristal·lina d'una carboxipeptidasa A. L'ió  $\text{Zn}^{2+}$  està coordinat a 2 N d'histidina, a dos O d'un lligand carboxilat bidentat, del glutamat, i la cinquena posició de coordinació l'ocupa una molècula d'aigua. En la cavitat creada per la proteïna hi ha proper un grup carboxilat que actua com a base, facilitant la desprotonació de la molècula d'aigua coordinada i generant-se així el nucleòfil ( $\text{Zn}^{2+}-\text{OH}^-$ ).

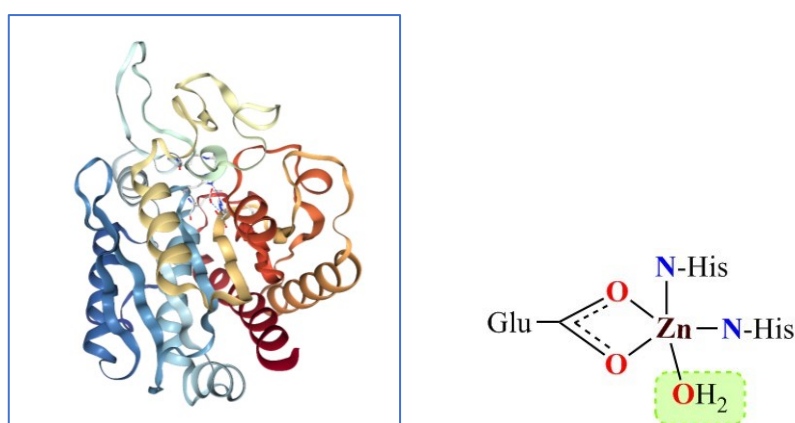


Figura 14.1 Estructura cristal·lina de la carboxipeptidasa A bobina (codi PDB: 5CPA)<sup>36</sup> i detall del centre actiu.

El substrat a hidrolitzar s'apropa al centre actiu gràcies a la formació d'enllaços per pont d'hidrogen, que el posicionen favorablement per la coordinació al centre de reacció. En aquest cas el  $\text{Zn}^{2+}$  juga dos



papers: per una banda, polaritza l'enllaç O-H de la molècula d'aigua, afavorint la formació del nucleòfil, i per altra banda té una posició vacant en la que es pot coordinar el substrat. En el mecanisme que es proposa el nombre de coordinació del centre metàl·lic passa de  $NC = 5$  a  $NC = 6$  (Figura 14.2).

El grup carbonil pot interaccionar amb el  $Zn^{2+}$  que té una posició vacant, i el situa ben posicionat per patir l'atac nucleòfil per part del  $^-OH$  que hi ha coordinat al  $Zn^{2+}$ . Això provoca que el C passi de tenir una geometria plana trigonal (hibridació  $sp^2$ ) a una geometria tetraèdrica (hibridació  $sp^3$ ). A l'igual que passa en la hidròlisi del ATP, els enllaços covalents es poden afeblir augmentant el nombre d'enllaços que hi ha al voltant de l'àtom central. La disposició de l'orbital  $\pi^*$  del grup carbonil (CO) permet el solapament d'aquest orbital amb un dels orbitals del grup  $^-OH$  que té el parell d'electrons.

El parell d'electrons solitaris del N de l'enllaç peptídic interacciona, i es protona, amb el  $H^+$  que havia quedat retingut en la cavitat unit a un grup bàsic, en aquest cas un carboxilat. Per tant momentàniament també augmenta el nombre d'enllaços que forma, produint-se finalment el trencament de l'enllaç C-N.

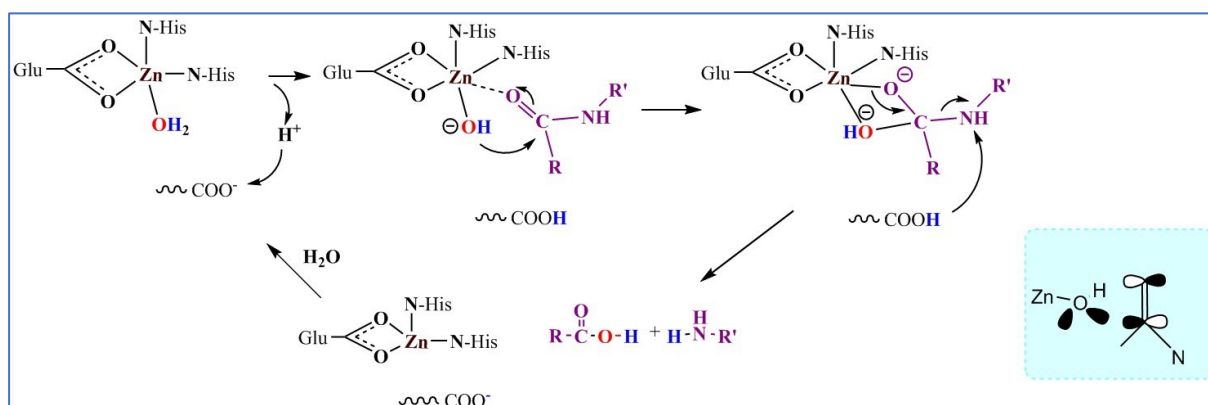


Figura 14.2 Mecanisme proposat per la carboxipeptidasa A.

## 14.2 Ureasa

La ureasa és l'enzim responsable d'hidrolitzar la urea. En la degradació dels lligands biològics que contenen nitrogen es forma urea. Tal i com es pot veure en la Figura 14.3, la descomposició de la urea dona diferents productes segons si és una descomposició espontània o catalitzada per la ureasa. En ambdós casos el que es trenca és l'enllaç C-N, que en certa forma és similar a l'enllaç peptídic. La descomposició espontània dona com a producte l'àcid isocianic, que és altament tòxic. En canvi amb la ureasa es forma l'anió carbamat, en una primera etapa, que després descompon espontàniament per donar  $CO_2$  i  $NH_3$ . La reacció de degradació de la urea és  $10^{14}$  vegades més ràpida amb la ureasa que sense cap catalitzador.

La ureasa es va poder cristal·litzar per primer cop en el 1926, ara be, no va ser fins cinquanta anys més tard, en el 1976, que es va detectar que contenia níquel en el centre actiu. Va ser el primer enzim que es va conèixer que contenia níquel. Per conèixer l'entorn del Ni en el centre actiu es va haver d'esperar encara uns anys. Va ser l'any 1998 que es va poder resoldre l'estructura del centre actiu.

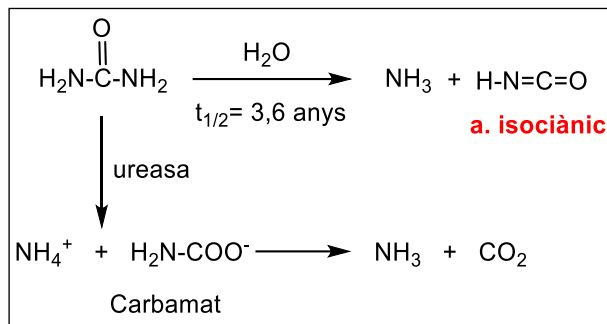


Figura 14.3 Descomposició de la urea.

La ureasa es troba en plantes, fongs i bacteris. En plantes s'ha observat que quan la concentració en Ni és baixa, hi ha un augment en la concentració d'urea. Aquest augment en la quantitat d'urea present afecta negativament al metabolisme del nitrogen i al creixement de la planta.

En els mamífers la urea formada en la descomposició dels lligands biològics nitrogenats, segueix dos vies. Una part de la urea s'elimina a través de l'orina, i una altra part torna a l'aparell digestiu on hi ha bacteris que contenen ureasa i la degraden, per participar en la síntesi de noves proteïnes i biomolècules.

La presència de bacteris en l'orina que continguin ureasa, provoca la hidròlisi d'aquesta molècula i com que en el procés es forma amoníac, el pH augmenta. Això pot provocar la precipitació d'algun sòlid (la formació de pedres).

El centre actiu de les ureases de diferents bacteris són tots similars. El centre actiu conté dos ions  $\text{Ni}^{2+}$  units per un grup carboxilat de la lisina, que actua com a lligand pont, i una molècula d'aigua. En les posicions terminals tots dos centres metàl·lics tenen 2 histidines i una molècula d'aigua. Un dels ions  $\text{Ni}^{2+}$  queda així, amb un  $\text{NC} = 5$ , mentre que l'altre  $\text{Ni}^{2+}$  completa la coordinació octaèdrica amb un lligand carboxilat provinent de l'aspartat, unit de forma monodentada (Figura 14.4). Hi ha un conjunt d'enllaços d'hidrogen entre les molècules d'aigua coordinades com a lligands terminal i la que actua com a lligand pont i també entre aquesta i el grup carboxilat monodentat.

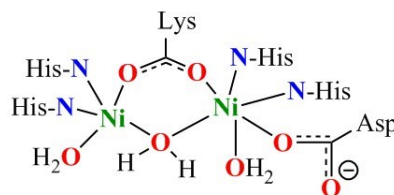


Figura 14.4 Centre actiu de la ureasa <sup>37</sup>

Estudis realitzats amb aquest enzim posaven de manifest que l'activitat enzimàtica s'inhibeix en presència de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Això indica que aquest anió es pot coordinar al centre actiu competint amb la urea. Es a dir que hi ha posicions làbils que són fonamentals pel mecanisme de reacció.

Un dels mecanismes que es planteja per aquesta reacció és que els dos ions  $\text{Ni}^{2+}$  tenen diferent funció. La ureasa es coordina a través de l'oxigen del grup carbonil al  $\text{Ni}^{2+}$  que té  $\text{NC} = 5$ . L'altre  $\text{Ni}^{2+}$  genera el nucleòfil ( $^-\text{OH}$ ) a partir de l'aigua pont, que deixa d'actuar com a pont. En quedar propers el substrat i el nucleòfil es dona la reacció. A l'igual que en el cas de la carboxipeptidasa, la clau està en passar del C amb entorn pla trigonal al tetraèdric, debilitant-se els enllaços. D'aquesta forma el substrat queda actuant com a lligand pont (Figura 14.5). És en aquest punt on la presència d'espècies que puguin actuar com a lligands bidentats (per ex.  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) poden inhibir la reacció. El  $\text{H}^+$ , que ha perdut inicialment

l'aigua pont i que deu estar retintut en algun grup bàsic de la cavitat, protona el grup  $-NH_2$  afavorint-se el trencament de l'enllaç C-N.

El carbamat queda coordinat actuant com a lligand bidentat i a continuació l'aigua el desplaça regenerant-se l'enzim.

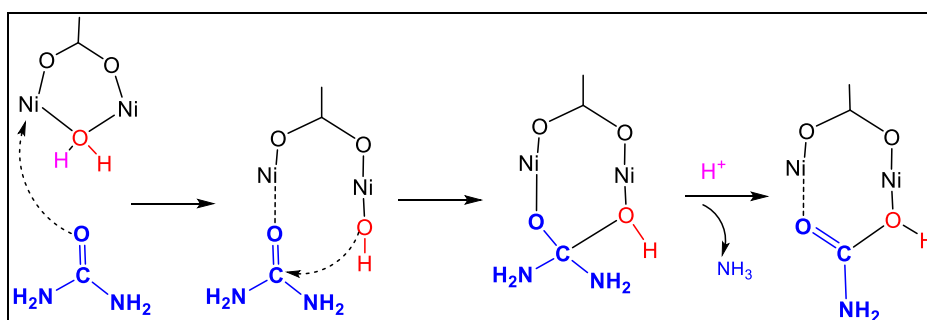


Figura 14.5 Mecanisme proposat per la ureasa.

### 14.3 Anhidrasa carbònica

L'anhidrasa carbònica va ser la primera proteïna de zinc que es va aïllar, en el 1932, però en aquell moment encara no s'havia vist que contenia aquest ió metàl·lic. Això es va saber l'any 1939, i uns trenta anys més tard, finalment es va resoldre l'estructura cristal·lina que va permetre determinar l'entorn de l'ió metàl·lic,  $Zn^{2+}$ .

La reacció que catalitza aquest enzim és la hidratació del  $CO_2$  per formar hidrogen carbonat i la reacció inversa:  $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ .

A l'igual que en altres enzims de zinc, com que es va trigar molt a poder tenir l'estructura del centre actiu es van anar realitzant diversos estudis que aportaven informació valuosa per poder establir un mecanisme de reacció.

Es va veure que si s'extreia el  $Zn^{2+}$ , per exemple utilitzant un bon lligand quelant, la proteïna no patia cap canvi estructural significatiu, però deixava de tenir activitat catalítica. Això indica que el catió metàl·lic no té un paper estructural sinó que està involucrat en la reacció.

Una altra dada rellevant que es va extreure és que la reacció es dona amb una velocitat més alta quan el medi és bàsic, a  $pH \sim 8$ . El pas de  $CO_2$  a  $HCO_3^-$  consisteix en l'atac nucleòfil del  $OH^-$  sobre el C del  $CO_2$ . Per tant el medi bàsic afavoreix la formació del nucleòfil, facilitant el desprotonament de l'aigua.

Per altra banda, s'havia vist que la reacció s'inhibia en presència de formiat ( $HCOO^-$ ) o de hidrogen sulfit ( $HSO_3^-$ ); ambdós anions tenen una estructura similar a la del hidrogen carbonat (Figura 14.6), i per tant poden competir per la seva coordinació al  $Zn^{2+}$ , el que indica que en una de les etapes de la reacció el  $HCO_3^-$  està coordinat al centre metàl·lic.

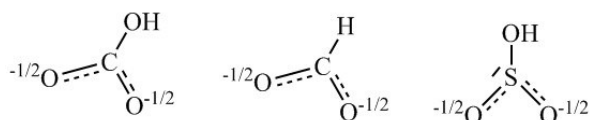


Figura 14.6 Anions que competeixen en la coordinació al  $Zn^{2+}$  en l'anhidrasa carbònica.

El centre actiu d'aquest enzim és mononuclear, conté un sol ió metàl·lic, en un entorn tetraèdric format per tres lligands nitrogenats, histidina, i una molècula d'aigua (Figura 14.7). Aquesta molècula d'aigua

és la que forma el nucleòfil. Per tant, a la cavitat proteica hi ha un grup bàsic que reté el  $H^+$  durant la reacció. En aquest enzim el grup bàsic és una histidina.

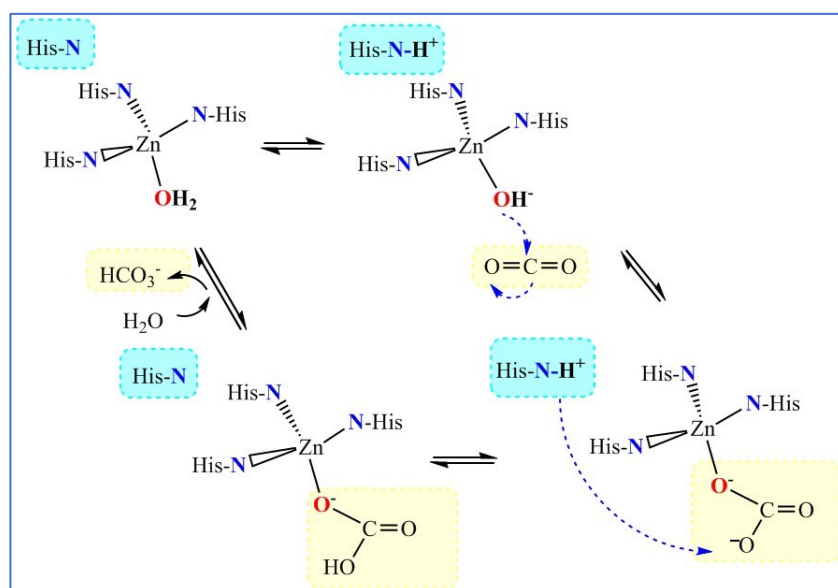


Figura 14.7 Mecanisme de reacció de l'anhidrasa carbònica.

A partir d'estudis de RMN de  $^{18}O$  i  $^{13}C$  es va observar que l'intercanvi entre  $CO_2$  i  $HCO_3^-$  és ràpid i per tant, l'etapa lenta de la reacció és la formació del nucleòfil o desprotonació de l'aigua. És per això que la velocitat de reacció depèn del pH del medi.

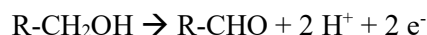
#### 14.4 Alcohol deshidrogenasa (ADH)

L'alcohol deshidrogenasa, com el seu nom indica "extreu" un hidrogen a un alcohol, donant lloc a la formació d'un aldehyd o una cetona. Per tant és un procés redox. El centre de reacció conté  $Zn^{2+}$ , però evidentment aquest ió no pot catalitzar una reacció redox, sinó que hi ha d'haver un cofactor, una espècie que sí que pugui guanyar o perdre electrons, participant en el procés redox.

En el fetge de mamífers hi ha la reacció d'oxidació d'alcohols a cetona o aldehyd; aquest enzim també catalitza la reacció en sentit contrari.

Els llevats (fongs microscòpics unicel·lulars) són els responsables del procés de la fermentació alcohòlica; en una de les etapes de la fermentació intervé l'alcohol deshidrogenasa convertint la glucosa en etanol.

La reacció d'oxidació d'un alcohol primari:



es pot re-escriure considerant que  $H^+ + 2 e^- = H^-$  i per tant quedaria:



Així que la reacció d'oxidació d'alcohols es pot explicar com la transferència d'un anió hidrur. El cofactor redox, que serà l'acceptor de l'hydrur és el dinucleòtid  $NAD^+$ , que passarà a la seva forma reduïda  $NADH$ .

En l'enzim hi ha dues cavitats en les que hi ha un ió  $Zn^{2+}$  coordinat, però no és un centre dinuclear, ja que no hi ha lligands pont en cap moment. Són dos cavitats separades (Figura 14.8).

- Un d'aquests ions té  $NC = 4$ , i el seu entorn tetraèdric està format per 4 lligands cisteïna. L'ió metàl·lic d'aquest centre té un paper estructural.

- El  $Zn^{2+}$  de l'altra cavitat té també un entorn tetraèdric,  $NC = 4$ , format per dos lligands cisteïna, un lligand histidina i una molècula d'aigua. Aquest és el centre de reacció. La presència dels lligands cisteïna, que en estar coordinats al ió metàl·lic estan desprotonats i per tant presenten càrrega negativa, fa que la molècula d'aigua sigui un lligand làbil. El  $Zn^{2+}$  té poc poder polaritzant i en aquest cas, en lloc de propiciar la desprotonació de l'aigua afavoreix la seva substitució pel substrat.

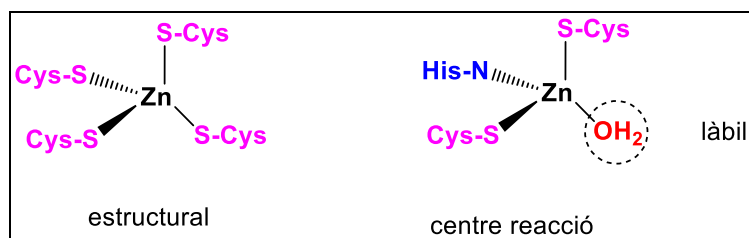


Figura 14.8 Entorn dels dos ions metàl·lics presents en l'alcohol deshidrogenasa.

En presència de l'alcohol, es perd la molècula d'aigua i es coordina l'alcohol, que perd el protó del grup alcohol. Proper a aquest centre de reacció s'hi ubica el nucleòtid  $NAD^+$  i es pot donar la transferència del hidrur (Figura 14.9).

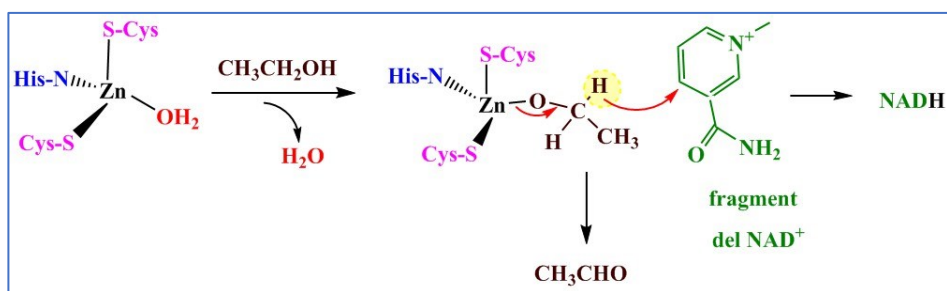


Figura 14.9 Mecanisme de reacció de l'alcohol deshidrogenasa.

S'ha observat que la velocitat de reacció depèn de quin alcohol primari és:



Per tant, el grup R, en un alcohol primari ROH, influeix en la velocitat de reacció. La llargada de la cadena influeix en la interacció  $\text{ROH} \cdots \text{NAD}^+$  i en la interacció  $\text{ROH} \cdots \text{Zn}^{2+}$ .

Així doncs, de tots els alcohols primaris, el metanol és el que es metabolitza més lentament i en la seva oxidació es forma formaldehid i àcid fòrmic, que són totes dues espècies tòxics.

L'etanol es metabolitza majoritàriament al fetge, i en la seva oxidació hi intervenen dos enzims:

- Alcohol deshidrogenasa ( $Zn^{2+}$ ,  $NAD^+$ ) que oxida l'etanol a etanal.
- Aldehid deshidrogenasa que oxida l'etanal a àcid acètic.

A diferència del que passa amb el metanol, que tant l'intermedi com el producte final són tòxics, en el cas de l'etanol tan sols és tòxic l'etanal (l'intermedi). Per altra banda, de les dues etapes per metabolitzar l'alcohol, la segona és la més lenta. És per això que una ingesta elevada d'alcohol pot portar a una certa acumulació d'aldehid, que és un agent vasodilatador.

Hi ha diversos estudis que mostren que la tolerància a l'alcohol de la població d'Àsia de l'est és més baixa que la de la resta de població. La tolerància a l'alcohol depèn de la concentració i bon

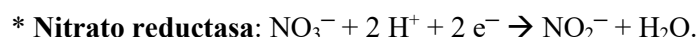
funcionament dels dos enzims involucrats en el seu metabolisme. S'ha vist que molta gent de Corea, Xina i Japó tenen un factor genètic que altera el funcionament d'aquests enzims.<sup>38</sup>

## 15. OXOTRANSFERASES DE MOLIBDÈ I TUNGSTÈ

El molibdè és l'únic element de la segona sèrie de transició que és essencial per gairebé tots els éssers vius. Va ser a començaments del segle XX que es va veure que aquest element era necessari en la fixació del nitrogen, i a mitjans del segle es va constatar que era necessari per tot tipus d'organismes. Forma part de nombrosos enzims que estan involucrats en diferents cicles en la biosfera.

Les oxotransferases són una família d'enzims que, com es pot deduir del seu nom, catalitzen reaccions de transferència d'àtoms d'oxigen. Poden ser reaccions d'oxidació o de reducció, i en tots aquests enzims el centre actiu és similar.

Alguns d'aquests enzims són:



En la reducció de l'anió nitrat es transfereix un àtom d'oxigen des del nitrat al protó per formar aigua. Aquest enzim participa en el cicle del nitrogen, i es troba tant en plantes com en fongs i bacteris.

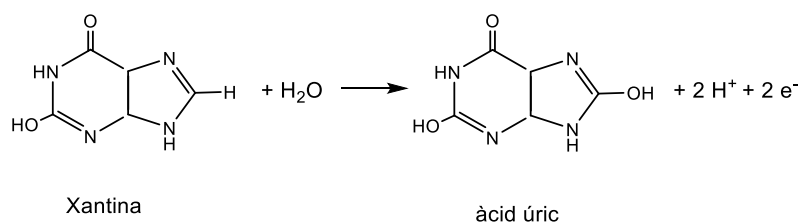


En aquest cas és una oxidació i la transferència de l'àtom d'oxigen va de la molècula d'aigua a l'anió sulfit. Aquest enzim es troba en el fetge de mamífers, i participa en l'etapa final de la degradació dels aminoàcids i compostos que contenen sofre. Una persona adulta elimina aproximadament 1g de sulfats al dia.



Es troba en el fetge de mamífers. Participa en la metabolització de fàrmacs, i també en la segona etapa d'oxidació de l'etanol.

\* **Xantina oxidasa:** Es troba en el fetge i ronyons de mamífers. Participa en l'etapa final del metabolisme de les purines.



En tots aquests enzims hi ha transferència d'un àtom d'oxigen d'un reactiu a l'altre. No s'ha de confondre amb les monooxigenases en les que l'àtom d'oxigen inserit en el substrat prové de la molècula d'oxigen.

### 15.1 Centre actiu

Tots aquests enzims tenen un centre actiu de molibdè, molt similar, tant en els enzims en que es dona una oxidació com en els que hi ha una reducció. En tots ells hi ha un sistema mononuclear de Mo que pot estar en estat d'oxidació VI o IV, segons si ha de catalitzar una reacció d'oxidació o de reducció. El lligand a que està unit el Mo és del tipus pterina, que conté un grup ditiolè, que és per on s'uneix al Mo (Figura 15.1). Tant el grup pterina com el lligand ditiolè poden donar reacció redox, per tant són lligands que participen en el transport d'electrons. A més, hi ha altres proteïnes i molècules que aportaran o extrauran electrons del sistema. En tots aquests enzims es troben proteïnes del tipus [Fe-S], citocroms, i el dinucleòtid FAD..

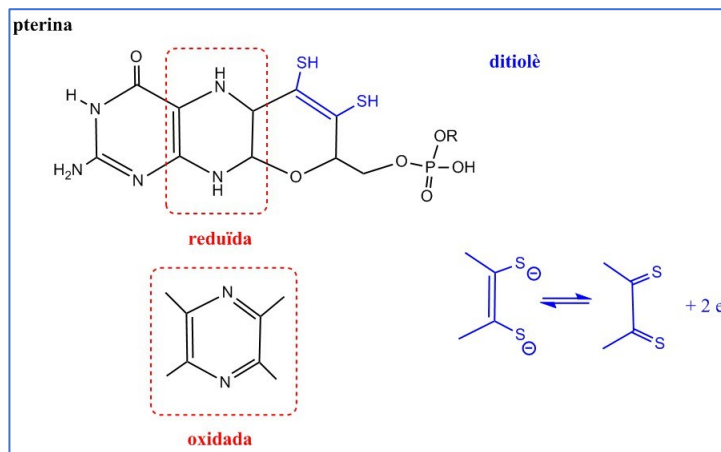


Figura 15.1 Processos redox que es poden donar en el cofactor piranopterina i el grup ditiolè, que és el nexa d'unió al molibdè.

El lligand pterina s'uneix al Mo amb el grup ditiolè, que es desprotona, actuant com a lligand bidentat. En la major part de casos tenen un sol lligand pterina i l'entorn del molibdè en la forma oxidada i reduïda és la que es mostra en la Figura 15.2. En general tenen un grup oxo, algun altre lligand i una posició que pot ser oxo, quan és Mo(VI), o aigua, quan és Mo(IV).

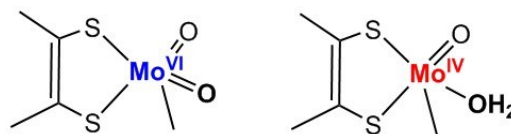


Figura 15.2 Diferència en l'entorn del molibdè en la forma oxidada i reduïda de les oxotransferases.

Quan la reacció que es catalitza és una oxidació, l'enzim ha d'estar en la forma oxidada, Mo<sup>VI</sup> i és el grup oxo el que es transfereix. Quan la reacció catalitzada és una reducció el centre actiu ha d'estar en la forma reduïda, Mo<sup>IV</sup> i la molècula d'aigua, que és un lligand làbil, se substitueix pel substrat. Per tant, el mateix tipus de centre actiu serveix pels dos tipus de reaccions i hi ha un flux d' electrons, en un o l'altre sentit, entre els sistemes de transport i el substrat, passant pel sistema Molibdopterina, com es pot veure en la Figura 15.3.

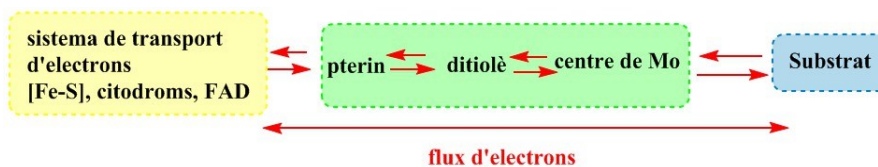


Figura 15.3 Flux d'electrons en les oxotransferases de molibdè.

## 15.2 Nitrato reductasa

Com ja s'ha comentat, aquest enzim catalitza la reducció del nitrat a nitrit. Per tant, a més del canvi en l'estat d'oxidació del nitrogen, aquest anió perd un oxigen. Com que cal reduir el substrat el centre de reacció ha de ser ric en electrons, és a dir que ha d'estar en la forma Mo<sup>IV</sup>, a més ha de poder coordinar al substrat per tant ha de tenir el lligand làbil. És a dir que la reacció té lloc quan l'enzim es troba en la forma Mo<sup>IV</sup>-OH<sub>2</sub>. El mecanisme de la reacció és mostra en la Figura 15.4.



En el procés de regeneració de l'enzim es detecta un senyal RSE, el que indica que passa per un intermedi  $\text{Mo}^V$ . Aquesta espècia té una configuració electrònica  $d^1$ , que és un radical, i té un espín electrònic  $S = 1/2$ , fet que justifica la presència de senyal RSE.

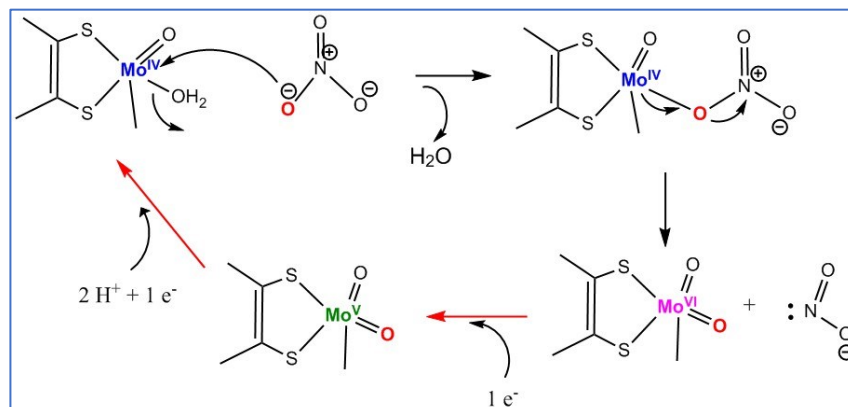


Figura 15.4 Mecanisme de reacció de la nitrato reductasa.

### 15.3 Sulfito oxidasa

En el cas de la sulfito oxidasa, hi ha l'oxidació del substrat, per tant cal que el centre de reacció estigui en la forma oxidada,  $\text{Mo}^{VI}$  i que pugui transferir un "oxo" al sulfit, que té un parell d'electrons solitaris. El mecanisme es mostra en la Figura 15.5, A l'igual que en la nitrato reductasa, en el procés de regeneració de l'enzim es detecta la presència d'un radical, en el espectre de RSE, que correspon a la formació d'un intermedi de  $\text{Mo}^V$ .

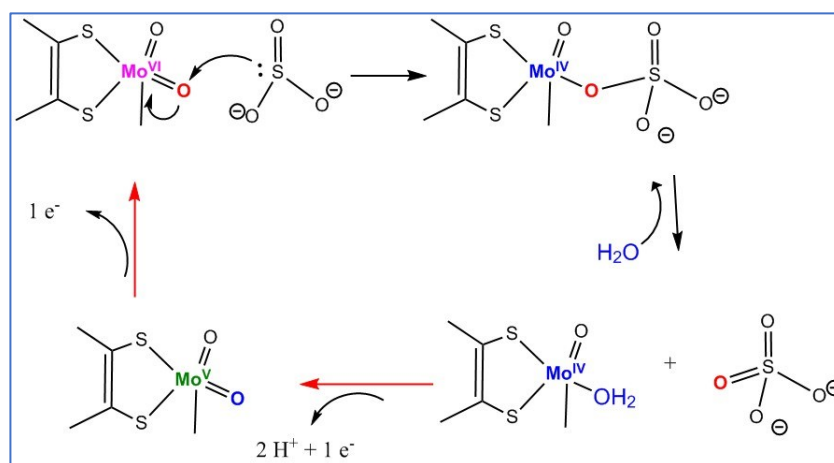


Figura 15.5 Mecanisme de reacció de la sulfito oxidasa.

## 15.4 Xantina oxidasa

La xantina oxidasa és l'enzim que catalitza la reacció d'oxidació de la xantina a àcid úric. Aquesta reacció es dona en el fetge, en mamífers. Quan es forma un excés d'àcid úric es pot dipositar, en forma àcida o de sal sòdica, en les articulacions i teixits; una malaltia derivada d'aquesta acumulació de cristall d'àcid úric és la gota. En alguns casos el tractament que es dona consisteix en inhibidors de l'enzim xantina oxidasa.

El mecanisme de reacció d'aquest enzim és lleugerament diferent als de les altres oxotransferases de molibdè. Hi ha dos aspectes diferencials:

- La inserció de l'oxigen es dona en un enllaç C-H (Figura 15.6).
- L'entorn del  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  és lleugerament diferent: conté un enllaç  $\text{Mo}=\text{S}$  (substituint un  $\text{Mo}=\text{O}$ ) i hi ha un lligand  $\text{OH}^-$ , ambdós lligands involucrats en el procés (Figura 15.6).

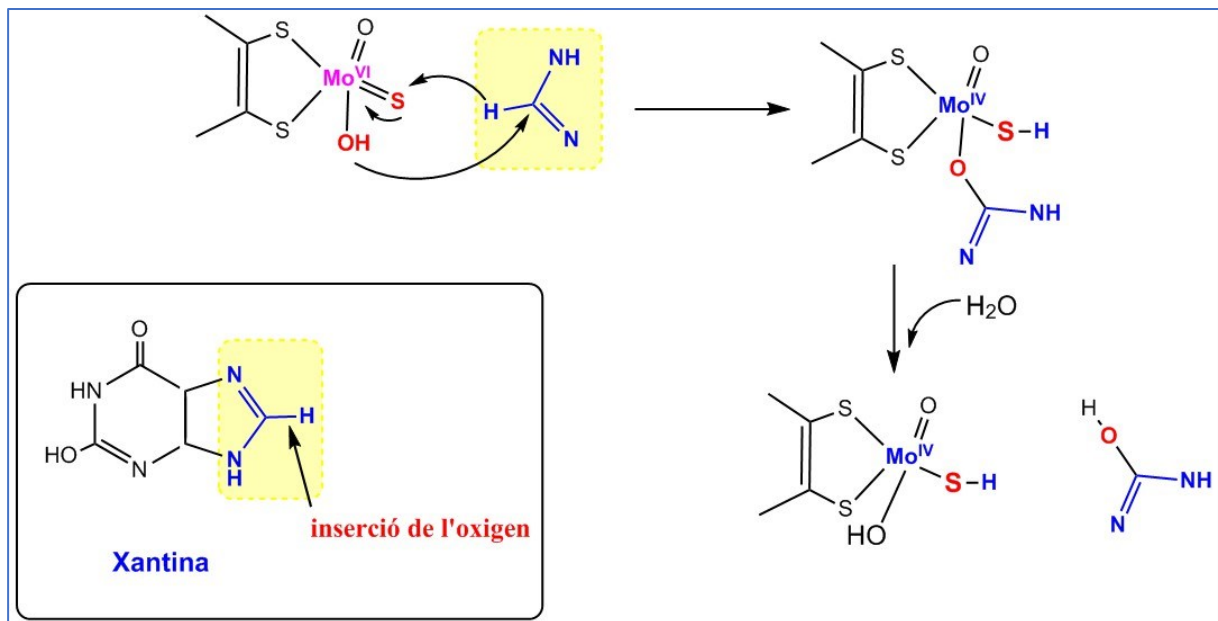


Figura 15.6 Mecanisme de reacció de la xantina oxidasa.

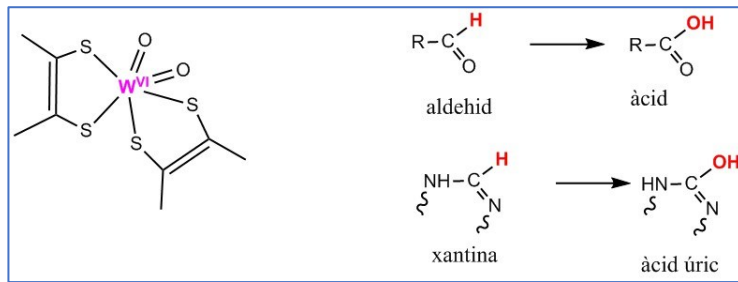
## 15.5 Oxotransferases de Tungstè

En els organismes aeròbics les oxotransferases contenen molibdè en el centre actiu, però no així els organismes anaeròbics, que tenen un centre actiu similar però de tungstè.

El tungstè és poc abundant en les aigües i l'escorça de la terra, per tant poc disponible, però hi ha alguns medis on la seva concentració és més gran: en llacs salats que tenen un pH bàsic, en aigües termals, en aigües que provenen d'erupcions volcàniques, etc. Per tant, hi ha uns entorns on la concentració de W és més gran que la de Mo, i en la que hi ha poca quantitat d'oxigen. En aquest medi hi viuen una sèrie de microorganismes anaeròbics, que tenen oxotransferases de tungstè. Aquest enzim s'inactiva en presència d'oxigen.

Un d'aquests enzims és l'aldehid oxidoreductasa. El seu centre actiu conté dos lligands pterina. La reacció de  $\text{RCHO}$  a  $\text{RCOOH}$  és en certa forma similar a la oxidació de la xantina oxidasa, ja que s'insereix un oxigen en un enllaç C-H per això es proposa un mecanisme similar.

En la Figura 15.7 es pot veure el centre de reacció d'una oxotransferasa de tungstè així com la similitud entre l'aldehid i la xantina.



*Figura 15.7 Centre actiu de l'oxotransferasa de tungstè del Pyrococcus Furiosus i la comparació entre un aldehyd i la xantina i els seus productes de reacció.*

## 16. IONS METÀL·LICS QUE TENEN UN PAPER ESTRUTURAL

Es diu que un ió metàl·lic té un paper estructural quan l'estructura terciària de la proteïna, la seva disposició a l'espai, depèn de l'ió metàl·lic al que està coordinada. Ens aquest capítol ens centrem en el cas del **Zn**, **K**, i **Ca**.

El  $Zn^{2+}$  és un catió molt versàtil. Per una banda, el fet de no ser molt polaritzant (catió no massa dur) fa que tant es pugui coordinar a bases toves (S), dures (O) o intermèdies (N). Per altra banda, en tenir una configuració electrònica  $d^{10}$  fa que l'energia d'estabilització del camp cristal·lí sigui nul·la, és a dir, que no té preferència per un determinat NC i geometria. A més, no pot donar reaccions redox i tampoc pot generar radicals. Així doncs, si té un entorn que el fa polaritzant pot generar el nucleòfil i catalitzar reaccions d'hidròlisi, però també pot enllaçar-se a proteïnes i conferir-los-hi una disposició a l'espai determinada i fonamental.

En canvi el  $Ca^{2+}$ , tot i ser del mateix grup de la taula periòdica que el  $Mg^{2+}$  difereix d'aquest en el radi, i conseqüentment, en el seu poder polaritzant. Mentre que el  $Mg^{2+}$  es caracteritza per catalitzar reaccions d'hidròlisi, el  $Ca^{2+}$  no es troba en gaires enzims hidrolítics. La interacció del  $Ca^{2+}$  amb les proteïnes és més feble i per tant es pot mobilitzar més fàcilment, fet que li confereix una funció com a missatger. .

### 16.1 Telòmers de l'ADN

En l'extrem final dels cromosomes, per tancar la doble hèlix, hi ha els telòmers de l'ADN. El plegament de les dues cadenes d'ADN per fer l'acabament és un fragment ric en bases guanina i és aquí on juga un paper clau el  $K^+$  estabilitzant l'estructura. Quatre bases nitrogenades guanina interaccionen entre elles per enllaços per pont d'hidrogen creant una capa amb una cavitat central (Figura 16.1). L'apilament de diverses capes d'aquest tipus genera una sèrie de buits cúbics on es coordina el  $K^+$ . Cada  $K^+$  queda envoltat de 8 oxígens (un de cada base nitrogenada). A diferència del  $Na^+$  que tan sols pot tenir NC = 6, el  $K^+$  en ser més voluminós, és estable amb NC = 8.

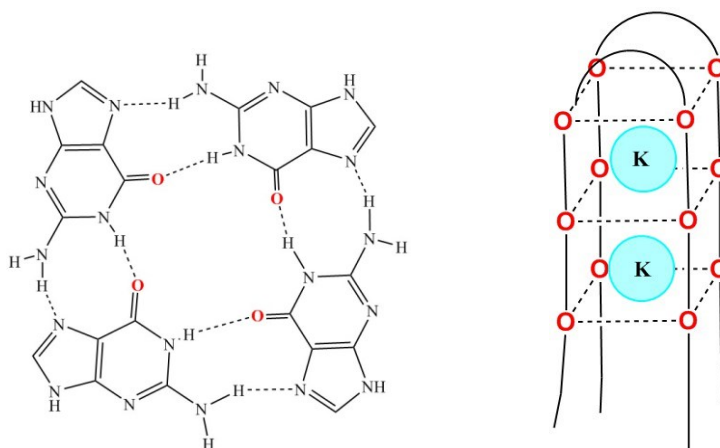


Figura 16.1 Interacció entre 4 bases de guanina en els telòmers de l'ADN (esquerra) apilament d'aquestes bases generant cavitats cúbiques on es coordina el  $K^+$ .

### 16.2 Dits de zinc

Hi ha una família de proteïnes que es coneixen amb el nom de dits de zinc, per la forma que adquireix la proteïna quan coordina aquest ió.

Que el Zn és un element essencial ja s'havia establert amb el descobriment dels enzims hidrolítics que contenen aquest ió en el seu centre actiu. Ara be, també s'havia observat que aquest ió és essencial pel

creixement i que es troba en una concentració elevada en l'aparell reproductor. Això posava de manifest que a part de la seva funció en enzims tenia algun altre rol relacionat amb la transferència de la informació genètica.

Va ser a començaments de la dècada de 1980 quan es van poder identificar unes proteïnes que reconeixien una seqüència de bases de l'ADN i que regulaven la transcripció genètica.

El procés de transcripció consisteix en la síntesi de l'ARN missatger (ARNm) que és el que porta la informació per la síntesi de les proteïnes (quins aminoàcids hi ha i en quin ordre estan col·locats). Aquest procés té lloc en el nucli cel·lular, i està catalitzat per la ARN polimerasa.

Les proteïnes anomenades dits de zinc participen en la transcripció. Aquest procés no es dona tan sols per la interacció entre l'ADN i la ARN polimerasa, sinó que interacciona també la proteïna de zinc. Així que es va poder veure que el que es coneixien com factors de transcripció genètica, en realitat eren proteïnes dits de zinc.

En les primeres proteïnes d'aquest tipus que es van caracteritzar es va veure que tenien un patró comú en la seqüència d'aminoàcids:



Hi ha dos aminoàcids cisteïna separats per un fragment que varia, i pot tenir entre 2 i 4 aminoàcids. Hi ha un zona en la que hi ha dos histidines separades per 3 o 4 aminoàcids que varien d'una proteïna a l'altra. Les cisteïnes i les histidines seran els punts de coordinació de la proteïna al  $\text{Zn}^{2+}$ . En la part central hi ha un grup format per 5 aminoàcids que són els que tenen un paper rellevant en la transcripció, i que estan flanquejats per una fenilalanina i una leucina.

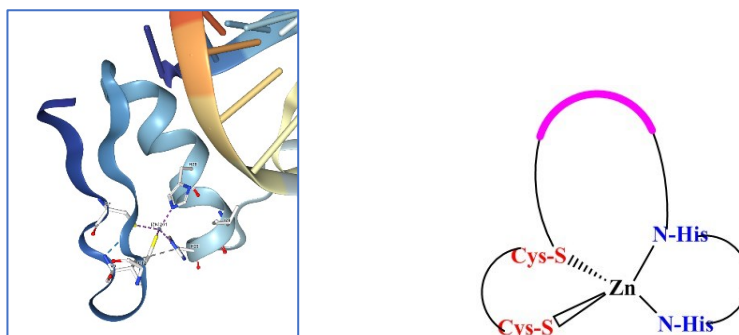


Figura 16.2 Proteïna dit de zinc (Codi PDB: 1ZAA). Esquema del centre actiu: en color fúcsia el fragment de la proteïna que interacciona amb l'ADN.

Abans de la resolució estructural s'havien fet estudis substituint el  $\text{Zn}^{2+}$  per  $\text{Co}^{2+}$  i s'havia vist que l'entorn de l'ió metàl·lic és tetraèdric.

La confirmació del paper estructural del  $\text{Zn}^{2+}$  en aquesta proteïna es va determinar en veure que quan es tractava amb el lligand polidentat  $\text{EDTA}^{4-}$  no hi havia transcripció. Aquest lligand és un bon agent quelant, que segresta el  $\text{Zn}^{2+}$  de la proteïna. En perdre la forma de dit no hi ha la interacció amb les bases de l'ADN.

En el procés de la transcripció l'ADN a més d'interaccionar amb l'ARN polimerasa interacciona amb la proteïna dit de zinc. Tres aminoàcids del dit interaccionen (reconeixen) tres parells de bases de l'ADN que és el que codifica la informació per la síntesi d'un aminoàcid. En la Figura 16. 3 es pot veure la disposició de la proteïna de Zn i l'ADN.

Hi ha unes interaccions entre els aminoàcids del dit de la proteïna i les bases nitrogenades de l'ADN que poden ser de tipus electroestàtic i/o per enllaços per pont d'hidrogen. Hi ha unes interaccions preferents com es mostra en la Figura 16.3.

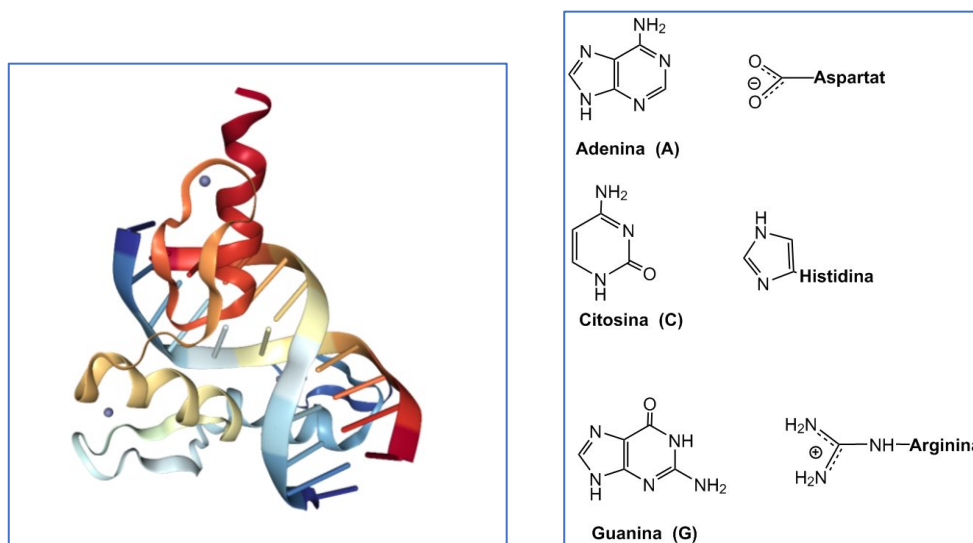


Figura 16.3 Interacció entre una proteïna dit de zinc i l'ADN (Codi PDB: 1ZAA). Interaccions preferents base nitrogenada (ADN)-aminoàcid (dit de zinc).

S'ha vist que aquesta família de proteïnes també interacciona amb l'ARN i amb proteïnes. A més, s'ha vist que hi ha altres tipus de dominis, diferents al que s'havia trobat inicialment  $(\text{ZnCys-S})_2(\text{N-His})_2$ . El  $\text{Zn}^{2+}$  es pot trobar unit a 4 Cys-S<sup>-</sup> o formant centres dinuclears amb dos Cys-S<sup>-</sup> actuant com a lligands pont. En tots els casos l'entorn del centre metàl·lic és tetraèdric.

## 16.2 Cromodulina

La cromodulina és una proteïna que està involucrada en el **transport de la glucosa**, concretament en el pas d'aquesta molècula a través de la membrana cel·lular.

La glucosa que s'ingereix amb els aliments arriba a la sang, i després ha d'entrar a les cèl·lules que és on és necessària. Quan augmenta la concentració de glucosa a la sang, s'allibera insulina de la reserva i per tant augmenta la concentració d'insulina que és la molècula que regula l'entrada de la glucosa a l'interior cel·lular. Ara be, per això es necessita també el **crom**.

Quan es pateix diabetis la concentració de glucosa en sang i en l'orina és elevada però en canvi a l'interior cel·lular la seva concentració és baixa. És a dir que tot i haver ingerit suficient quantitat de sucres no creuen la membrana cel·lular.

L'any 1955 es va veure que el crom estava involucrat en el metabolisme de la glucosa. Llavors es parlava del Factor de Tolerància de la Glucosa, FTG. La seva caracterització estructural no ha sigut senzilla, ja que el  $\text{Cr}^{\text{III}}$  (l'estat d'oxidació més estable d'aquest element) forma complexos força làbils i perd fàcilment els lligands.

El crom és un element essencial, però en quantitats molt baixes. Una persona que pesi uns 60 Kg requereix d'uns 0,06 mg de crom. És una quantitat molt petita però fonamental. Aquest element s'incorpora a través de la dieta, però el problema és que forma compostos de coordinació molt làbils, és a dir que es descoordinen fàcilment, i en el refinat de molts productes es perd bona part d'aquest element essencial. Per exemple, 1 g de sucre (sense refinar) conté 0,16 µg de crom, en canvi 1 g de sucre refinat

conté tan sols 0,02 µg de crom. Passa el mateix amb el blat, que hi ha una disminució significativa en el contingut de crom després de refinar.

Cal tenir present que el crom és essencial en el seu estat d'oxidació més estable, Cr<sup>III</sup>, però en el seu estat d'oxidació elevat, Cr<sup>VI</sup>, és un agent oxidant i per tant potencialment tòxic.

La cromodulina és la proteïna que coordina al Cr<sup>III</sup>. Té quatre cavitats en les que s'uneix aquest ió metàl·lic i presenta efecte cooperatiu: és a dir que la coordinació d'un ió provoca un petit canvi en la conformació de la proteïna i s'afavoreix la coordinació del següent. Se l'hi va donar aquest nom per la semblança amb la calmodulina, una proteïna de calci que pot enllaçar 4 ions Ca<sup>2+</sup> i presenta efecte cooperatiu.

L'apocromodulina (la cromodulina que no té el Cr<sup>III</sup> coordinat) es troba en l'interior cel·lular. Quan augmenta la concentració d'insulina en el medi aquesta molècula interacciona amb un receptor de la membrana cel·lular, per l'exterior, i s'activa el transport del Cr<sup>III</sup> cap a l'interior cel·lular (Figura 16.5).

L'ió Cr<sup>III</sup> és similar al Fe<sup>III</sup> per tant pot ser transportat amb la mateixa proteïna, la transferrina, cap a l'interior de la cèl·lula. Un cop a dins té una gran afinitat per l'apocromodulina i es coordina a ella. Un cop coordinat, la cromodulina carregada amb els ions Cr<sup>III</sup> té les característiques idònies per interaccionar amb el receptor de membrana on està interaccionant la insulina. La interacció amb el receptor de membrana, per l'exterior la insulina, i per l'interior la cromodulina, provoca l'obertura del canal de la glucosa i la seva entrada a l'interior cel·lular.

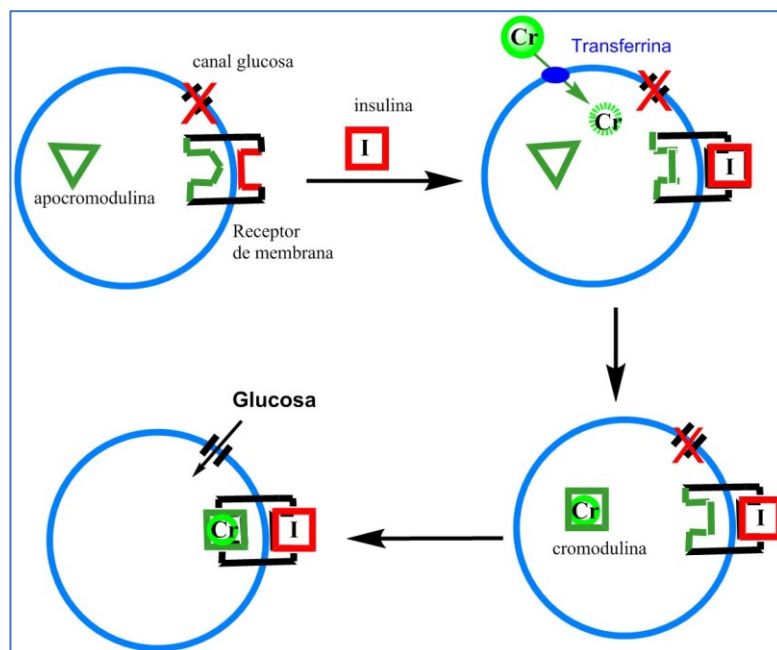


Figura 16.5 Mecanisme d'actuació de la cromodulina en el transport de glucosa.

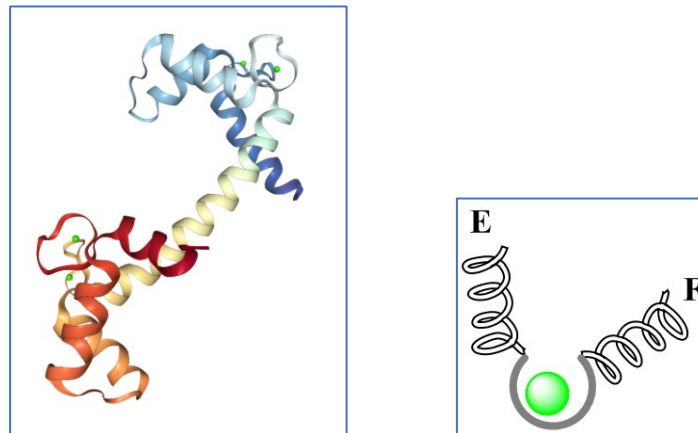
Per tant, fins que no es coordina el Cr<sup>III</sup> no es provoca el canvi estructural necessari perquè pugui interaccionar amb el receptor de membrana. Per això es diu que l'ió metàl·lic té un paper estructural.

### 16.3 Proteïnes de calci en forma de ma EF

Hi ha una gran família de proteïnes amb característiques estructurals similars, que són les proteïnes en forma de ma-EF. Tenen funcions molt diverses, i aquí ens centrem en dues d'elles. La calmodulina i la troponina C. El nom prové de la forma en que es va descriure l'estructura cristal·lina de la primera

d'aquestes proteïnes que es va caracteritzar. La cavitat on es coordina el  $\text{Ca}^{2+}$  correspondria al palmell de la ma, i els dits polze i índex serien els dos fragments de cadena E i F.

Aquesta proteïna té dues regions on es coordina el  $\text{Ca}^{2+}$  separades per un fragment flexible. En cadascuna d'aquestes regions hi ha dues cavitats on es coordinen aquests ions (Figura 16.6).

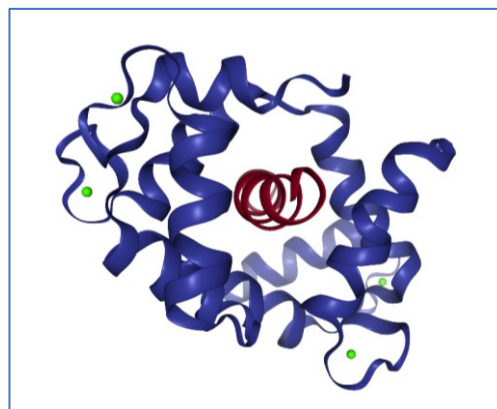


*Figura 16.6 Estructura de la calmodulina (codi PDB: 1up5). Les quatre cavitats on es coordina el  $\text{Ca}^{2+}$  estan ocupades (esferes verdes).*

En aquestes proteïnes l'entorn del  $\text{Ca}^{2+}$  és octaèdric; està unit a sis àtoms d'oxigen de grups carboxilat, per tant aniónics, i de grups carbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) neutres. En general, tenen 2  $\text{Ca}^{2+}$  coordinats i en poden coordinar dos més, és a dir que passen de la forma que conté 2  $\text{Ca}^{2+}$  a la totalment plena, que conté 4  $\text{Ca}^{2+}$ .

Aquestes proteïnes són molt sensibles a la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medi. En principi la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$  és baixa mentre que a l'exterior cel·lular i en diversos orgànuls cel·lulars és alta. Per efecte d'algun estímul el calci es mobilitza, o bé des de la reserva o bé des de l'exterior cel·lular, de forma que la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$  augmenta i s'uneix a una proteïna ma-EF i el canvi conformacional que l'hi confereix provoca una resposta.

En el cas de la calmodulina és una proteïna que pot interaccionar amb altres proteïnes i enzims: Quan coordina al  $\text{Ca}^{2+}$  pot interaccionar amb determinats enzims i activar-los. Per això es diu que el calci té un paper com a missatger.



*Figura 16.7 Estructura d'una calmodulina (blau fosc) interaccionant amb un pèptid (marró) que simula la interacció amb un enzim (Codi PDB: 2L7L). Les esferes verdes representen el calci.*



En el cas de la **troponina C** (una altra proteïna en forma de ma-EF) la coordinació del calci provoca la contracció muscular. En el teixit muscular hi ha dos tipus de filaments:

- Filament gruixut, que té uns 15 nm de diàmetre, s'anomena **Miosina**. Aquest filament té uns caps on hi ha l'ATP.
- Filament prim, té uns 9 nm de diàmetre i s'anomena **Actina**. Enrotllat sobre aquesta fibra d'actina hi ha la proteïna tropomiosina. I en diversos punts d'aquest enrotllament hi ha el complex format per un grup de proteïnes anomenades troponines.

La contracció muscular té lloc quan el filament gruixut i el prim es toquen. Quan el cap de la miosina entra en contacte amb l'actina es dona la hidròlisi de l'ATP (que requereix de la presència del  $Mg^{2+}$ ) i provoca la contracció del teixit muscular. El nom d'actina ve de que activa la hidròlisi de l'ATP (Figura 16.8).

Les troponines (Tn) és un conjunt de quatre proteïnes que estan juntes i que tenen diferents funcions:

- TnT: és la proteïna que regula el punt d'unió d'aquest conjunt de proteïnes (Tn) a la tropomiosina (la proteïna enrotllada sobre l'actina).
- TnI: inhibidor. Evita el contacte entre el filament gruixut i el filament prim. És a dir evita la contracció muscular.
- **TnC**: aquesta és la troponina C, la que pertany a la família de les proteïnes en forma de **ma-EF**.

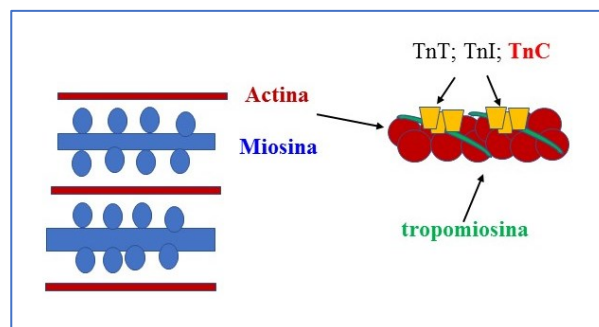


Figura 16.8 Esquema dels components del teixit muscular involucrats en la contracció.

Quan cal que hi hagi contracció d'un múscul, s'activa la mobilització del  $Ca^{2+}$  de manera que a l'interior de les cèl·lules musculars augmenti la concentració d'aquest ió que es coordina a la troponina C. En repòs té coordinats dos ions i quan coordina els altres dos, el canvi conformacional que es dona en la part flexible d'aquesta proteïna, provoca el desplaçament de la troponina inhibidora (TnI); quan passa això entren en contacte els dos filaments gruixut (miosina) i prim (actina). Com a resultat hi ha la contracció.

En les cèl·lules del teixit muscular el reticle endoplasmàtic rep el nom de reticle sarcoplasmàtic i és on hi ha la reserva de calci de la cèl·lula. Quan ha d'augmentar la concentració de  $Ca^{2+}$  en el medi pot mobilitzar-se des del reticle sarcoplasmàtic.

#### 16.4 Paper del calci en la coagulació de la sang

El calci juga un paper important també en el procés de coagulació de la sang. Aquest és un procés complex que es dona en diverses etapes. Una d'aquestes etapes consisteix en la hidròlisi i trencament de la cadena de protrombina per alliberar el fragment corresponent a la trombina.

La protrombina en la regió amino-terminal és rica en aminoàcids del tipus  $\gamma$ -carboxiglutamat Gla- $(\text{CO}_2^-)_2$ ; aquest aminoàcid es caracteritza per tenir dos grups carboxilat. Per tant la regió amino-terminal d'aquesta proteïna és rica en grups carregats negativament, pels que el  $\text{Ca}^{2+}$  tindrà gran afinitat. La interacció d'aquests ions amb la protrombina modifica lleugerament l'estructura de la proteïna i això comporta la hidròlisi i alliberament del fragment trombina (Figura 16.9).

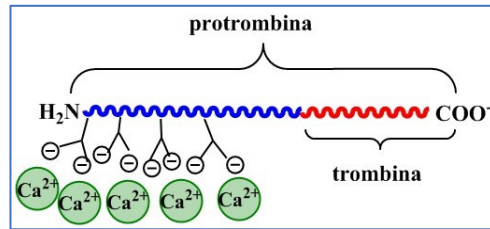


Figura 16.9 Paper del  $\text{Ca}^{2+}$  en el trencament de la protrombina per donar la trombina. Interacció amb els residus carboxiglutamat,  $\text{Gla}-(\text{CO}_2^-)_2$ .

## 17. MISSATGERS CEL·LULARS

### 17.1 Proteïnes de calci

Com s'ha comentat en l'apartat anterior quan les proteïnes ma-EF coordinen al  $\text{Ca}^{2+}$  provoquen una resposta, que pot ser física, com la contracció muscular o indirecta, com és l'activació d'enzims per part de la calmodulina. Per exemple, participa en l'activació de quinases, que són enzims responsables de la fosforilació de proteïnes.

Tot i que en general parlem dels diferents processos i centres actius de forma aïllada, en realitat no és així, hi ha moltes connexions entre ells. Per exemple, la  $[\text{Na}^+]$  i  $[\text{Ca}^{2+}]$  van lligades, ja que hi ha canals on s'intercanvien aquests ions: entren ions  $\text{Na}^+$  cap a l'interior cel·lular i s'extreuen ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

La digitàlia és un fàrmac que s'administra quan es té una angina de pit. El que fa és bloquejar la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Cal recordar que aquesta bomba extreu el  $\text{Na}^+$ , per tant si es bloqueja la bomba, la  $[\text{Na}^+]$  al citosol augmenta. I de retruc l'intercanviador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es veu afectat: no entra més  $\text{Na}^+$  i per tant no s'extreu el  $\text{Ca}^{2+}$ . Per tant, el resultat de bloquejar la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  és que la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el citosol augmenta i per tant s'afavoreix la seva coordinació a la troponina C estimulant la contracció muscular, o sigui el batec del cor.

El paper del calci com a missatger és degut a que la interacció del  $\text{Ca}^{2+}$  amb les proteïnes ma-EF és relativament feble, comparat amb les interaccions que dona l'ió  $\text{Mg}^{2+}$  ja que el seu radi és més gran. Això permet que es coordini i descoordini amb facilitat, mobilitzant-se ràpidament i permetent una resposta també ràpida.

### 17.2 Molècula de NO

Actualment no es pot parlar de bioinorgànica sense parlar de la molècula de monòxid de nitrogen. Aquest compost és un gas a temperatura ambient i té una sèrie de característiques que el fan altament perjudicial per la vida. Ara bé, en la dècada del 1980 es va descobrir que té un paper fonamental en el cos humà com a missatger.

El NO, que és un gas incolor, reacciona fàcilment amb l'oxigen de l'aire per donar un gas de color marró ataronjat, que és el diòxid de nitrogen:  $2 \text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2$ .

La molècula de NO té un nombre senar d'electrons i per tant, queda un electró desaparellat en un orbital  $\pi^*$ , així que és un radical. Com passa amb els altres radicals, tendeix a trencar enllaços covalents generant nous radicals. Per altra banda, pot reaccionar amb altres radicals com és l'anió superòxid formant l'anió peroxonitrit que té un elevat potencial de reducció i és altament oxidant:  $\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONO}_2^-$ .

Una altra característica que fa que la molècula de NO sigui altament tòxica és que s'assembla a la molècula de  $\text{O}_2$ . Ambdues poden actuar com lligand  $\pi$ -àcid i per tant competir per la coordinació al  $\text{Fe}^{\text{II}}$ -hemo de l'hemoglobina, mioglobina o citocrom  $\text{P}_{450}$ . Per altra banda, la forma oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) en presència de NO s'oxida, passant el  $\text{Fe}^{\text{II}}$  a  $\text{Fe}^{\text{III}}$ :  $\text{Hemo-Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{Hemo-Fe}^{\text{III}} + \text{NO}_3^-$ .

També s'ha observat que s'oxida fàcilment a  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}_3^-$ . En estudis realitzats amb animals s'ha trobat que quan pateixen un procés infecció la  $[\text{NO}_2^-]$  i  $[\text{NO}_3^-]$  augmenta, per això es pensa que el NO pot tenir algun paper en el sistema immunològic.

Per tant, durant anys se sabia dels efectes nocius d'aquest gas en el cos humà, però es desconeixia que podia ser essencial.

A finals del segle XIX ja s'havia vist que la trinitroglicerina (Figura 17.1) anava be quan es tenia una angina de pit. Quan es té una angina de pit, arriba poca sang al teixit del cor, i això és degut a un problema en les artèries coronàries que son les que transporten la sang (i l'oxigen) cap allà.

Alfred Nobel va ser l'inventor de la dinamita; la nitroglicerina és un líquid a temperatura ambient, altament explosiu. Per facilitar el seu transport evitant riscos d'explosió va tenir la idea de barrejar la trinitroglicerina amb un material porós i inert que l'absorbís, com és la sílice. S'explica que Alfred Nobel va patir una angina de pit i van haver d'administrar-li nitroglicerina.

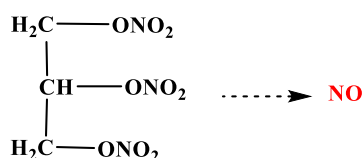


Figura 17.1 Trinitroglicerina.

El fet experimental és que la trinitroglicerina fa arribar més sang al cor, ja que hi ha un cert relaxament muscular al voltant de les artèries. Ara be, no va ser fins a la dècada del 1970 que es va poder determinar que la molècula responsable d'aquest fet era el monòxid de nitrogen, i que aquest provenia de la trinitroglicerina.

Això va portar a plantejar la idea de que en els vasos sanguinis hi havia un centre que provocava la relaxació dels teixits del voltant. A aquest centre se'l va anomenar Factor de Relaxament Muscular derivat de l'endoteli. Les paret interior del vas sanguini està recoberta pel teixit endotelial. Finalment, l'any 1986 es va veure que en realitat era la molècula de NO la responsable de la dilatació de les artèries.

El premi Nobel de medecina de l'any 1998 va recaure en tres investigadors, L. J. Ignarro, F. Furchgott i F. Murad, que estudiaven el paper del NO en els éssers vius.

Un cop es va confirmar que el NO era fonamental calia trobar com se sintetitzava en l'organisme. L'enzim responsable de la síntesi del NO s'anomena NO sintasa. Aquest enzim s'ha trobat en diferents punts i es coneixen diferents NO sintases (NOS):

- En el citosol hi ha la neuronal (nNOS) i la induïble per medi d'un estímul (iNOS).
- En la membrana endotelial hi ha la eNOS.

La síntesi del NO es dona en dues etapes, en les que hi ha la inserció d'un àtom d'oxigen provinent de la molècula de O<sub>2</sub> (Figura 17.2). A partir de l'arginina s'obté la citrul·lina i el NO.

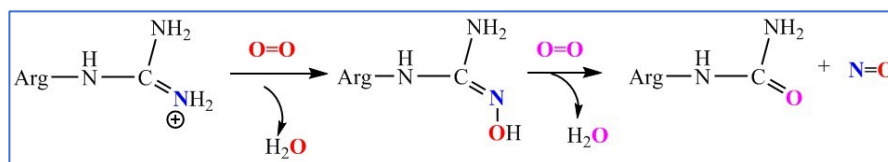


Figura 17.2 Reacció d'obtenció de la molècula de NO a partir de l'arginina.

L'enzim NOS té dos regions ben diferenciades: en una part hi ha els sistemes de transport d'electrons i en l'altra hi ha el centre de reacció (Figura 17.3). El centre de reacció té un grup Fe-hemo, que ja s'ha vist que és un bon centre actiu per coordinar la molècula d'oxigen i activar-la trencant l'enllaç O=O i facilitant la inserció d'un "O" a un substrat. Proper al centre actiu hi ha també la molècula tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>).

A l'igual que passa en el citocrom P<sub>450</sub>, que és una monooxigenasa, cal que arribin electrons al centre de reacció, (Fe-hemo). Aquests electrons venen a través dels mono i dinucleòtids FAD i FMN. Ara be, el responsable de que els electrons circulin és una calmodulina.

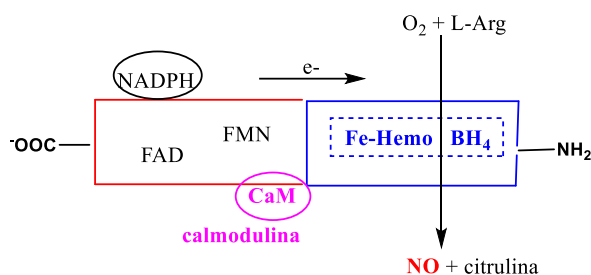


Figura 17.3 Esquema de l'enzim NO sintasa.

Com ja s'ha comentat la calmodulina (CaM) és una proteïna en forma de ma-EF que quan s'hi coordinen ions  $\text{Ca}^{2+}$  provoquen un petit canvi estructural que activa enzims. Per això es diu que el calci té un paper de missatger. En aquest cas, quan es requereix la formació del NO, s'activa l'alliberament del  $\text{Ca}^{2+}$  de la reserva i augmenta la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$ . Es coordina a la calmodulina i això provoca una cert interacció amb la NO sintasa. Aquesta interacció provoca un petit canvi estructural que afavoreix el pas dels electrons i la síntesi del NO.

La molècula de NO és petita i per tant pot difondre ràpidament. Com que és molt reactiva el seu temps de vida mig és molt curt, de l'ordre de 5–10 segons. El fet de que difongui ràpidament és el que l'hi confereix el rol de missatger: facilita la comunicació inter i intracel·lular i activa diversos enzims.

El paper que juga el NO en la dilatació dels vasos sanguinis es deu a que provoca l'activació de l'enzim guanilciclasa. Aquest enzim catalitza la conversió del trifosfat de guanosina (GTP) en el monofosfat cíclic de guanosina (cGMP). Aquesta molècula és un missatger que activa un altre enzim, una quinasa, que regula els canals cel·lulars del calci i extreu el calci del citosol. Per tant la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{citosol}}$  disminueix i això afavoreix que es descoordini de la troponina C, i hi hagi la relaxació muscular (Figura 17.4).

En el teixit endotelial es genera el NO que difon cap a l'interior dels vasos sanguinis i cap a l'exterior, cap al teixit muscular que l'envolta. Per tant en arribar a aquest teixit el NO s'activen els enzims, disminueix la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  i hi ha la relaxació d'aquest teixit, el que comporta una certa dilatació del vas sanguini, que afavoreix la circulació i fa disminuir la pressió sanguínia.

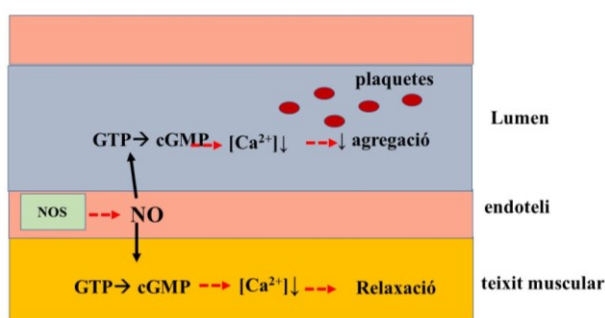


Figura 17.4 Representació esquemàtica de l'efecte del NO en els vasos sanguinis.

Per altra banda, el NO també difon cap a l'interior del vas sanguini, l'espai anomenat lumen. S'activa també la formació del missatger cGMP i la regulació de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en el medi. En disminuir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  disminueix l'agregació de les plaquetes.

Per tant, el NO és una molècula essencial, que degut a la seva elevada reactivitat se sintetitza en el moment que es requereix. La seva activitat està relacionada amb la regulació de la  $[Ca^{2+}]$ , però al mateix temps, en la seva síntesi es requereix de la proteïna de calci, calmodulina.

### 17.3 Paper del iode

El iode és un element essencial. El 80% del iode en el cos humà es troba localitzat a la glàndula tiroides, formant part de les hormones tiroides. Aquestes hormones se sintetitzen a partir de la tironina, un aminoàcid derivat de la tirosina (Figura 17.5).

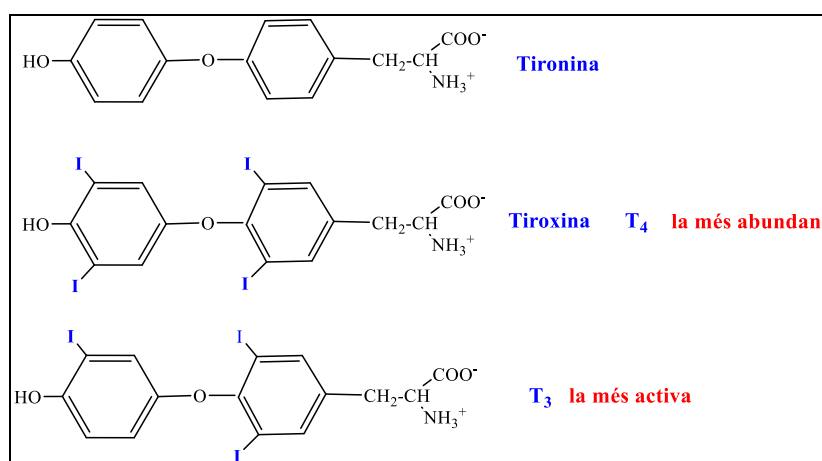


Figura 17.5 Hormones tiroides

Les diferents formes iodades de la tironina són les hormones tiroides. La forma més abundant és la T<sub>4</sub>, és a dir la que s'ha iodat en les 4 posicions veïnes al oxigen fenòlic, mentre que la T<sub>3</sub> és la que té major activitat biològica.

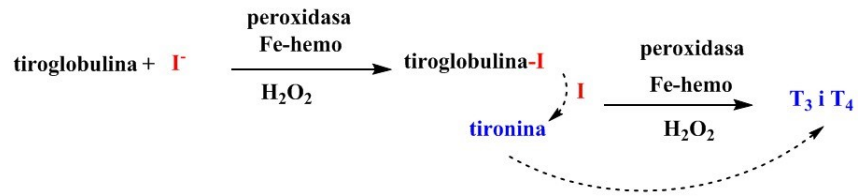
Aquestes hormones regulen el metabolisme basal, ja que regulen diferents gens. La interacció entre la T<sub>3</sub> i un receptor nuclear permet que aquest conjunt s'acobli a una zona específica de l'ADN nuclear i s'activin una sèrie de gens específics.

S'havien fet diversos estudis per veure quin paper té el iode en aquestes molècules. Es va veure que la substitució de 3 Iodes per 3 Metils o d'un Iode per 1 i-propil no afectava significativament a l'activitat. Per tant, per quina raó es requereix el iode en aquestes molècules? Hi ha dues possibles hipòtesis:

- Qui sigui per efectes estèrics, ja que la substitució per Me o grups de volum similar no afecta a l'activitat biològica. Si és així, vol dir que hi ha un receptor que reconeix el volum d'aquests substituents.
- Una altra possibilitat és que sigui més fàcil iodar els derivats fenòlics que metilar-los.

El procés de síntesi d'aquestes hormones consta de dues etapes que es mostren de forma esquemàtica en la Figura 17.6.

- Inserció del iode a la proteïna tiroglobulina, Aquest procés ve catalitzat per una peroxidasa (utilització del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com agent oxidant) amb un centre actiu Fe-hemo. La proteïna iodada Tiroglobulina-I és la reserva de iode.
- La segona reacció és la transferència del iode de la proteïna reserva (tiroglobulina-I) a la tironina. Aquesta reacció també ve catalitzada per la peroxidasa Fe-hemo i s'obtenen les hormones T<sub>3</sub> i T<sub>4</sub>.



*Figura 17.6 Paper de les peroxidases en la formació de les hormones tiroides.*

## 18. TOXICITAT

### 18.1 Introducció

Fins ara s'ha parlat dels elements que son essencials per la vida. Ara be, els essers vius no estan aïllats de l'entorn, sinó que viuen en constant contacte amb el que els envolta i per tant pot ser que s'incorporin elements o compostos que puguin ser perjudicials per la vida.

Els humans podem incorporar agents contaminants de l'aire, de les aigües i dels sols contaminats. Es poden incorporar per inhalació o a través de la dieta. Com ja s'havia comentat, un element és tòxic quan a qualsevol concentració presenta efectes negatius per la salut.

Hi ha elements, que degut a les seves característiques es podria esperar que fossin tòxics, és a dir son potencialment tòxics, però no s'han detectat casos de toxicitat deguts a aquests elements. Per exemple el Ti(IV), pot ser un ió molt polaritzant i que donés interaccions molt fortes amb els lligands biològics. Ara be, en medi aquos forma ràpidament  $TiO_2$  que és molt insoluble i per tant pràcticament no s'absorbeix. O la Ag(I), és un catió tou que pot interaccionar amb lligands tous, per exemple amb la cisteïna. Ara be, com que a l'exterior cel·lular la concentració de clorurs és alta, s'elimina fàcilment en forma de AgCl.

Per tant, per que un element sigui tòxic cal:

- Que tingui les característiques químiques que el facin tòxic.
- Que tingui alguna via d'incorporació, especialment a l'interior cel·lular.

Una de les vies d'incorporació d'un agent extern és per captura de l'entorn. A través de la respiració, s'incorporen els contaminants de l'aire; les aigües contaminades poden passar l'agent tòxic als animals i plantes aquàtics, però també si son aigües de rec poden aportar l'element tòxic a les plantes, i després passa als humans a través de la dieta.

Pot haver-hi contacte directe, a través de la pell, amb l'agent extern. Per exemple alguns aliatges de níquel que es fan servir en rellotges, en contacte amb la pell i la suor poden provocar una reacció al·lèrgica.

Hi ha organismes que acumulen determinats elements. És a dir la concentració que tenen d'un determinat element és superior a la que hi ha en el seu entorn. Això es pot donar de dues formes:

- A través de la cadena alimentària.
- Perquè hi ha una via fàcil d'entrada del compost però no de sortida. S'ha vist que les ostres tendeixen a acumular ions metàl·lics de Cd, Zn i Cu.

La tonyina pot acumular Hg. És una espècie molt activa, que requereix molt oxigen, i l'obté del que està dissolt a l'aigua. Per tant ha d'anar entrant i sortint aigua del seu cos. Si les aigües on viu estan contaminades amb sals de mercuri, entra al mateix temps aigua, sals de Hg i  $O_2$ , la tonyina es queda amb el  $O_2$ , i amb les sals de Hg i expulsa de nou l'aigua. D'aquesta forma, com més anys visqui aquest animal, més gran serà la quantitat de Hg que hagi acumulat. Però també depèn de la [Hg] que hi ha en les aigües en les que viu.

Hi ha uns bolets de la família de les amanites que acumulen vanadi. És a dir, igual que en els altres casos, en tenen més que el que hi ha en els sols on estan arrelats. Això és degut a que el vanadi en forma de vanadat ( $VO_4^{3-}$ ) és molt soluble i té una via fàcil d'incorporació, ja que s'assembla al sulfat ( $SO_4^{2-}$ ) (tots dos son anions tetraèdrics). Un cop a l'interior pot ser reduït a estats d'oxidació inferiors, de forma que no hi ha una via fàcil de sortida.



Per tant, un element tòxic serà més perjudicial si:

- Forma compostos solubles que es poden distribuir fàcilment.
- Pot aprofitar una via d'entrada d'un element essencial.
- Pot creuar membranes. Les membranes són barreres per protegir punts vulnerables.

## 18.2 Mecanismes de toxicitat

Un agent extern quan s'incorpora a l'organisme i presenta efectes nocius pot ser per diferents causes.

- Pot substituir a un element essencial en un centre actiu. Per que això passi cal que els dos ions metàl·lics tinguin una certa semblança. En la taula 18.1 es mostren algunes de les possibles substitucions d'elements essencials per tòxics.

*Taula 18.1 Algunes de les substitucions observades d'elements essencial per tòxics.*

<b>essencial</b>	<b>tòxic</b>
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Tl<sup>+</sup> o Cs<sup>+</sup></b>
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	<b>Cd<sup>2+</sup> o Hg<sup>2+</sup></b>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>Be<sup>2+</sup> o Al<sup>3+</sup></b>
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Cd<sup>2+</sup> o Pb<sup>2+</sup></b>

La substitució es pot donar desplaçant a l'element essencial quan l'ió tòxic té una major afinitat per les posicions de coordinació, o be l'arribada simultània dels dos elements a la mateixa cavitat i la competència entre elles per formar el complex.

El fet de que el centre actiu tingui un altre ió metàl·lic pot afectar a nivell termodinàmic (la reacció no és possible) o be a nivell cinètic (la reacció és massa ràpida o massa lenta).

- Pot ser que el catió tòxic no substitueix a un element essencial però si que afecti a l'estabilitat o reactivitat de la proteïna o enzim. En aquest cas el catió tòxic pot interaccionar amb algun aminoàcid de la proteïna, alterant, encara que sigui lleugerament la seva estructura. Això pot afectar, per exemple al  $E^{\circ}$ .

- Pot ser que el catió tòxic interaccioni amb el glutatió i afecti al bon funcionament de la glutatió peroxidasa. Això afavoreix la presència de radicals hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), que pot provocar el trencament de membranes per formació de peroxolípids.

Els ions metàl·lics, tant si són essencials com tòxics tenen més tendència a coordinar-se a les proteïnes que a l'ADN. Hi ha diferents punts per on poden interaccionar amb l'ADN:

- Coordinació o interacció amb els fosfats. Essencialment ho fan els cations durs.
- Interacció amb les bases nitrogenades. És el lloc a on es coordina el Pt<sup>II</sup> dels fàrmacs antitumorals.
- Coordinació als sucres, és molt poc freqüent.
- Si el compost conté lligands aromàtics es pot intercalar aquest lligand entre les bases de l'ADN que estan apilades.

La interacció dels ions metàl·lics amb l'ADN pot provocar canvis estructurals, per exemple, deformacions o be poden provocar el trencament i fragmentació de la doble hèlix de l'ADN. Per exemple la formació de radicals  $\cdot\text{OH}$  pot trencar enllaços en aquesta cadena.

### 18.3 Sistemes de defensa

Els organismes tenen diversos sistemes de protecció contra els agents externs que poden ser perjudicials.

Per una banda hi ha les membranes, que són la primera barrera. La membrana cel·lular, gràcies a la seva estructura de doble capa lipídica, filtra el pas de cations no desitjats. Els cations poden quedar retinguts en la seva superfície, interaccionant amb els fosfats de les cadenes que estan a l'exterior. Ara be, cations voluminosos poden bloquejar canals en quedar retinguts a la superfície i en l'entrada de canals. Per exemple, alguns cations orgànics voluminosos poden bloquejar els canals del  $\text{K}^+$  i actuar com a neurotòxics.

La membrana nuclear protegeix aquesta part sensible de la cèl·lula. Altres barreres protectores son les meninges, un teixit que protegeix l'encèfal i la medul·la espinal, i la barrera hemato-encefàlica que protegeix el cervell dels components tòxics que pugui transportar la sang. El fetus també està protegit per una membrana.

Per tant, el filtre més important i que protegeix els punts més sensibles son les membranes. Ara be, hi ha altres mecanismes de defensa. Per exemple bombes iòniques que permeten extreure els ions tòxics que hagin pogut entrar a la cèl·lula.

Una altra forma de defensa és immobilitzar el catió tòxic, per precipitació. Ja s'ha comentat que els ossos estan en equilibri permanent precipitació/redissolució, però el procés és lent. Cations que tinguin característiques similars al  $\text{Ca}^{2+}$  poden quedar retinguts en els ossos, evitant la lliure circulació pel cos. Ara be, si la quantitat de catió tòxic retingut en els ossos és gran, pot afectar a les seves propietats.

Hi ha organismes que a partir de processos enzimàtics converteixen una espècie tòxica en una que no ho és. Per exemple, s'ha trobat que hi ha bacteris anaeròbics que poden catalitzar reaccions de metilació en compostos d'arsènic i seleni. El  $\text{As}^{\text{III}}$  és altament tòxic; el  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  que és tòxic, si s'oxida a  $\text{HAsO}_4^{2-}$  o si es metila i s'obté el  $\text{AsMe}_3$  ja no és tòxic.

És important assenyalar que As i Se quan es metilen son menys tòxics, però en canvi els compostos metilats de Hg, Pb i Sn (compostos organometàl·lics) són molt més tòxics.

Els organismes disposen també d'una proteïna que serveix tant per transportar cations d'elements essencials com per extreure de les cèl·lules els cations d'elements tòxics. Aquesta proteïna és la metal·lotioneïna, que és rica en grups  $\text{Cys-S}^-$  i per tant té molta afinitat per coordinar cations tous, com per exemple el  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o el  $\text{Tl}^+$ .

Quan tots els sistemes de defensa fallen, cal administrar algun fàrmac: un compost que pugui actuar com a lligand complexant al catió tòxic. L'ideal és que sigui el més selectiu possible, que no pugui coordinar cations essencials. Les característiques que ha de tenir un fàrmac que pugui actuar com a lligand segrestador son:

- Que tingui la màxima selectivitat pel catió que es vol eliminar.
- Que formi un complex el més estable possible, així queda menys ió lliure en solució.
- Que converteixi el catió tòxic en una espècie poc polar per facilitar el pas a través de la membrana i la seva eliminació.

Alguns dels lligands que es fan servir es poden veure en la Figura 18.1. N'hi ha que tenen àtoms donadors del tipus base dura (O) i altres bases toves (S).

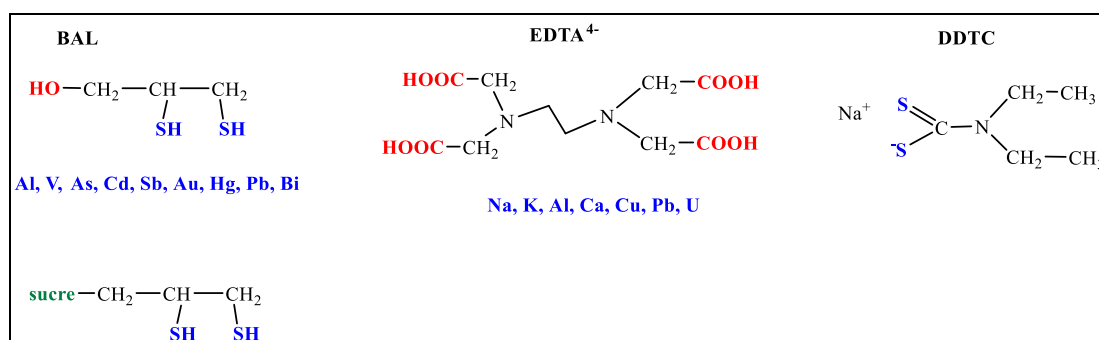


Figura 18.1 Lligands utilitzats per eliminar cations tòxics.

Modificant aquest lligands, es poden modular les seves propietats, per exemple afegint un grup amb diferent polaritat. Ara be, el problema d'aquests lligands és que la seva selectivitat no és molt bona.

#### 18.4 Efecte tòxic dels elements essencials

Els elements essencials poden competir entre ells per la coordinació als lligands biològics, per això és important que el sistema de transport dels ions funcioni correctament. Com ja s'havia comentat, alguns ions metàl·lics poden catalitzar la reacció de Fenton, entre el  $\text{H}_2\text{O}_2$  i el  $\text{O}_2^-$  donant lloc a la formació de radicals hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ). Els ions que poden catalitzar aquesta reacció són  $\text{M}^{2+}$  (Fe, Cu, Ni) que poden presentar dos estats d'oxidació diferents.

#### Crom

Hi ha elements metàl·lics que són essencials en un determinat estat d'oxidació i tòxics en un altre. Aquest és el cas del crom. És essencial coma  $\text{Cr}^{\text{III}}$ , que es coordina a la cromodulina i activa conjuntament amb la insulina l'obertura dels canals d'entrada de glucosa a la cèl·lula. Ara be, com a  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  és potencialment tòxic.

El  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  es pot trobar en dues formes, segons el pH,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  i  $\text{CrO}_4^{2-}$ . L'anió dicromat és molt més oxidant que el cromat, però aquest darrer té més facilitat per creuar la membrana i entrar a la cèl·lula, ja que té una estructura similar al  $\text{SO}_4^{2-}$  i pot utilitzar la mateixa via d'entrada (Figura 18.2). A l'igual que el  $\text{Cr}^{\text{III}}$  que pot utilitzar la transferrina, gràcies a la semblança del  $\text{Cr}^{\text{III}}$  i  $\text{Fe}^{\text{III}}$ .

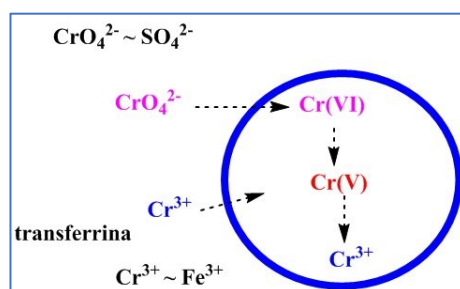


Figura 18.2 El crom en les cèl·lules: pot aprofitar vies d'entrada d'elements essencials i a l'interior reduir-se per efecte dels agents reductors biològics.

En el citosol hi ha diversos agents reductors que poden reduir l'anió cromat a  $\text{Cr}^{\text{III}}$ . Ara be, en aquest procés es passa per un intermedi de  $\text{Cr}^{\text{V}}$  que és altament perjudicial, ja que a més de ser molt oxidant és

un radical (configuració electrònica  $d^1$ ). Per tant depèn en quin punt es doni la reducció del  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  a  $\text{Cr}^{\text{III}}$  serà més o menys perillós.

Per altra banda, la formació de  $\text{Cr}^{\text{III}}$  fora del lloc que l'hi correspon pot ser també perjudicial ja que és un catió dur (relació  $q/r$  gran) i pot interaccionar amb lligands durs, com carboxilats i fosfats. Per exemple, segons on es formi pot interaccionar amb els fosfats de l'ADN, provocant lleugers canvis en la doble hèlix.

### Arsènic<sup>39-41</sup>

L'arsènic no està clar si pot ser un element essencial. S'ha vist que quan s'extreu completament de la dieta afecta al creixement, i s'han detectat problemes en la síntesi d'alguns aminoàcids. Això fa pensar que té alguna funció però encara no està clara quina és. Ara be, el que sí sembla clar és que si és essencial ha de ser en la forma  $\text{As}^{\text{V}}$ , ja que es ben sabut que el  $\text{As}^{\text{III}}$  és molt tòxic, especialment en la forma d'arsina  $\text{AsH}_3$ .

Un dels primers símptomes que indica que pot haver-hi una intoxicació per arsènic és que canvia la pigmentació de la pell.

Part dels efectes tòxics degut a l'arsènic estan relacionats amb la seva interacció amb el glutatió (G-SH) que fa disminuir l'activitat de la glutatió peroxidasa, i com a conseqüència augmenta la concentració de radicals  $\cdot\text{OH}$ . A més, s'ha vist que el  $\text{As}^{\text{III}}$  pot inhibir diversos enzims i pot interaccionar amb altres lligands biològics, tant els que contenen -SH com els que contenen -OH.

L'arsènic s'incorpora a través de la dieta i les aigües. En general, la quantitat que s'ingereix per aquesta via és baixa i no resulta perjudicial. Ara be, segons l'organització mundial de la salut (OMS) hi ha diversos països, com son Argentina, Bangladesh, Estats Units, Índia, Mèxic. Xile i Xina, que tenen aigües subterrànies amb una elevada concentració d'arsènic. Si aquestes aigües s'utilitzen pel rec de cultius, l'arsènic pot incorporar-se a les plantes i passar a la dieta. Per tant el perill d'intoxicació per arsènic depèn molt dels minerals de la regió on es viu; la seva solubilitat influirà en que estiguin en major o menor proporció en les aigües i que puguin passar a les plantes i als peixos.

Hi ha diferents espècies d'arsènic que poden incorporar-se als éssers vius. Algunes d'elles es poden veure a la Figura 18.3. L'anió arsenat ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ) pot entrar fàcilment a les cèl·lules, aprofitant el canal d'entrada del  $\text{SO}_4^{2-}$ ; un cop a dins els reductors cel·lulars el poden convertir en arsenit o àcid arseniós ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ) que és tòxic.

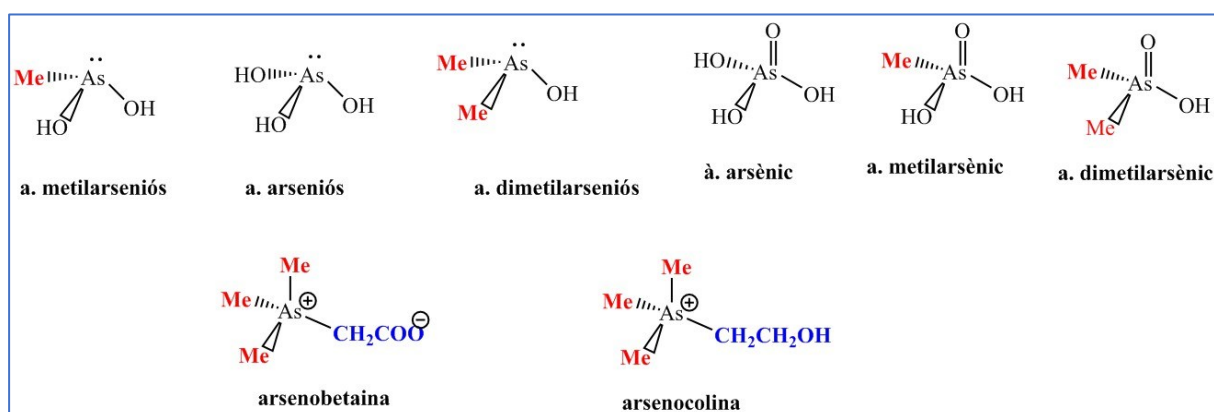


Figura 18.3 Espècies més rellevants de l'arsènic(V) i l'arsènic(III), en ordre decreixent de toxicitat.

Quan es parla de l'arsènic i la seva toxicitat es diferencia entre l'arsènic inorgànic (arsina, arsenit i arseniat) i l'arsènic orgànic que són els compostos derivats d'aquests oxoàcid però metilats. Hi ha enzims que són capaços de metilar oxoàcids inorgànics, substituint grups OH per Me.

Durant molts anys es va pensar que tots els compostos metilats eren menys tòxics que els no metilats, però s'ha vist que no és del tot cert. Sembla que el compost de  $\text{As}^{\text{III}}$  amb un sol grup Me és més tòxic que el compost inorgànic en el mateix estat d'oxidació.

De totes formes, en línies generals es pot dir que les espècies de  $\text{As}^{\text{III}}$  són més tòxiques que les de  $\text{As}^{\text{V}}$  i que la presència de grups orgànics disminueix la seva toxicitat. Concretament hi ha dues espècies l'arsenobetaina i l'arsenocolina (Figura 18.3) que no són tòxiques, i que es troben en peixos i organismes marins que viuen en aigües riques en aquest element.

En el cos humà les espècies d'arsènic poden patir diferents transformacions, redox i de metilació. Aquestes espècies poden interaccionar amb lípids, sucres i proteïnes, que tinguin residus -OH o -SH (Figura 18.4).

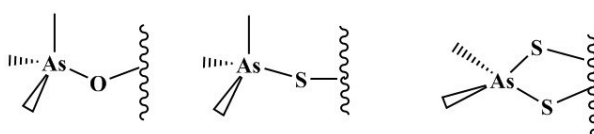


Figura 18.4 Interacció de les espècies d'arsènic amb lligands biològics.

L'eliminació de l'arsènic del cos es fa majoritàriament a través de fluids (orina i suor) en forma iònica i per l'alè en forma d'alguna espècie neutre. Per determinar si hi ha intoxicació per arsènic generalment es fa a través de la determinació de la seva concentració en la orina.

#### Seleni <sup>42,43</sup>

El seleni és un element essencial, del que ja s'ha comentat el seu paper en la glutatió peroxidasa. Ara be, la concentració que es requereix d'aquest element és molt baixa, uns 0,05 mg per dia. Així que si els aliments i les aigües tenen una concentració elevada, de seguida se sobrepassa el límit idoni.

Les intoxicacions per seleni es donen en regions on els sols són rics en minerals que contenen aquest element, i que, a l'igual que succeeix amb l'arsènic, l'element passa a les aigües i d'aquí a les plantes i els peixos.

El seleni i el sofre són del mateix grup de la taula periòdica, i poden formar enllaços covalents entre ells, com ja s'ha comentat en parlar de la glutatió peroxidasa. L'excés de seleni en el cos, pot quedar retintut en proteïnes riques en Cys-SH, com és la queratina, que és una de les proteïnes present en les ungles i els cabells.

Hi ha aliments rics en seleni, com són els alls, espàrrecs, fetge, ronyó, peix... A l'igual que s'ha comentat per l'arsènic, s'elimina per la transpiració i orina en forma iònica,  $\text{SeMe}_3^+$ , i en forma neutre per l'alè,  $\text{SeMe}_2$ . Aquests compostos són els responsables del mal olor de la suor quan es menja algun producte ric en seleni.

### 18.5 Toxicitat de cations durs (Li, Be, Al)

Hi ha tres cations que són potencialment tòxics degut al seu poder polaritzant,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Be}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ . Cal remarcar, però, que el  $\text{Li}^+$  és el menys polaritzant de tots. Els tres són cations durs i carregats, i tenen tendència a interaccionar amb oxígens, especialment si té càrrega. A l'igual que el  $\text{Mg}^{2+}$ , que és essencial, aquests elements tenen molta afinitat pels grups fosfat.

El Mg i el Ca son elements essencials del grup 2 de la taula periòdica. Ambdós estan involucrats en processos en els que intervenen fosfats. El  $Mg^{2+}$  en enzims on afavoreix la hidròlisi de fosfats i èster de fosfats, i el  $Ca^{2+}$  en el ossos formant l'hidroxiapatit.

Així doncs, els cations durs tòxics,  $Li^+$ ,  $Be^{2+}$  i  $Al^{3+}$  poden competir en menor o major grau amb els cations essencials,  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ , en enzims, en la interacció amb el ATP, en els ossos, i també poden interaccionar amb l'ADN a través dels fosfats. Una diferència important és que tant el  $Be^{2+}$  com el  $Al^{3+}$  donaran interaccions més fortes amb els fosfats ja que tenen una relació  $q/r$  major que el  $Mg^{2+}$ .

#### *Liti* <sup>44</sup>

Les intoxicacions que s'han trobat per liti són degudes essencialment a la utilització de fàrmacs. Les sals de liti es fan servir en el tractament dels trastorns maniacodepressius; regula la fase d'hiperactivitat.

Un dels problemes que presenta és que l'interval de concentració en el que és beneficiós és molt petit. Mantenir la  $[Li]$  òptima és difícil ja que s'absorbeix i s'elimina ràpidament, pel que pot haver-hi canvis bruscos en els nivells de Li.

Els elements essencials veïns del Li a la taula periòdica i amb els que podria competir son el Na i el Mg. El que juga un paper clau en la interacció amb els fosfats és el  $Mg^{2+}$  i comparat amb aquest la interacció del  $Li^+$  serà més feble, es mobilitza més fàcilment.

El mecanisme d'actuació no està clar. Pot ser que estigui relacionat amb la interacció amb algun neurotransmissor, ja que alguna d'aquestes espècies contenen grups fosfat.

#### *Beril·li* <sup>45,46</sup>

El beril·li és un element poc abundant en la natura, per tant l'exposició a aquest element és baixa. No obstant hi ha intoxicacions per beril·li, i es donen en persones que treballen amb les seves sals o minerals. També corren el perill de patir beril·liosi els habitants de zones properes a indústries on s'utilitzin compostos de beril·li.

La forma més habitual és que s'incorpori a l'organisme és per inhalació, treballant amb compostos de beril·li o en les mines, en la seva extracció. Afecta fonamentalment a pulmó.

Els seus efectes tòxics depenen de la solubilitat de la sal, ja que la seva dissolució és la que afavorirà la distribució en l'organisme.

Degut a la seva semblança amb el Ca pot quedar retingut als ossos. L'enllaç serà més fort, però en tenir un radi més petit l'empaquetament dels ions per formar el sòlid no serà igual de compacte.

#### *Alumini* <sup>47-49</sup>

En la dècada de 1970 es va veure que la pluja àcida afectava al creixement de les plantes. Es va poder relacionar aquest fet amb una major concentració d'alumini en les plantes.

En sols rics en aluminosilicats si el pH de la pluja és àcid, pot solubilitzar part de l'aluminosilicat convertint el  $Al^{III}$  en una espècie soluble i per tant, disponible per la planta. S'ha observat que si la relació de concentracions  $[Al]/[Ca]$  i/o  $[Al]/[Mg]$  és alta, les arrels de la planta són més petites del que correspondria.

En la vida quotidiana s'està en contacte constant amb l'alumini. Es troba en les aigües i en additius i es pot incorporar a través de la dieta. S'absorbeix aproximadament un 3% del que s'ingereix, la resta s'elimina majoritàriament per l'orina. No és recomanable posar en contacte directe el paper d'alumini amb aliments àcids, per tal de minimitzar al màxim la ingesta d'aquest element.

El catió  $Al^{3+}$  s'assembla al  $Fe^{3+}$  que és un element essencial, per tant pot aprofitar la seva via d'entrada a la cèl·lula, i competir amb ell; pot arribar als punts on arriba el Fe, però sense poder fer les seves

funcions, especialment en el que són processos redox. Per altra banda, com ja s'ha comentat, pot competir amb  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . S'ha trobat que pot quedar retingut en ossos i donar fragilitat òssia.

La toxicitat de l'alumini està relacionada amb malalties de tipus neurològic, en persones d'edat avançada. En la vida quotidiana tots estem exposats a l'alumini, i amb els anys hi pot haver una certa acumulació d'aquest element que es diposita en el cervell. No obstant, el mecanisme d'actuació de l'alumini en les malalties neuro-degeneratives, com l'Alzheimer no està clar.

La toxicitat de l'alumini es va posar de manifest a finals de la dècada del 1970, a Newcastle (Anglaterra), en pacients que feien diàlisi i que van començar a presentar problemes ossis, deguts a l'alumini. Utilitzant aigua desionitzada, i per tant, sense traces d'alumini es va revertir el problema.

### 18.6 Toxicitat de cations tous (Hg, Pb, Cd, Tl)

Els cations tous tenen afinitat per coordinar-se a bases toves, és a dir a àtoms donadors voluminosos, com és el sofre. Per tant, el que tenen en comú aquests ions és la seva tendència a coordinar-se a la cisteïna ( $Cys-S^-$ ). Un dels avantatges de la seva preferència per aquest lligand és que es poden eliminar amb la metal·lotioneïna, que és una proteïna rica en grups  $Cys-S^-$ .

Un dels problemes que presenten és que precisament per aquesta afinitat per coordinar-se a la cisteïna, poden interaccionar amb el glutatió ( $G-SH$ ) i per tant bloquejar l'enzim glutatió peroxidasa. Això comporta un augment en la concentració de radicals i, en general, d'espècies reactives d'oxigen, les conegudes com ROS ( $\cdot OH$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ). Aquestes espècies poden donar diferents tipus de reaccions: formació de peroxolípids, oxidació de proteïnes, oxidació de l'ADN, etc, donant mutacions o fins i tot la mort cel·lular.<sup>50,51</sup>

També degut a la seva afinitat per la cisteïna s'acumulen en les ungles i cabells, ja que hi ha la queratina, que és una proteïna que rica en aquest aminoàcid.

Els ions metàl·lics tòxics tous  $M^{2+}$  tenen una certa semblança amb el  $Ca^{2+}$ , per tant poden anar als mateixos punts, i s'acumulen als ossos i les dents.

Cal destacar que d'aquests elements tòxics, a part de la seva toxicitat per ser cations tous, hi ha tres espècies que afecten al sistema nerviós:  $Tl^+$ ,  $Pb^{2+}$  i  $R-Hg^+$ .

#### *Mercuri*

La toxicitat del mercuri es va posar en evidència en la dècada del 1950. En la població de Minamata (Japó) en un sol anys es van detectar 52 morts de persones que presentaven els mateixos símptomes: debilitat muscular, pèrdua de visió i problemes neurològics.

Es va observar que els gats i aus marines presentaven també problemes de visió i símptomes similars, amb el que es va deduir que l'origen de la malaltia estava en el peix i que per tant provenia de l'aigua de la badia on està ubicada la ciutat.

En aquesta badia hi havia una empresa dedicada a la síntesi de compostos organometàl·lics de mercuri. Els residus que generaven anaven a parar a l'aigua del mar. Aquests residus contenien sals de  $Hg^{II}$  i compostos orgànics. Això va afavorir la proliferació de bacteris capaços de metilar al  $Hg^{II}$ , amb el que la concentració d'espècies organomercurials ( $HgR_2$  i  $HgR^+$ ) va augmentar. Aquestes espècies van passar als peixos i crustacis i d'aquí a la població.

A la malaltia provocada pels compostos organomercurials se la va anomenar malaltia de Minamata. Hi ha hagut altres casos d'intoxicacions massives amb aquests compostos de mercuri. A Iraq, la intoxicació va ser deguda al pa, en utilitzar pesticides mercurials per tractar el blat. A San Francisco, hi ha unes

mines de cinabri ( $\text{HgS}$ ) i en èpoques de pluja s'ha detectat que la concentració de  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{RHg}^+$  en les aigües augmenta.

Les **espècies més tòxiques** del mercuri són les organometàl·liques, especialment les que tenen un grup alquil:  $\text{HgR}_{\text{alquil}}^+ > \text{HgR}_{\text{aril}}^+ > \text{Hg}^{2+}$ .

En el cos humà hi ha diferents enzims que catalitzen les reaccions de metilació, un d'ells és la Me-B<sub>12</sub> que pot metilar al  $\text{Hg}^{\text{II}}$ .

Els cations  $\text{HgR}^+$  i molt especialment el metilmercuri ( $\text{HgMe}^+$ ) són altament tòxics ja que poden creuar les membranes protectores, gràcies a que tenen una part polar i una apolar. S'ha vist que en intoxicacions agudes, el mercuri passa de la mare al fetus i aquest pot presentar ja símptomes d'intoxicació, o fins i tot la mort quan la concentració és elevada.

Com ja s'ha comentat, la tonyina és un animal que pot acumular mercuri. S'ha observat que quan més gran és la concentració de mercuri, més gran és la de seleni. Cal recordar que el seleni forma part de l'enzim glutatió peroxidasa. Per tant, la presència de Hg en el cos, i la generació de radicals, activa el sistema de defensa, augmentant la concentració de glutatió peroxidasa.

El  $\text{HgMe}^+$  pot interaccionar amb grups  $\text{Cys-S}^-$  de proteïnes i enzims i també s'ha vist que pot interaccionar amb les bases nitrogenades de l'ADN, especialment amb el  $\text{N}_{\text{adenina}}$ .

El mercuri és un metall que es troba en forma líquida a temperatura ambient, i el seu punt d'ebullició és de 357 °C; ara be, tot i que la seva pressió de vapor és baixa, en espais poc ventilats quan es treballa amb  $\text{Hg}(\text{l})$  es pot acumular  $\text{Hg}(\text{g})$  en l'aire.

Alfred Stock, a començaments del segle XX va posar a punt el sistema de buit, amb vàlvules de Hg i mentre treballava en aquest projecte va patir intoxicació amb mercuri. Ell mateix va reconèixer els símptomes: pèrdua de visió i oïda, problemes circulatoris, tremolors, ennegritament de les dents, etc. Va instal·lar al laboratori un bon sistema de ventilació per evitar l'acumulació de vapors de Hg.

El  $\text{Hg}(\text{g})$  té un temps de vida mitja a l'atmosfera d'aproximadament 1 any. A l'atmosfera pot ser oxidat per l'ozó, a  $\text{Hg}^{2+}$  i tornar a terra amb la pluja. En la Figura 18.5 es mostra de forma esquemàtica el cicle del mercuri.

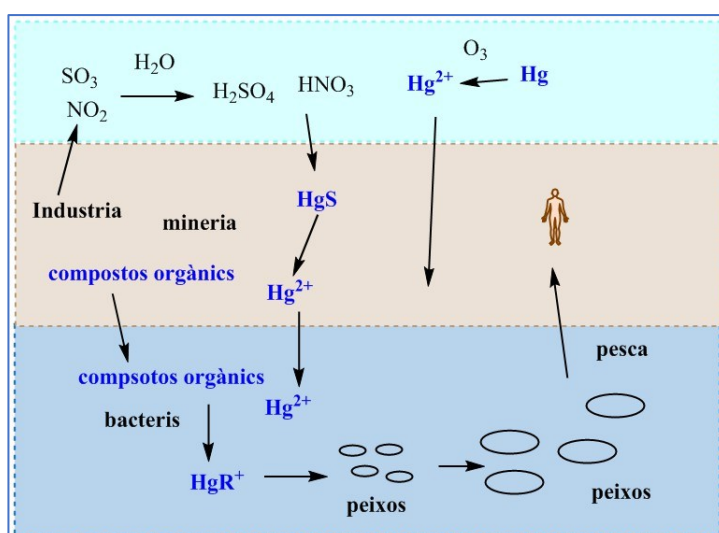


Figura 18.5 Cicle del mercuri.



La indústria química genera gasos que poden acidificar l'aigua de la pluja. Aquesta aigua, àcida, pot afavorir la dissolució dels minerals de mercuri. El cinabri, HgS, és molt insoluble,  $K_{ps} \sim 10^{-54}$  i per tant en condicions normals la concentració de  $Hg^{2+}$  que pot passar a les aigües és molt petita. Ara bé, l'anió  $S^{2-}$  prové d'un àcid feble, el  $H_2S$  que té unes constants d'acidesa de  $K_{a,1} = 1,2 \cdot 10^{-7}$  i  $K_{a,2} = 1,3 \cdot 10^{-13}$ . Per tant, l'anió sulfur té molta tendència a protonar-se, desplaçant-se així l'equilibri de solubilitat.

La formació d'espècies solubles de  $Hg^{II}$  fa que les aigües de rius, llacs i subterrànies s'enriqueixin amb aquest ió metàl·lic. Si a més hi ha residus orgànics, proliferen els bacteris capaços de metilar al mercuri, i que són resistents al mercuri. D'aquesta forma els compostos organomercurials entren en la cadena alimentària.

### Plom

La toxicitat del plom es coneix ja des de l'antiguitat. Hi ha referències de que en l'època de l'imperi romà ja s'havien detectat intoxicacions per plom. L'origen d'aquestes intoxicacions s'ha atribuït a la ceràmica esmaltada. En aquell temps els romans preparaven un licor a base de suc de fruita i vi calent. Aquesta barreja és àcida, degut a la fruita. Els recipients que feien servir eren de ceràmica esmaltada, però si la cocció de la peça de ceràmica no havia sigut la correcta, podia passar que els pigments que fossin solubles en medi àcid passessin a la beguda.

Dos dels pigments més emprats de plom són el blanc, un carbonat bàsic de plom ( $Pb_3(CO_3)_2(OH)_2$ ), i el vermell ( $Pb_3O_4$ ). El blanc de plom es feia servir en pintures per la paret i hi havia hagut intoxicacions de nens; quan la pintura està vella i es trenca, els bocins podien anar a parar a la boca de les criatures. El medi àcid de l'estómac dissol el compost ja que tant l'anió carbonat com l'hidròxid es poden protonar. Actualment es fa servir el  $TiO_2$ , com a pigment blanc, ja que en cas d'ingestió accidental no es dissol i per tant l'absorció d'alguna espècie de titani soluble és menor que en el cas del plom.

A l'igual que passa amb l'alumini, a la vida quotidiana hi ha una important exposició al plom, tot i que s'ha anat reduint. Les canonades d'aigua, abans eren de plom, i s'han anat substituint per altres materials.

Un dels compostos més tòxics del plom és el compost organometàl·lic  $PbEt_3^+$ . L'origen d'aquest contaminant era el  $PbEt_4$  que es posava com additiu a la gasolina.

En estudis forenses s'havia observat que la concentració de plom en la gent que vivia en ciutats era més alta que la de la gent que vivia en zones rurals. I des de que es fa servir la gasolina sense plom la  $[Pb]$  a l'aire ha disminuït significativament.

El  $PbEt_4$  de la combustió de la gasolina entrava al cos per via respiratòria i podia fàcilment ser transformat en l'espècie catiónica, que a l'igual que el compost amb mercuri, té una part polar i una apolar. La diferència és que aquest compost organometàl·lic de plom té la part orgànica més voluminosa (Figura 18.6); això fa que no pugui creuar membranes, tot i que per la seva part polar sí que hi interacciona. Aquesta interacció altera la permeabilitat de les membranes i pot provocar la inflamació dels teixits.

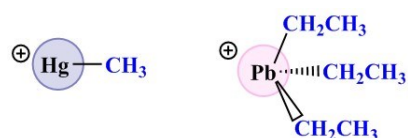


Figura 18.6 Espècies organometàl·liques de Hg i Pb que afecten a nivell de sistema nerviós.

La toxicitat del plom es deu a les seves característiques com a catió tou, i per tant interacció amb  $Cys-S^-$  però sobretot, pel seu efecte sobre el sistema nerviós.

A través de la dieta la quantitat de plom que s'ingereix és petita, uns 0,3 mg per dia i un 90% s'elimina. Del 10% que s'absorbeix la major part va a parar als ossos, substituint al  $\text{Ca}^{2+}$ , on hi queda retingut durant aproximadament uns 30 anys.

Si hi ha una acumulació important de  $\text{Pb}^{2+}$  en els ossos vol dir que la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  disminueix, i això provoca problemes de descalcificació.

El plom afecta entre d'altres processos, a la síntesi del grup hemo.

Gràcies a la seva afinitat per coordinar-se a la cisteïna, es troba també retingut en cabells i ungles, on hi ha la queratina.

### **Cadmi**

L'any 1912, en una zona del Japó hi va haver una intoxicació massiva amb cadmi. Van augmentar molts els casos d'osteoporosis i la població patia de molt malt als ossos. La malaltia derivada de la intoxicació per cadmi és coneix amb el nom de Itai-itai; diuen que el nom prové dels gemecs de dolor que feien els malalts (ai, ai!). L'origen de la intoxicació era l'aigua del riu que contenia una  $[\text{Cd}^{2+}]$  elevada. Aquesta aigua és la que es feia servir per la irrigació dels camps d'arròs, per tant aquest aliment absorbia el cadmi que després arribava a la gent.

La combinació d'arròs contaminat amb  $\text{Cd}^{2+}$  juntament amb una dieta pobre en  $\text{Ca}^{2+}$  va afavorir la substitució de l'element essencial pel tòxic. Aproximadament un 1% del Cd absorbit queda retingut en els ossos, on té un temps de vida mitja  $t_{1/2} \sim 15-20$  anys.

El tabac és una planta que pot contenir Cd. La fulla del tabac de plantes que creixen en sols pobres en Cd té un marge de concentració  $[\text{Cd}] = 0,06-0,5$  mg Cd/Kg de tabac. En canvi la planta que creix en sols rics en cadmi la concentració de cadmi és molt més gran  $[\text{Cd}] = 1-3$  mg Cd/Kg de tabac. Quan es crema la fulla de tabac, els compostos de cadmi poden passar al fum i per tant ser inhalats i la  $[\text{Cd}]$  en sang augmenta.

Actualment el cadmi s'utilitza en camps molt diversos, per exemple en les piles de Ni-Cd, en pigments, en aparells electrònics, plaques solars, etc. El cadmi està present també en fertilitzants minerals, que contenen fosfats; en la seva preparació es parteix d'algun mineral de fosfat de calci, però que generalment té petites quantitats de Cd en substitució del Ca. La purificació del fertilitzant per eliminar el Cd encarriria molt el producte pel que generalment els fertilitzants utilitzats contenen aquest element.

A nivell de curiositat: hi ha unes algues diatomees marines en les que el Cd és un element essencial; la seva anhidrasa carbònica utilitza el  $\text{Cd}^{2+}$  en lloc del  $\text{Zn}^{2+}$ . La  $[\text{Zn}^{2+}]$  en l'aigua de l'oceà disminueix en allunyar-se de la superfície, i els organismes que viuen a major fondària s'han adaptat a utilitzar ions anàlegs que puguin fer la mateixa funció i estiguin més disponibles.

Una diferència important entre el Cd i el Pb o Hg, és que no forma compostos organometàl·lics a nivell biològic, o no s'han detectat casos d'intoxicacions massives degudes a aquest element, ni afectacions de tipus neurològic. La presència de Cd afecta al sistema renal ja que la metal·lotioneïna captura i enllaça a diversos ions  $\text{Cd}^{2+}$  i el transporta cap als ronyons.

### **Tal·li** <sup>52,53</sup>

El tal·li és un metall del bloc p que s'utilitza en la indústria de l'electrònica i dels semiconductors. Antigament es feia servir en verins per rosegadors i també en cremes per depilar.

No hi ha uns símptomes específics per reconèixer la intoxicació per tal·li.

L'estat d'oxidació estable d'aquest metall és el de  $\text{Tl}^+$ , per tant té semblances amb el  $\text{K}^+$  i pot utilitzar la mateixa via d'entrada a nivell cel·lular. Tot i que estan bastant allunyats en la taula periòdica el seu radi no difereix massa:  $r(\text{Tl}^+) = 1,40 \text{ \AA}$  i el  $r(\text{K}^+) = 1,33 \text{ \AA}$ . Això és degut al que es coneix com la contracció

dels lantànids. Aquesta similitud de radi entre el catió essencial i tòxic fa que el  $Tl^+$  interfereixi en els processos on actua el  $K^+$ . Una forma de revertir les intoxicacions per  $Tl^+$  és augmentant la concentració de  $K^+$ .

El  $Tl^+$  pot interaccionar amb els fosfolípids de membrana i alterar la seva permeabilitat. S'ha vist que té efectes nocius en el sistema nerviós. Per altra banda, en ser un catió tou té afinitat per les proteïnes que contenen cisteïna.

### 18.7 Efecte dels elements radioactius

Els elements radioactius són aquells que el seu nucli no és estable i emet partícules  $\alpha$ ,  $\beta$  i/o radiació  $\gamma$ .

- **Partícules  $\alpha$ :** son nuclis d'heli (un nucli que conté dos protons i dos neutrons). Tenen poc poder penetrant: un full de paper o una roba ja les atura i no les deixa passar..
- **Partícules  $\beta$ :** són electrons, per tant una massa molt més petita que les partícules  $\alpha$ . El seu poder penetrant és major, poden travessar la pell. Un full d'alumini d'uns 8 mm de gruix ja no el poden creuar.
- **Radiació  $\gamma$ :** té molt poder penetrant. Per aturar aquesta radiació cal una làmina de plom de 15 cm de gruix, o be un mur de ciment de 1,5 m de gruix, o una barrera formada per 1 m d'aigua.

En la descomposició d'un nucli radioactiu pot anar perdent partícules  $\alpha$  i  $\beta$  i energia, passant per altres nuclis intermedis que poden ser més perillosos que l'inicial.

La perillositat dels elements radioactius depèn de diferents factors. Si l'espècie radioactiva està a l'exterior del cos, el bombardeig per partícules i radiació ve des de fora, per tant, per aquesta via, en principi les partícules  $\alpha$  no afectarien, en canvi la radiació i les partícules  $\beta$  sí. Ara be, en general si es té contacte amb un element radioactiu pot acabar entrant a l'organisme i és en aquest punt en que ens centrarem, en veure quins son els factors que afecten a la seva perillositat a dins del cos.

- La via d'accés. Parlem de nuclis radioactius però poden estar en estat elemental o formant compostos, per tant, com per qualsevol altre agent tòxic, l'accés a l'organisme, i especialment a l'interior cel·lular, depèn del tipus de compost que forma: si és un gas (inhalació), si és soluble (major distribució pel cos), si pot competir amb un element essencial (pot arribar a més punts vulnerables), etc.
- El temps d'exposició a la font radioactiva, ja que es pot incorporar major quantitat del compost o element.
- El tipus de partícula que emet, ja que el seu poder penetrant pot afectar a més llarga distancia o a menys. Les partícules  $\alpha$ , tot i ser poc penetrants, a l'interior del cos son perjudicials, ja que en xocar amb altres molècules poden trencar enllaços covalents, igual que la radiació.
- El temps de vida mitja de l'isòtop radioactiu ( $t_{1/2}$ ): com més gran sigui més temps estarà aquest nucli emeten partícules i radiació en el lloc on hagi arribat.
- A part de les seves condicions d'element radioactiu s'hi sumaran les pròpies de l'element químic: si té caràcter marcadament tou, o és molt polaritzant, o si pot competir amb un element essencial.

Després dels accidents en les centrals nuclears de Txernòbil (Ucraïna) i de Fukushima (Japó) es va trobar que dues de les espècies radioactives més abundants en l'aire eren el  $^{137}Cs$  i el  $^{131}I$ .

Quan hi ha un accident amb material radioactiu hi ha diferents nivells d'impacte:

- En l'entorn immediat, en la gent que està present en el lloc de l'accident.
- La dispersió de partícules en l'aire, que és incontrolable cap a on aniran. Quan hi va haver l'accident de Txernòbil en algunes regions de França es van detectar més casos de problemes de tiroides que provenien del iode radioactiu present en l'aire. Aquestes partícules poden entrar a l'organisme per via respiratòria. També poden sedimentar sobre el sòl o anar a les aigües i per tant incorporar-se a través de la cadena alimentària. Per tant, l'efecte de l'accident nuclear arriba fins a on arribin aquestes partícules arrossegades per l'aire.
- La dispersió de les partícules en els sòls i les aigües de l'entorn. El terreny del voltant del lloc de l'accident, en un radi més o menys gran queda contaminat. La qüestió radica en el temps en que queda inutilitzat, per viure-hi o pel conreu. En principi, depèn de la vida mitja dels nuclis radioactius, que varia molt entre uns nuclis i altres. En la taula 18.1 es presenta un recull del temps de semidesintegració o temps de vida mitja ( $t_{1/2}$ ) de diferents nuclis. El problema radica en que en general hi ha una barreja d'espècies amb diferents temps de descomposició.

Taula 18.1 Temps de vida mitja de diferents isòtops radioactius.

nucli	$t_{1/2}$	nucli	$t_{1/2}$
$^{137}\text{Cs}$	30 anys	$^{14}\text{C}$	$5,7 \cdot 10^3$ anys
$^{131}\text{I}$	8 dies	$^{40}\text{K}$	$1,3 \cdot 10^9$ anys
$^{60}\text{Co}$	5,3 anys	$^{90}\text{Sr}$	28 anys
$^{239}\text{Pu}$	$2,4 \cdot 10^4$ anys	$^{67}\text{Ga}$	78 hores
$^{226}\text{Ra}$	$1,6 \cdot 10^3$ anys	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 hores
$^{235}\text{U}$	$7,1 \cdot 10^8$ anys	$^{111}\text{In}$	67 hores
$^{238}\text{U}$	$4,5 \cdot 10^9$ anys	$^{186}\text{Re}$	90 hores

El Cs en ser del mateix grup de la taula periòdica que el K pot competir amb ell; en ambdós casos formen cations  $M^+$  i pot aprofitar les mateixes vies d'accés a l'interior cel·lular que el  $K^+$ , amb el problema que durant tot el temps en que estigui a l'organisme anirà emetent radiació.

En el cas del  $^{131}\text{I}$  en ser un isòtop radioactiu d'un element essencial anirà a parar als mateixos llocs. O sigui que es trobarà sobretot a les tiroides. L'avantatge d'aquest nucli és que té un temps de vida mitja curt, i que és dels nuclis menys agressius: emet radiació de baixa energia i partícules  $\beta$  però no  $\alpha$ . En alguns països després d'un accident nuclear s'administra KI a la població, de forma preventiva, per tal de que les hormones tiroides estiguin saturades de iode i tinguin menys afinitat per retenir-hi el iode radioactiu.

L'urani natural conté diferents isòtops:  $^{238}\text{U}$  (99,3%),  $^{235}\text{U}$  (0,72%) i  $^{234}\text{U}$  (0,006%). L'isòtop  $^{238}\text{U}$  que és el més abundant en la natura no serveix per utilitzar-lo en els reactors nuclears ja que no és fissionable: no es trenca quan es bombardeja amb neutrons. En canvi el  $^{235}\text{U}$  sí que dona reaccions de fissió, que és el que es requereix en les centrals nuclears. Per tant, per poder utilitzar aquest  $^{235}\text{U}$  cal extreure'l de l'urani natural. Això genera residus de  $^{238}\text{U}$ , que és el que s'anomena urani empobrit.

Aquests excedents d'urani, urani empobrit, s'han utilitzat com a substitut del plom en bales i míssils. Va ser durant la guerra del golf, en el 1991, que es va parlar molt de l'armament que feia servir urani empobrit, com si aquesta etiqueta el fes menys perjudicial. També es va fer servir en la guerra dels Balcans.

Aquests projectils que contenen aquest metall radioactiu, són durs i densos i per l'impacte amb el seu objectiu quan es produeix l'explosió hi ha un augment important de la temperatura i una dispersió de diferents compostos que contenen  $^{238}\text{U}$ . Poden ser partícules molt fines que es dipositen en els sols i les aigües i que queden en suspensió en l'aire i per tant contaminant la zona on s'han utilitzat.

## 19. PAPER DELS IONS METÀL·LICS EN MEDICINA

### 19.1 Breu introducció històrica i alguns fàrmacs inorgànics

La utilització de sals metàl·liques en medicina ve de molt antic. Els xinesos, en el segle VI a. C. preparaven l'elixir de la immortalitat. Aquest elixir el preparaven a partir de Au i  $\text{KNO}_3$  i la solució que obtenien els feia sentir bé, d'aquí el nom que l'hi donaven. Molts anys més tard es va reproduir el procés per veure quina o quines espècies hi havia en solució i es va descobrir que contenia  $[\text{AuI}_2]^-$ . Analitzant el mineral utilitzat es va trobar que contenia també  $\text{KIO}_3$ . O sigui que l'espècie que generava el benestar era un compost soluble de Au<sup>I</sup>.

Un dels documents mèdics més antic és un recull egipci (el papir d'Ebers) de l'any 1550 a. C. que recull 700 fórmules i remeis per guarir diferents malalties i afeccions. En aquest document ja es fa esment de les sals d'or, a l'igual que en algun dels tractats d'Hipòcrates.

A finals del segle XIX les sals del complex cianurat  $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$  es feien servir per tractar la tuberculosi i a començaments del segle XX es feien servir complexos amb lligand tiosulfat  $[\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2]^{3-}$  en el tractament de la lepra. Actualment la utilització de les sals d'or està focalitzada en el tractament de l'artritis reumàtica.

#### Mercuri

Les sals de mercuri(II) també s'han vingut utilitzant des de temps antics, com antisèptics. Al llarg dels anys s'han utilitzat diferents compostos de  $\text{Hg}^{\text{II}}$ , alguns d'ells compostos organometàl·lics com el *timerosal* i el *mercurocrom* (Figura 19.1). La *mercromina*, que es va començar a comercialitzar a Espanya l'any 1935 conté mercurocrom. El *timerosal* s'havia utilitzat coma additiu en vacunes com a conservant.

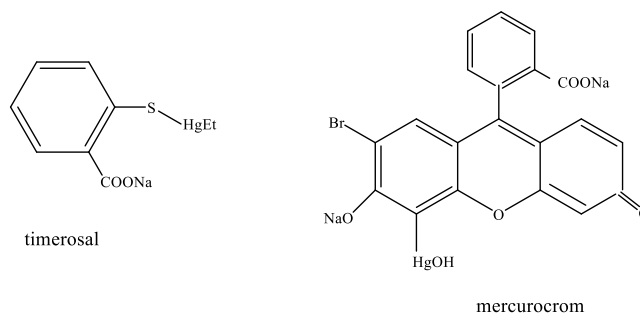


Figura 19.1 Antisèptics de mercuri(II).

#### Iode

En el segle IV a. C. els grecs, feien servir algues per mitigar el malestar produït per les cremades de sol. Els romans, ja extreien el iode de les algues amb la mateixa finalitat. Actualment, la utilització del iode com antisèptic ha desplaçat als compostos de mercuri. Pot ser  $\text{I}_2 + \text{KI}$  (en realitat  $\text{KI}_3$ ) o  $\text{I}_2$  en algun suport orgànic.

#### Bor

També es fan servir com antisèptics suaus en gotes nasals i oftalmològiques, en forma d'àcid bòric ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) o el bòrax ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ), que s'hidrolitza fàcilment donant àcid bòric. S'ha demostrat que inhibeixen el creixement de microorganismes.

## Plata

Les sals de plata(I) s'utilitzen per evitar infeccions en cremades. Una de les pomades que es comercialitza conté l'antibiòtic sulfadiazina formant una sal amb la  $\text{Ag}^I$  (Figura 19.2). Quan es fan servir aquestes pomades s'ha de tenir present que el catió  $\text{Ag}^+$  es pot reduir fàcilment per acció de la llum, el que provoca la formació de taques negres degudes a la plata metàl·lica.

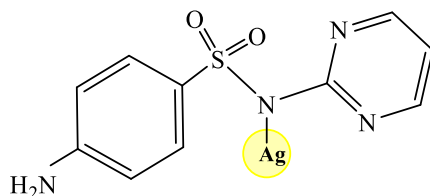


Figura 19.2 Punt d'unió de la  $\text{Ag}^I$  a la sulfadiazina.

## Zinc

Les sals de zinc també s'han utilitzat des de l'antiguitat; sembla que en el segle XVI a. C. ja es feien servir per tractaments de la pell perquè s'havia observat que tenien propietats cicatritzants. S'ha vist que els compostos de  $\text{Zn(II)}$  tenen activitat antiviral.

## Alumini

En desodorants i antitranspirants s'han utilitzat sovint sals d'alumini; en alguns llocs es recomana la utilització de l'alum com a desodorant, considerant que pel fet de ser un mineral natural és inofensiu. Ara be, s'ha de tenir present que l'alum és una sal d'alumini:  $\text{Al(NH}_4\text{)(SO}_4\text{)}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Les sals d'alumini en medi aquos tendeixen a formar espècies gelatinoses en els porus de les glàndules sudorípares minimitzant la sortida de la suor. Això evita que hi hagi humitat i proliferin els bacteris responsables del mal olor.

En els darrers anys hi ha hagut força controvèrsia en relació a la utilització de sals d'alumini, i la seva possible influència en el desenvolupament de càncer de pit. Pel moment però no s'ha trobat cap relació clara. El que sí val la pena tenir en compte és el fet de que l'alumini pot ser tòxic, i per tant no és recomanable aplicar les seves sals sobre la pell irritada, ja que es pot absorbir més fàcilment.

També s'utilitzen compostos inorgànics com antiàcids. Per fer aquesta funció cal una sal que tingui caràcter amfòter o lleugerament bàsic. Un dels compostos més emprats és el que familiarment es coneix com bicarbonat,  $\text{NaHCO}_3$ . Amb l'àcid de l'estómac forma  $\text{CO}_2$ . Altres antiàcids són solucions tampó de  $\text{Al}^{\text{III}}$  o de  $\text{Bi}^{\text{III}}$ . Per exemple, per tractaments de l'úlcer gàstric s'administra una mescla de oxiclòrid de bismut ( $\text{BiOCl}$ ) i citrat de bismut, que forma una pel·lícula protectora sobre la llaga, evitant el contacte amb el medi àcid.

## Liti

Ja s'ha comentat que les sals de liti es fan servir en el tractament de trastorns bipolars. Es van començar a utilitzar en el segle XIX. Els tres compostos més emprats són: el carbonat de liti, citrat de liti i orotat de liti (Figura 19.3).

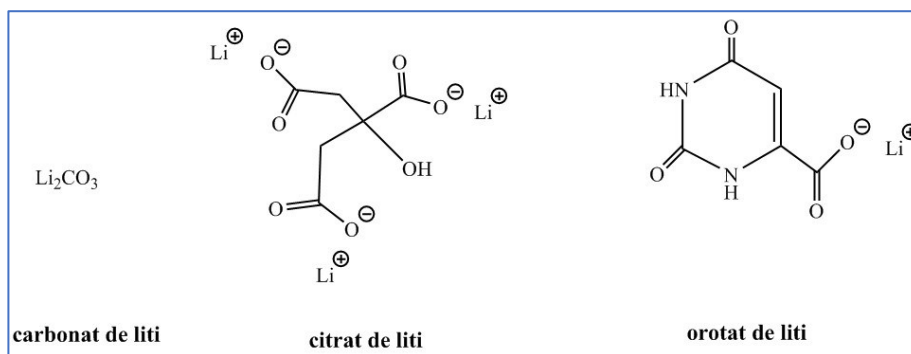


Figura 19.3 Compostos de liti emprats en tractaments per regular el trastorn bipolar.

### Difosfonats

Un altra grup de fàrmacs inorgànics són els difosfonats que s'utilitzen per tractar l'osteoporosi. La fórmula general d'aquests anions es mostra en la Figura 19.4. Hi ha un carboni amb dos grups fosfonat que serà el punt d'interacció amb el  $\text{Ca}^{2+}$  dels ossos. Aquest C té també un grup OH i el que varia entre els diferents fàrmacs és el grup R. Aquest grup orgànic ajuda a protegir la superfície de l'os de la redissolució.

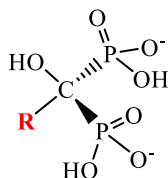


Figura 19.4 Formula general dels difosfonats, emprats en el tractament de l'osteoporosi.

## 19.2 Fàrmacs d'or (crisoteràpia)

Entre els 1925 i 1935 es feien servir fàrmacs d'or(I) per tractar la tuberculosi, però els resultats no eren molt bons i sovint hi havia efectes tòxics. Un dels fàrmacs del moment era el aurotiomalat de sodi (Figura 19.5); es va veure que aquest fàrmac alleugeria el dolor de les articulacions. Això va dur a Jacques Forestier a estudiar els seus efectes en l'artritis reumàtica i l'any 1935 publicava el resultat del seu estudi. A partir d'aquest compost inicial es va seguir la investigació buscant millorar l'eficàcia disminuint els efectes secundaris. <sup>54,55</sup>

El  $\text{Ag}^{\text{I}}$  és un àcid tou, per tant té afinitat per les bases toves, és a dir forma complexos estables amb tiolat ( $\text{R-S}^-$ ), i generalment presenta una geometria lineal, és a dir, que es coordina a dos grups tiolat. Un dels problemes que presenta és que pot desproporcionar donant espècies de  $\text{Au}^{\text{III}}$  que són les que provoquen els efectes secundaris.

En el medi biològic hi ha molècules que poden donar reaccions redox, oxidants o reductores. Per tant cal evitar la desproporció del  $\text{Au}^{\text{I}}$  o la seva oxidació. Per això cal que el complex sigui molt estable, i per això els millors són els lligands amb S.

Els primers fàrmacs, van ser compostos solubles en aigua, com el tiomalat de sodi i or, o l'aurotioglucosa; el problema d'aquests compostos és que no es poden administrar via oral, ja que amb el medi àcid de l'estomac s'hidrolitzen i es trenca l'enllaç  $\text{Au-S}$ . Per això s'administren via intramuscular (Figura 19.5).



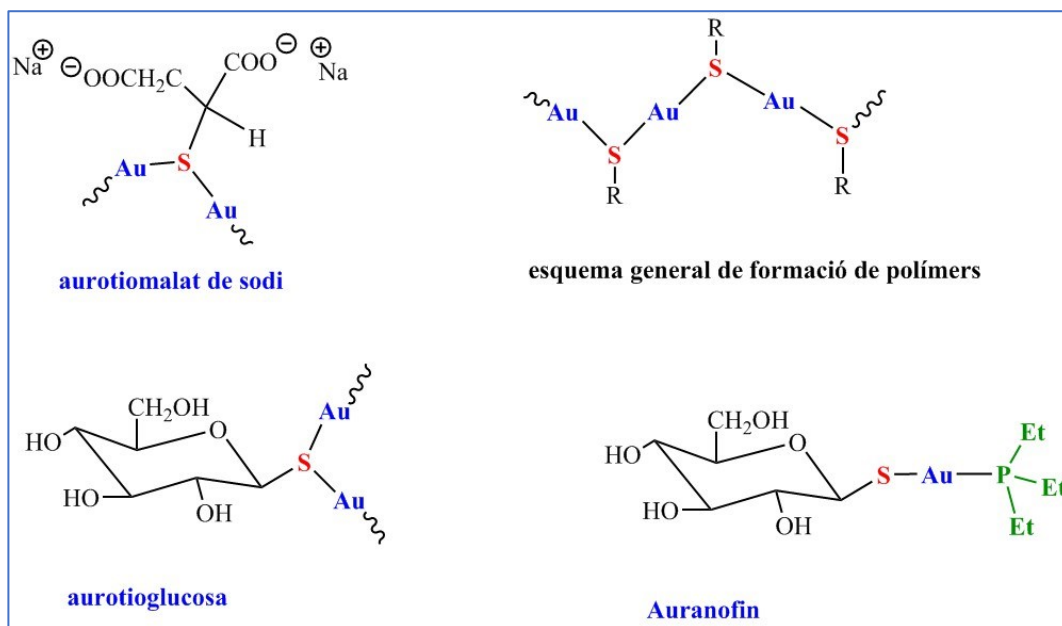


Figura 19.5 Fàrmacs d'or emprats en el tractament de l'artritis reumàtica.

Per evitar la hidròlisi i que es puguin administrar via oral s'han fet servir lligands  $\pi$ -àcid, com la trietilfosfina, emprada en el fàrmac auranofin. Aquest fàrmac és més estable i es pot administrar via oral. El mecanisme que es proposa és que en sang perd el grup  $\text{PEt}_3$  per coordinar-se a la albúmina, que és una proteïna rica en cisteïnes (Cys-SH). S'absorbeix aproximadament el 25% del compost, i va majoritàriament als lisosomes. En els lisosomes hi ha enzims hidrolítics, i sembla que el paper que hi juga el Au<sup>I</sup> és la inhibició d'aquests enzims. No està clar el mecanisme d'actuació però, probablement interacciona amb lligands Cys-S<sup>-</sup> i una possible explicació és que eviti l'entrecruament de proteïnes per formació d'enllaços S-S.

S'ha observat que els pacients fumadors retenen més quantitat d'or ja que el fum inhalat té unes 1700 ppm de HCN, que forma el complex  $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ .

L'artritis reumàtica és una inflamació dels teixits de les articulacions. En alguns casos pot ser degut a la presència d'espècies ROS, degut a que falla el sistema de defensa. En aquests casos l'administració de compostos de seleni (per afavorir l'eficàcia de la glutatió peroxidasa) o de SOD de Cu-Zn (per destruir els anions superòxid) resulta beneficiosa pel pacient.

### 19.3 Fàrmacs de platí

L'activitat antitumoral dels compostos de platí es va descobrir de forma accidental. S'estava estudiant el creixement cel·lular en presència d'un camp elèctric i es va observar la formació de filaments i a més, que s'inhibia la reproducció cel·lular però no s'inhibia el creixement cel·lular.

En altres estudis realitzats s'havia observat que els bacteris en presència de radiació d'energia elevada (UV o d'energia superior) formaven filaments i que hi havia un trencament de l'ADN; és a dir que la radiació d'una determinada energia podia tenir activitat antitumoral.

Per tant el fet de que en fer l'estudi de l'efecte del camp elèctric s'observés la formació de filaments va dur a pensar que podia haver-hi alguna espècie en el medi que tingués activitat antitumoral. Per tant el pas següent va ser trobar quines espècies hi havia en solució.

L'estudi realitzat feia servir elèctrodes de platí i una solució de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Quan es va analitzar el contingut de la solució es va determinar que hi havia diversos complexos de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  i  $\text{Pt}^{\text{IV}}$  amb lligands  $\text{Cl}^-$  i  $\text{NH}_3$ . Es

va analitzar quin d'aquests compostos tenia l'activitat antitumoral i es va veure que era el cis-diaminadichloroplatí(II) cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (Figura 19.6). L'ió Pt<sup>2+</sup> té una configuració electrònica d<sup>8</sup> i la geometria més favorable per un NC = 4 és la plana quadrada.

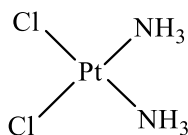


Figura 19.6 Primer fàrmac antitumoral de platí.

El pare d'aquest estudi va ser Barnett Rosenberg i el descobriment es va produir en el 1965.<sup>56</sup> Al cap de dos anys havien identificat l'espècie responsable d'aquesta activitat. Després ells mateixos ho van provar sobre tumors; en provar-ho en ratolins van veure que a dosis elevada aquest compost era altament tòxic, afectava al ronyó, però que a petites dosis el tumor anava disminuint fins a desaparèixer.

La comunitat científica treballant en el camp de l'oncologia eren molt escèptica, ja que en aquells moments ja se sabia que els metalls pesants eren tòxics. Per això cap laboratori els volia ajudar, ja que no creien en que pogués ser una línia de recerca profitosa. Però quan en el 1969 van tenir evidències de que funcionava en ratolins la cosa va canviar. L'any 1972 es provava per primer cop en pacients amb càncer de testicle avançat, que en aquell moment no tenia altra tractament possible. I finalment l'any 1978 als Estats Units es va aprovar la seva utilització com a fàrmac pel càncer d'ovari i de testicle en estat avançat.

A partir d'aquí el següent repte era saber com funcionava, és a dir quin era el seu mecanisme d'actuació. Es va estudiar la interacció entre l'ADN i el cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. Aquest complex de Pt<sup>II</sup> té dues posicions làbils, que son els dos clorurs. El fet de que siguin els clorurs els lligands làbils i no els amoníacs és degut al que es coneix com efecte "trans": els lligands en trans al NH<sub>3</sub> son més làbils que els que estan en trans a un Cl<sup>-</sup>.

Com ja s'ha comentat, la [Cl<sup>-</sup>] és molt diferent a l'espai exterior que a l'interior cel·lular [Cl<sup>-</sup>]<sub>ext</sub> >> [Cl<sup>-</sup>]<sub>int</sub>. Per tant, mentre el complex estigui en un medi ric en Cl<sup>-</sup> es conservarà en forma neutre (sense aquatitzar). Per altra banda, en ser un compost neutre podrà creuar amb més facilitat la membrana cel·lular que si fos iònic. Un cop a l'interior on la [Cl<sup>-</sup>] és baixa, hi ha la reacció d'aquatització que dona dos possibles espècies iòniques (Figura 19.7). Son aquestes espècies iòniques les que poden interaccionar amb l'ADN. En primer lloc hi ha una atracció electrostàtica amb els fosfats externs a la doble hèlix de l'ADN que afavoreix l'apropament i després hi ha la interacció o coordinació amb les bases nitrogenades.

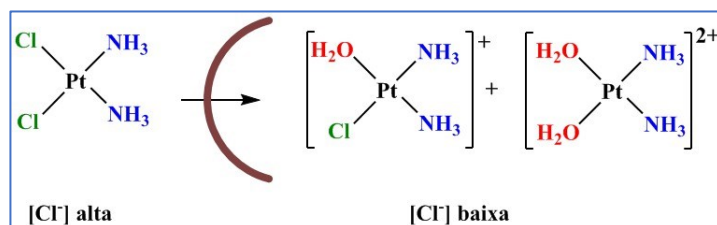


Figura 19.7 Aquatització del complex cis-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] en entrar a l'interior cel·lular.

Tot i que en la doble hèlix de l'ADN hi ha dos tipus de bases, purines i pirimidines, el complex de Pt<sup>II</sup> té molta més afinitat per les bases de tipus purina (Figura 19.8). S'ha observat que es pot coordinar a una sola base o a dos bases, que poden ser de la mateixa cadena o una de cada cadena.

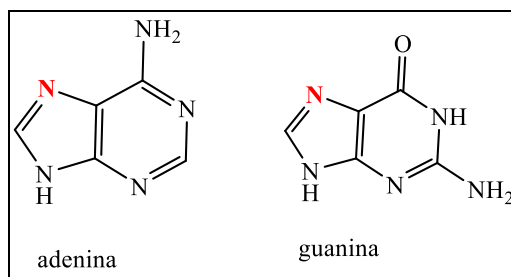


Figura 19.8 Bases nitrogenades de l'ADN a les que s'enllaça el Pt<sup>II</sup>. En vermell s'indica la posició de coordinació del cis-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>.

La reacció entre el cis-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> i l'ADN es va estudiar per RMN de <sup>195</sup>Pt (I = 1/2 i bundància 35%). Al cap de mitja hora d'estar en contacte ja s'observa la presència de Pt<sup>II</sup> coordinat a una base de l'ADN (Figura 19.9, B) amb una intensitat de pic similar a la de la forma sense interaccionar (A); s'aprecia també una petita quantitat de Pt<sup>II</sup> coordinat a dues bases de l'ADN (C). A mesura que passa el temps, els pics corresponents a la forma A i la forma B decreixen en intensitat augmentant la intensitat de pic de la forma C, que al cap de 9 hores ja és l'única forma existent.

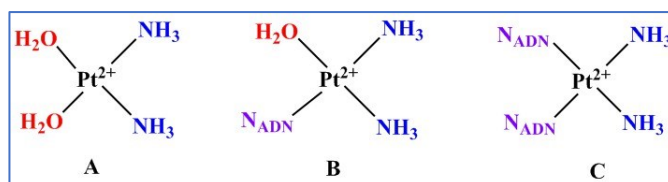


Figura 19.9 Progrés de la reacció entre el cis-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> i l'ADN.

A partir d'aquest estudi es va concloure que la coordinació del complex cis-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> amb l'ADN es dona per les dues posicions làbils.

Estudis realitzats amb el complex de Pt<sup>II</sup> amb dietilentriamina (dien), que només té una posició làbil [Pt(dien)Cl]<sup>+</sup> indiquen que també interacciona amb l'ADN, que es coordina a les bases adenina, [Pt(dien)N<sub>ADN</sub>]<sup>2+</sup>, però el compost no té activitat antitumoral. Això indica que per tal de que hi hagi activitat antitumoral cal que el complex de Pt<sup>II</sup> es coordini a dues bases nitrogenades.

S'ha comprovat que el complex de Pt<sup>II</sup> té preferència per coordinar-se a dues bases nitrogenades veïnes, de tipus purina, de la mateixa cadena. Les bases de tipus purina són l'adenina (A) i la guanina (G). En un 50% dels casos es coordina a G-G i un 25% a G-A.

Una de les qüestions que es planteja és perquè el trans-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] no té activitat antitumoral. Hi ha dos aspectes a tenir en compte:

- Per una banda la formació de l'espècie dicatiónica per pèrdua dels dos lligands Cl<sup>-</sup> és menys favorable que en el cas de l'isòmer cis, ja que el lligand Cl<sup>-</sup> en posició trans a H<sub>2</sub>O és menys làbil que quan està en trans a NH<sub>3</sub>. Per tant la formació de l'espècie amb dos posicions làbils és menys favorable. En la Figura 19.10 es mostren les espècies derivades de l'aquatització de l'isòmer trans.

- Per altra banda, l'espècie trans-[Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> també interacciona amb l'ADN coordinant-se a bases tipus purina, però donada la disposició dels lligands làbils a 180° no es pot coordinar a dues bases veïnes de la cadena d'ADN sinó que ho fa a bases alternes, G-X-A, podent ser X qualsevol base.

A part d'aquestes dues diferències es va observar en el cas de l'isòmer trans al cap de 24 h ja no queden restes de Pt<sup>II</sup> coordinat a l'ADN, el que indica que l'enllaç és més làbil que en l'isòmer cis.

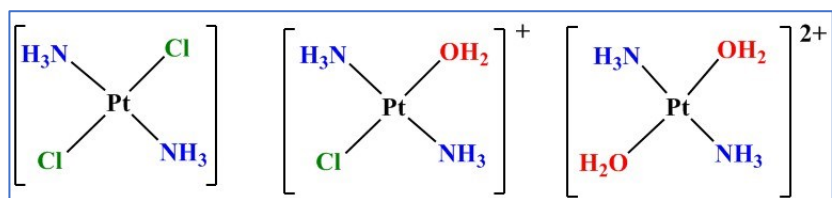


Figura 19.10  $trans$ - $[PtCl_2(NH_3)_2]$  i complexos derivats per aquatització.

La resolució estructural dels adductes formats entre el  $cis$ - $[PtCl_2(NH_3)_2]$  i l'ADN va permetre veure que en coordinar-se a bases veïnes hi ha un plegament de la doble hèlix (Figura 19.11)<sup>57</sup>. L'estabilitat del sistema ve reforçada per la presència d'enllaços per pont d'hidrogen entre els lligands  $NH_3$  i un grup fosfat de l'ADN i un grup  $O=C$  de la guanina coordinada.

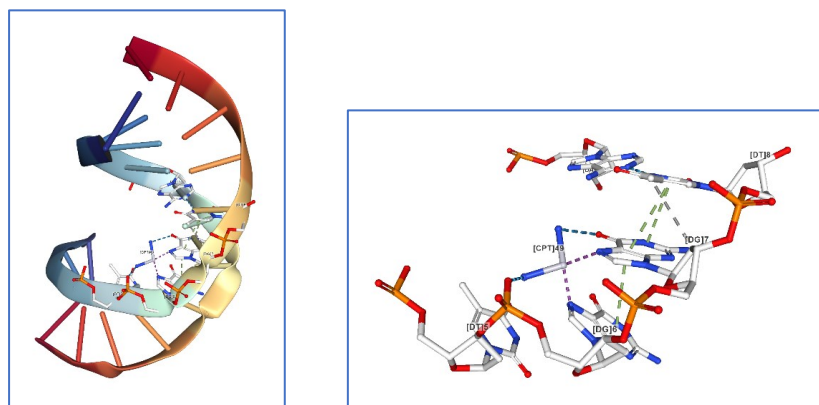


Figura 19.11 Coordinació del  $cis$ - $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$  a l'ADN i entorn del  $Pt^{II}$  (Codi PDB: 1A1O).

La distorsió en la doble hèlix de la cadena d'ADN inhibeix la replicació (no es forma nou ADN) i inhibeix la transcripció (no es forma l'ARN<sub>missatger</sub>). Per tant l'activitat antitumoral d'aquest fàrmac de platí no és deguda a que provoqui trencament de la cadena d'ADN sinó tan sols a la seva deformació.

Un dels problemes que presenta el  $cis$ - $[PtCl_2(NH_3)_2]$  és que no es pot administrar via oral, ja que amb el medi àcid de l'estomac els lligands  $NH_3$  es protonen i es descoordinen.

El  $cis$ - $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$  té molta afinitat per l'ADN, molta més que per qualsevol altre lligand biològic, però també pot interaccionar amb l'ARN, amb proteïnes i amb fosfolípids. La seva interacció amb les proteïnes del plasma sanguini, pels residus de cisteïna (Cys-SH), és la causant dels efectes secundaris del fàrmac.

L'administració de compostos del tipus ditiocarbamat (Figura 19.12) minimitza aquests efectes. En tenir dos grups S-donadors d'electrons poden coordinar-se al  $Pt^{II}$  evitant que ho facin amb les cisteïnes de les proteïnes.

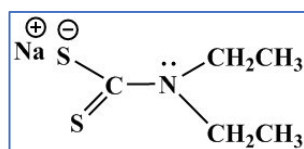


Figura 19.12 Dietilditiocarbamat de sodi.

La presència del catió  $cis$ - $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$  activa el sistema de defensa cel·lular contra aquest agent extern: la metal·lotioneïna (rica en Cys-SH) i el glutatió (G-SH), es coordinen al catió complex i

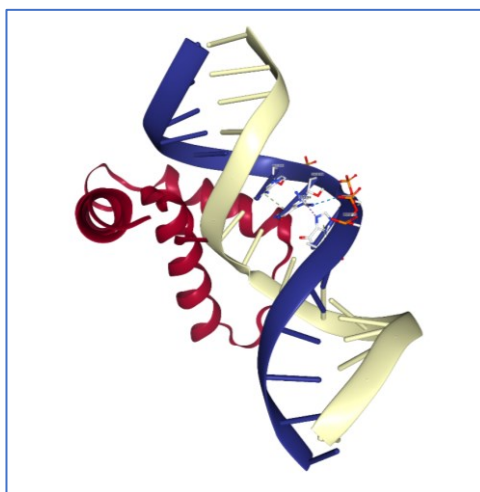
l'extreuen de la cèl·lula. Això el que comporta és que el fàrmac no pot actuar com a tal: s'ha eliminat del medi. Es diu que hi ha resistència al fàrmac.

El complex que ha superat aquest primer entrebanc arriba fins a l'ADN i es coordina a les bases, provocant la deformació de la doble hèlix. Aquí de nou la cèl·lula ho detecta i repara l'anomalia que hi ha a l'ADN. Per tant, un cop més el fàrmac no ha sigut eficaç.

La part d'ADN que no es repara és la que porta a l'apoptosi, la mort cel·lular, que és l'objectiu del fàrmac, acabar amb les cèl·lules tumorals.

Hi ha una part dels adductes formats pel  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  i l'ADN que la cèl·lula no detecta com anòmal, i per tant no el repara.

En les cèl·lules hi ha una família de proteïnes, conegudes com proteïnes de reconeixement molecular, que es troben tant en el citosol com en el nucli. Alguns factors de transcripció genètica formen part d'aquesta família de proteïnes. Aquestes proteïnes contenen uns dominis (o fragments de la cadena) formats per uns 80 aminoàcids, que es coneixen com dominis d'alta mobilitat en gel (HMG). És per aquestes posicions que els factors de transcripció interaccionen amb l'ADN. Es disposa de la resolució estructural de l'adducte format pel complex de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  i l'ADN ( $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{N}_{\text{ADN}})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ ) i un domini HMG dels factors de transcripció (Figura 19.13).<sup>58</sup> Com es pot veure en la Figura aquesta proteïna interacciona en la mateixa regió de l'ADN en la que hi ha l'adducte  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{N}_{\text{ADN}})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ .



*Figura 19.13 Interacció entre l'adducte  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{N}_{\text{ADN}})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  i una proteïna d'alta mobilitat en gel (HMG). En vermell la proteïna HMG i en blau i groc pàl·lid la doble hèlix de l'ADN. El complex de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  està unit a la cadena blava (Codi PDB 1CKT).*

Tornant al tema de perquè les cèl·lules tumorals no reparen l'ADN que conté l'adducte  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{N}_{\text{ADN}})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  una possible explicació és que hi hagi una certa competència per aquest punt de unió entre el complex de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  i la proteïna amb el domini HMG, o be que part del factor de transcripció genètica queda unit a aquesta regió on hi ha el complex de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  però sense realitzar la funció de transcripció. En tots dos casos, el resultat és l'apoptosi i en conseqüència, la mort cel·lular.

L'altra qüestió no resolta és per què el fàrmac de platí té més efecte en les cèl·lules canceroses que en les normals. Una possible explicació pot ser que en les cèl·lules tumorals falli el sistema reparador, o que sigui més lent.

El fàrmac  $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  tot i que va ser un gran descobriment, tenia també les seves pegues: no funciona per tots els tipus de càncer i presenta efectes secundaris. Això va dur a investigar nous compostos de platí amb l'objectiu de reduir la seva toxicitat. Tenint en compte que els efectes secundaris

son deguts a la interacció del complex catiónic, la qüestió rau en buscar compostos en els que el compost neutre trigui més temps en hidrolitzar-se. Per exemple, el  $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$  té un  $t_{1/2} \sim 1,5-3,6$  hores, en canvi si se substitueixen els dos lligands  $\text{Cl}^-$  per un lligand bidentat dianiònic com és el 1,1-ciclobutanodicarboxilat (cbdc),  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{cbdc})(\text{NH}_3)_2]$ , el  $t_{1/2} \sim 30$  h. La hidròlisi del lligand dicarboxilat és molt més lenta que la de dos lligands monodentats, per tant circularà menys temps en forma iònica, que és quan pot interaccionar amb altres proteïnes.

A partir dels diferents estudis realitzats es van extreure unes pautes que han de complir els fàrmacs de platí per millorar la seva relació entre eficàcia i efectes adversos:

- Els complexos de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  plano-quadrats són millors que els de  $\text{Pt}^{\text{IV}}$ .
- Els dos lligands làbils han d'estar en posició cis.
- Hi ha d'haver algun grup N-H per poder formar enllaç per pont d'hidrogen entre el fàrmac i un grup fosfat de l'ADN per estabilitzar el sistema.
- Han de ser compostos solubles i suficientment estables.
- Els compostos neutres són menys tòxics i creuen més fàcilment la membrana cel·lular.
- El  $t_{1/2}$  és important. Si s'hidrolitzen massa ràpid donen masses efectes secundaris, però si la hidròlisi és excessivament lenta és difícil que arribin a l'ADN i interaccionin.

En la Figura 19.14 es mostren diferents compostos de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  utilitzats en tractaments pel càncer. El fàrmac *cisplatí*, va ser el punt de partida, després van venir els fàrmacs de segona generació, com són el *carboplatí*, *oxaliplatí* i el *nedaplatí*, i en la tercera generació de fàrmacs hi ha el *lobaplatí* i el *heptaplatí*.

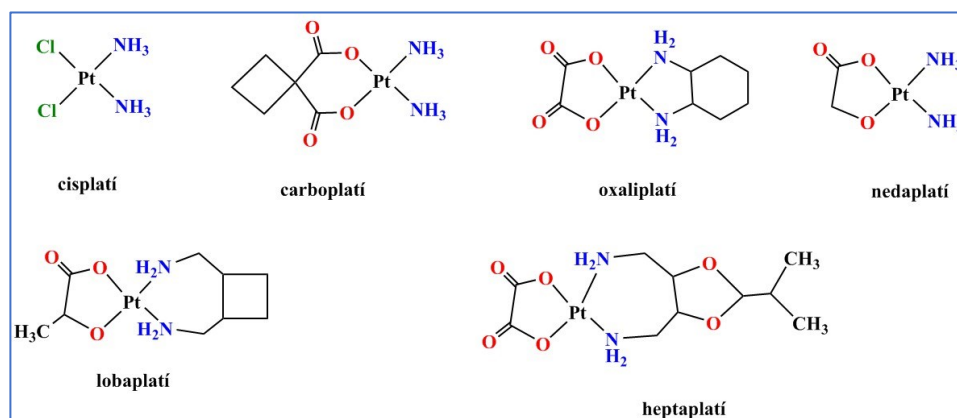


Figura 19.14 Fàrmacs de  $\text{Pt}^{\text{II}}$  utilitzats en el tractament de diferents tipus de càncer.

## 19.4 Agents de contrast

La utilització dels composts metàl·lics en medicina cobreix dues vessants ben diferenciades: per una banda els fàrmacs per combatre una malaltia, i per l'altre fàrmacs que s'utilitzen com agent de contrast, que és del que es parla en aquesta secció.

Tal i com el seu nom indica un agent de contrast permet visualitzar millor una zona concreta del cos (teixit o òrgan); per visualitzar-ho millor cal que es diferenciï de l'entorn i això és el que fa l'agent de contrast.

### Agent de contrast en radiologia

Un agent de contrast emprat en radiologia ha de ser opac a la radiació X. Un d'aquests compostos és el  $\text{BaSO}_4$  que és un compost molt insoluble en aigua, i molt dens. Per tant la seva administració, en

forma de suspensió, permet fer un seguiment del seu pas per l'estomac i intestins. En ser poc soluble s'absorbeix molt poc i per tant els seus efectes tòxics son negligibles.

### **Agent de contrast en ressonància magnètica nuclear**

La utilització de la ressonància magnètica nuclear (RMN) en medicina permet obtenir imatges de RMN (RMNI o RMI) que aporten informació que pot ser útil en el diagnòstic d'algunes malalties. Aquesta tècnica el que fa és RMN de  $^1\text{H}$ , i fixa la seva atenció en els protons de l'aigua.

En RMN el temps de relaxació és el temps que triga el senyal en desaparèixer, és a dir el temps que triga en canviar l'orientació de l'espín nuclear ( $I = 1/2$ ) del protó. El temps que triga en relaxar depèn de la interacció que presenta aquest espín nuclear amb el medi. Aquest temps de relaxació degut a la interacció  $I \cdots \text{medi}$  és  $T_1$  (relaxació longitudinal). El temps de relaxació degut a la interacció  $I \cdots I$ ,  $T_2$ , correspon a la relaxació transversal, i afecta a l'amplada de banda.

En aquesta tècnica es fa servir un camp magnètic  $H = 1-1,5$  Tesles i una freqüència de radiació  $\nu = 40-70$  MHz. I les imatges que s'enregistren son del temps de relaxació, especialment de  $T_1$ .

En general, un teixit inflamat o teixit tumoral es diferencia de la resta de teixits del voltant quan es fa la RMI. Una possible explicació a aquest fet és que hi hagi presència de radicals i això afecta al RMI.

Un radical és una espècie paramagnètica  $S = 1/2$ . És ben sabut que els compostos de ions metàl·lics paramagnètics en RMN donen senyals amples i molt desplaçades. A més, la presència de l'ió paramagnètic afavoreix la relaxació deguda a la interacció  $I \cdots \text{medi}$ . Per tant la presència de ions paramagnètics (espín electrònic  $S \neq 0$ ) fa disminuir el  $T_1$ .

Per tant, basant-se amb això, si s'administra un compost paramagnètic que vagi al lloc que es vol visualitzar per RMI, el  $T_1$  en aquella zona disminuirà molt i per tant serà molt diferent a la del teixit del voltant. És a dir, el contrast serà més alt. Així doncs, per tal d'aconseguir el màxim de contrast cal un ió metàl·lic que tingui un espín electrònic ( $S$ ) molt alt, el màxim possible.

Entre els elements del bloc  $d$  el màxim valor de  $S$  que es pot obtenir amb un compost mononuclear és  $S = 5/2$ , que correspon a una configuració electrònica  $d^5$ :  $\text{Fe}^{\text{III}}$  o  $\text{Mn}^{\text{II}}$  d'espín alt. Entre els elements del bloc  $f$  el màxim és  $S = 7/2$  que correspon al lantànid  $\text{Gd}^{\text{III}}$ .

Així doncs, els **agents de contrast** utilitzats en **RMI** són compostos de **gadolini(III)**. De totes les RMI que es fan per diagnòstic, en un 30-40% dels casos s'utilitza algun agent de contrast. La utilització dels compostos de gadolini com agents de contrast es va iniciar l'any 1988. Onze anys més tard, dels 25 milions de RMI que es van fer al món, uns 8 milions eren amb agent de contrast, es a dir que ~32% es feien ja amb agent de contrast.

L'agent de contrast és un compost que no ha d'entrar a la cèl·lula i que ha de tenir una molècula d'aigua coordinada que s'intercanvia amb l'aigua del medi. El que es visualitza és la diferencia entre l'aigua que hi ha a l'interior cel·lular i la de l'exterior que és la que té la influència de l'agent paramagnètic.

Les condicions que ha de complir un compost per poder-lo utilitzar com agent de contrast en RMI són:

- El catió metàl·lic ha de tenir un espín electrònic elevat per poder modificar al màxim el  $T_1$ . El millor és el  $\text{Gd}^{\text{III}}$  que té  $S = 7/2$ .
- Que sigui un complex estable, per evitar la presència del catió lliure que podria competir amb cations essencials i/o interaccionar amb lligands biològics.
- Els lligands que tingui el complex han de servir per dirigir-lo cap al teixit que es vol analitzar, és a dir es busca la màxima selectivitat.

- Ha de poder-se eliminar fàcilment. Cal que resti al cos el temps suficient per fer la prova però que no quedi retingut massa temps més.
- Ha de ser el menys tòxic possible. Els compostos neutres són menys tòxics que els iònics. Per altra banda, si tenen més d'un lligand làbil presenten més toxicitat.

Així doncs el més idoni és un compost de  $Gd^{III}$  amb un lligand polidentat (que confereix elevada estabilitat) i una sola posició làbil ocupada per una molècula de  $H_2O$ . Com que el gadolini és un metall del bloc *f* és voluminós i pot presentar NC elevat; fàcilment pot formar complexos amb  $NC = 9$ . Es poden emprar lligands que tinguin 8 posicions de coordinació, i la novena posició en l'entorn del metall és la que ocupa l'aigua.

En la Figura 19.15 es poden veure dos dels compostos utilitzats. Modificant el lligand polidentat es pot modular l'estabilitat del complex, la seva solubilitat i la selectivitat pel teixit a on ha d'arribar. Per exemple, si es vol visualitzar un os, al lligand se li hi pot penjar un grup difosfonat, de forma que tingui afinitat pels ossos.

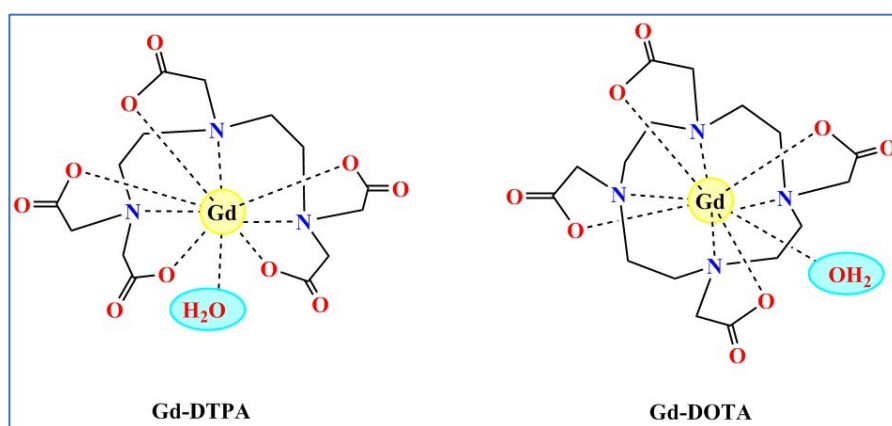


Figura 19.15 Compostos de  $Gd(III)$  utilitzats com agents de contrast per RMI.

El grau de labilitat de la molècula d'aigua depèn de la distància  $Gd-OH_2$ , que depèn del lligand polidentat (distorció que provoca, densitat electrònica que aporta, etc). Com més làbil sigui l'aigua, més ràpid és l'intercanvi amb l'aigua de l'entorn, i per tant, més afecta al  $T_1$  i hi ha més contrast. Ara be, en ser més làbil el compost és més tòxic. Per tant, cal arribar al compromís entre els beneficis i els efectes nocius.

## 19.5 Radiofàrmacs

Els elements radioactius, tot i la seva toxicitat o perillositat, tenen aplicació en medicina. Com ja s'ha comentat, no es poden posar tots en el mateix sac, ja que els diferents núclids tenen característiques diferents, en quant a la radiació, les partícules emeses i el temps de semidesintegració.

Els radiofàrmacs es poden classificar en dos grups segons la seva aplicació:

- Radiofàrmacs per diagnòstic: compostos que s'utilitzen com agents de contrast.
- Radiofàrmacs per teràpia: l'objectiu és la destrucció de les cèl·lules tumorals.

### *Radiodiagnòstic: gammagrafia*

En alguns casos per fer un diagnòstic cal utilitzar tècniques en que l'agent de contrast conté un nucli radioactiu. En aquests casos el que es detecta és la radiació emesa per aquest compost en un determinat punt del cos. Aquesta és la base de la gammagrafia, en que s'enregistra la imatge de la radiació emesa.



L'objectiu és exclusivament el diagnòstic, per tant cal que el núclid sigui el menys agressiu possible. Els requisits que ha de complir són:

- Cal que el  $t_{1/2}$  de l'isòtop radioactiu emprat sigui relativament curt: que doni temps a preparar el compost, administrar-lo i fer la prova, però que no resti massa més temps en el cos.
- La radiació que emeti ha de ser de baixa energia, per tal de que sigui el menys perjudicial possible.
- No ha d'emetre partícules  $\alpha$  ni  $\beta$ , que són destructives.
- El compost ha de ser estable per evitar la interacció amb proteïnes i altres biomolècules.
- Els lligands que hi hagi al voltant de l'ió central han de modular la seva selectivitat pel teixit que es vol visualitzar. És a dir que el compost ha de ser el màxim de selectiu, evitant que pugui afectar a teixits o òrgans veïns.

Aproximadament en el **80% de les gammagrafies** el nucli radioactiu que es fa servir és el  $^{99m}\text{Tc}$  (tecneci 99 metaestable). El tecneci és un element peculiar, ja que tots els seus isòtops tenen un temps de vida mitja molt curt. Les característiques del  $^{99m}\text{Tc}$  que el fan el candidat idoni per radiodiagnòstic són:

- Energia de la radiació emesa: 140 keV.
- Temps de semidesintegració:  $t_{1/2} \sim 6$  hores.
- El compost  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  és molt fàcil d'obtenir i a partir d'aquest, s'obtenen els altres agents de contrast.

El  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  s'obté passant sèrum fisiològic per un generador que conté alumina i  $^{99}\text{MoO}_4^-$ ; la solució resultant té una concentració de l'ordre de  $10^{-7}$  o  $10^{-8}$  M. A partir d'aquest compost de  $^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}$ , per reducció, es preparen els altres compostos amb diferents estats d'oxidació i diferents lligands.

Alguns dels compostos utilitzats es mostren en la Figura 19.16. L'estat d'oxidació del metall radioactiu i els lligands modulen la geometria del compost i l'afinitat pels diferents tipus de teixits. Per exemple, per diagnosticar malalties de tipus neurodegeneratiu, com son l'Alzheimer o el Pàrkinson, es fa servir un compost que conté un grup amb característiques estructurals similars a la cocaïna. La cocaïna bloqueja el transport de dopamina i per tant un fàrmac que contingui un grup similar pot ajudar en el diagnòstic de problemes neurològics.

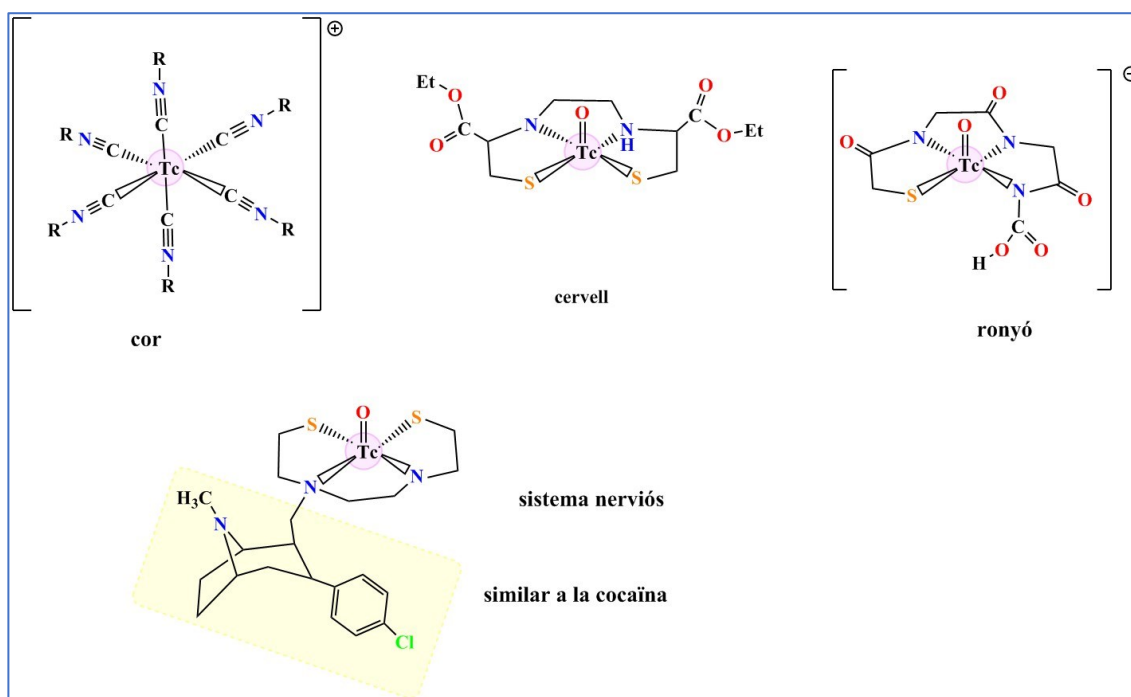


Figura 19.16 Radiofàrmacs utilitzats com agents de contrast.

Hi ha altres fàrmacs radioactius utilitzats també en diagnòstic. Per exemple, per visualitzar la **glàndula tiroide**, com que la major part del iode del cos està localitzat allà, es fa servir l'isòtop radioactiu de iode,  $^{131}\text{I}$ .

Un altre dels isòtops àmpliament emprat és el  $^{67}\text{Ga}$  que té un temps de vida mitja d'unes 78 h. El catió  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  en ser semblant al  $\text{Fe}^{3+}$  pot ser transportat per la transferrina. En general s'administra com a citrat de gal·li i en la sang s'uneix ràpidament a la transferrina.

Cal no confondre el  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  (element del bloc p) utilitzat en fàrmacs radioactius per diagnòstic, amb el  $\text{Gd}^{3+}$  (element del bloc f) utilitzat també com agent de contrast, però que no és radioactiu i s'utilitza en RMNI.

### Radioteràpia

En aquest cas cal que el nucli radioactiu emeti partícules  $\alpha$  i/o  $\beta$  al seu voltant. Ha de ser més agressiu que quan es fa servir per diagnòstic. L'objectiu és que s'emeti la radiació de forma localitzada. L'aplicació de la radiació pot ser de forma externa, o bé de forma interna, introduint la font de radioactivitat al lloc on es vol que actui.

La unitat que mesura l'energia de la radiació absorbida per la matèria és el gray, Gy.  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J Kg}^{-1}$ . L'energia que s'absorbeix depèn del material, tipus de teixit o òrgan.

La radiació ambiental és  $\sim 0,002 \text{ Gy}$ ; la que es fa servir en radiodiagnòstic ha de ser inferior a  $0,001 \text{ Gy}$ . En canvi la que s'utilitza en teràpia és major a  $1 \text{ Gy}$ .

Com que l'aplicació de radiació pot provocar el trencament d'enllaços covalents i la formació de radicals, en alguns casos s'administra  $^{131}\text{I}$  per tal d'estimular la síntesi de glutatió (G-SH) i activar la glutatió peroxidasa que protegeixen dels radicals.

En radioteràpia per les tiroides s'utilitza el  $^{131}\text{I}$ ; pels ossos es fan servir composts de  $^{186}\text{Re}$  amb lligands difosfonat, que com ja s'ha comentat, tenen molta afinitat pel teixit ossi.

## 20. BIBLIOGRAFIA

- (1) Saito, M. A.; Sigman, D. M.; Morel, F. M. M. The Bioinorganic Chemistry of the Ancient Ocean: The Co-Evolution of Cyanobacterial Metal Requirements and Biogeochemical Cycles at the Archean–Proterozoic Boundary? *Inorganica Chim. Acta* **2003**, *356*, 308–318 DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00442-0](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00442-0).
- (2) Li, C.; Zhu, M.; Chu, X. Preface: Atmospheric and Oceanic Oxygenation and Evolution of Early Life on Earth: New Contributions from China. *J. Earth Sci.* **2016**, *27* (2), 167–169 DOI: [10.1007/s12583-016-0697-1](https://doi.org/10.1007/s12583-016-0697-1).
- (3) Dupont, C. L.; Reinhard, C. T.; Alessi, D. S.; Bekker, A.; Lalonde, S. V.; Poulton, S. W.; Hardisty, D. S.; Konhauser, K. O.; Partin, C. A.; Crowe, S. A.; Saito, M. A.; Kendall, B.; Planavsky, N. J.; Lyons, T. W.; Robbins, L. J.; Gill, B. C.; Scott, C. Trace Elements at the Intersection of Marine Biological and Geochemical Evolution. *Earth-Science Reviews*. 2016, pp 323–348.
- (4) Kaim, Wolfgang; Schwederski, B. *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life. An Introduction and Guide*; John Wiley & Sons, Ed.; Wiley, 1994.
- (5) Liddington, R.; Derewenda, Z.; Dodson, E.; Hubbard, R.; Dodson, G. High Resolution Crystal Structures and Comparisons of T-State Deoxyhaemoglobin and Two Liganded T-State Haemoglobins: T( $\alpha$ -Oxy)Haemoglobin and T(Met)Haemoglobin. *J. Mol. Biol.* **1992**, *228* (2), 551–579 DOI: [10.1016/0022-2836\(92\)90842-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90842-8).
- (6) Westhof, E. Re-Refinement of the b-Dodecamer d(Cgccaaticgcg) with a Comparative Analysis of the Solvent in It and in the z-Hexamers d(Sbrsgsbrcgsbrgcg). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *5* (3), 581–600 DOI: [10.1080/07391102.1987.10506414](https://doi.org/10.1080/07391102.1987.10506414).
- (7) Repke, K. R. H.; Schön, R. Chemistry and Energetics of Transphosphorylations in the Mechanism of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transporting ATPase: An Attempt at a Unifying Model. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1993**, *1154* (1), 1–16 DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(93\)90014-F](https://doi.org/10.1016/0304-4157(93)90014-F).
- (8) Sun, X. L.; Baker, H. M.; Shewry, S. C.; Jameson, G. B.; Baker, E. N. Structure of Recombinant Human Lactoferrin Expressed in *Aspergillus Awamori*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1999**, *55* (2), 403–407 DOI: [10.1107/S09074444998011226](https://doi.org/10.1107/S09074444998011226).
- (9) Bali, P. K.; Zak, O.; Aisen, P. A New Role for the Transferrin Receptor in the Release of Iron from Transferrin. *Biochemistry* **1991**, *30* (2), 324–328 DOI: [10.1021/bi00216a003](https://doi.org/10.1021/bi00216a003).
- (10) Carmona, F.; Palacios, Ò.; Gálvez, N.; Cuesta, R.; Atrian, S.; Capdevila, M.; Domínguez-Vera, J. M. Ferritin Iron Uptake and Release in the Presence of Metals and Metalloproteins: Chemical Implications in the Brain. *Coordination Chemistry Reviews*. 2013, pp 2752–2764.
- (11) Small, G. W.; Allewell, N. M.; Theil, E. C.; Shi, D.; Ha, Y. Crystal Structure of Bullfrog M Ferritin at 2.8 Å Resolution: Analysis of Subunit Interactions and the Binuclear Metal Center. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, *4* (3), 243–256 DOI: [10.1007/s007750050310](https://doi.org/10.1007/s007750050310).
- (12) Friedman, A.; Arosio, P.; Finazzi, D.; Koziorowski, D.; Galazka-Friedman, J. Ferritin as an Important Player in Neurodegeneration. *Parkinsonism and Related Disorders*. 2011, pp 423–430.
- (13) Bazylinski, D. A.; Lefèvre, C. T.; Schüler, D. Magnetotactic Bacteria. In *The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry*; 2013; pp 453–494.
- (14) Spring, S.; Schleifer, K. H. Diversity of Magnetotactic Bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **1995**, *18* (2), 147–153 DOI: [10.1016/S0723-2020\(11\)80386-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80386-3).
- (15) Gordon, L. M.; Joester, D. Nanoscale Chemical Tomography of Buried Organic-Inorganic Interfaces in the Chiton Tooth. *Nature* **2011**, *469* (7329), 194–198 DOI: [10.1038/nature09686](https://doi.org/10.1038/nature09686).
- (16) Wiltschko, R.; Wiltschko, W. Avian Navigation: From Historical to Modern Concepts. *Animal*

- Behaviour*. 2003, pp 257–272.
- (17) Wiltschko, W.; Wiltschko, R.; Ritz, T. The Mechanism of the Avian Magnetic Compass. In *Procedia Chemistry*; 2011; Vol. 3, pp 276–284.
  - (18) Salinas, A. J.; Esbrit, P.; Vallet-Regí, M. A Tissue Engineering Approach Based on the Use of Bioceramics for Bone Repair. *Biomaterials Science*. 2013, pp 40–51.
  - (19) Huang, H.; Scott, R. A.; Adams, M. W. W.; Rees, D. C.; Kurtz, D. M.; Bau, R.; Eidsness, M. K. Crystal Structure of Rubredoxin from *Pyrococcus Furiosus* at 0.95 Å Resolution, and the Structures of N-Terminal Methionine and Formylmethionine Variants of Pf Rd. Contributions of N-Terminal Interactions to Thermostability. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 3 (5), 484–493 DOI: 10.1007/s007750050258.
  - (20) Blanksby, S. J.; Ellison, G. B. Bond Dissociation Energies of Organic Molecules. *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36 (4), 255–263 DOI: 10.1021/ar020230d.
  - (21) Tinberg, C. E.; Lippard, S. J. Dioxygen Activation in Soluble Methane Monooxygenase. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (4), 280–288 DOI: 10.1021/ar1001473.
  - (22) Decker, H.; Schweikardt, T.; Tuczek, F. The First Crystal Structure of Tyrosinase: All Questions Answered? *Angewandte Chemie - International Edition*. 2006, pp 4546–4550.
  - (23) Shraddha, Ravi Shekher; Sehgal, Simran; Kamthania, Mohit; Kumar, A. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification and Potencial Biotechnological Applications. *Enzyme Res.* **2011**, 2011 (ID 217861), 11 DOI: 104061/2011/217861.
  - (24) Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (40), 37663–37669 DOI: 10.1074/jbc.M204571200.
  - (25) Bjornsson, R.; Neese, F.; DeBeer, S. Revisiting the Mössbauer Isomer Shifts of the FeMoco Cluster of Nitrogenase and the Cofactor Charge. *Inorg. Chem.* **2017**, 56 (3), 1470–1477 DOI: 10.1021/acs.inorgchem.6b02540.
  - (26) Siegbahn, P. E. M. Model Calculations Suggest That the Central Carbon in the FeMo-Cofactor of Nitrogenase Becomes Protonated in the Process of Nitrogen Fixation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138 (33), 10485–10495 DOI: 10.1021/jacs.6b03846.
  - (27) Volbeda, A.; Charon, M. H.; Piras, C.; Hatchikian, E. C.; Frey, M.; Fontecilla-Camps, J. C. Crystal Structure of the Nickel-Iron Hydrogenase from *Desulfovibrio Gigas*. *Nature* **1995**, 373 (6515), 580–587 DOI: 10.1038/373580a0.
  - (28) Ogata, H.; Kellers, P.; Lubitz, W. The Crystal Structure of the [NiFe] Hydrogenase from the Photosynthetic Bacterium *Allochromatium Vinosum*: Characterization of the Oxidized Enzyme (Ni-A State). *J. Mol. Biol.* **2010**, 402 (2), 428–444 DOI: 10.1016/j.jmb.2010.07.041.
  - (29) Lubitz, W.; Ogata, H.; Rüdiger, O.; Reijerse, E. Hydrogenases. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (8), 4081–4148 DOI: 10.1021/cr4005814.
  - (30) Evans, R. M.; Brooke, E. J.; Wehlin, S. A. M.; Nomerotskaia, E.; Sargent, F.; Carr, S. B.; Phillips, E. V.; Armstrong, F. A.; Oxford, H.; Table, S. Mechanism of Hydrogen Activation by [NiFe] -Hydrogenases Supplementary Information Contents. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 12, 1–16 DOI: 10.1038/nchembio.1976.
  - (31) Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J. R.; Kamiya, N. Crystal Structure of Oxygen-Evolving Photosystem II at a Resolution of 1.9Å. *Nature* **2011**, 473 (7345), 55–60 DOI: 10.1038/nature09913.
  - (32) Kawakami, K.; Umena, Y.; Kamiya, N.; Shen, J. R. Structure of the Catalytic, Inorganic Core of Oxygen-Evolving Photosystem II at 1.9 Resolution. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2011, pp 9–18.
  - (33) Kok, B.; Forbush, B.; McGloin, M. Cooperation of Charges in Photosynthetic O<sub>2</sub> Evolution - 1.

- A Linear Four Step Mechanism Photochemistry and Photobiology. *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11* (6), 457–475.
- (34) Barber, J. Mn<sub>4</sub>Ca Cluster of Photosynthetic Oxygen-Evolving Center: Structure, Function and Evolution. *Biochemistry* **2016**, *55* (42), 5901–5906 DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00794.
- (35) Zhang, B.; Sun, L. Why Nature Chose the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> Cluster as Water-Splitting Catalyst in Photosystem II: A New Hypothesis for the Mechanism of O-O Bond Formation. *Dalton Transactions*. 2018, pp 14381–14387.
- (36) Rees, D. C.; Lewis, M.; Lipscomb, W. N. Refined Crystal Structure of Carboxypeptidase A at 1.54 Å Resolution. *J.Mol.Biol.* **1983**, *168*, 367–387 DOI: 10.2210/PDB5CPA/PDB.
- (37) Mazzei, L.; Cianci, M.; Benini, S.; Bertini, L.; Musiani, F.; Ciurli, S. Kinetic and Structural Studies Reveal a Unique Binding Mode of Sulfite to the Nickel Center in Urease. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *154*, 42–49 DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.11.003.
- (38) Edenberg, H. J. The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Res. Health* **2007**, *30* (1), 5–13.
- (39) Mohammed Abdul, K. S.; Jayasinghe, S. S.; Chandana, E. P. S.; Jayasumana, C.; De Silva, P. M. C. S. Arsenic and Human Health Effects: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015, pp 828–846.
- (40) Hughes, M. F. Arsenic Toxicity and Potential Mechanisms of Action. *Toxicol. Lett.* **2002**, *133* (1), 1–16.
- (41) Akter, K. F.; Owens, G.; Davey, D. E.; Naidu, R. Arsenic Speciation and Toxicity in Biological Systems; 2005; pp 97–149.
- (42) Rayman, M. P. Selenium and Human Health. *The Lancet*. 2012, pp 1256–1268.
- (43) Nogueira, C. W.; Rocha, J. B. T. Toxicology and Pharmacology of Selenium: Emphasis on Synthetic Organoselenium Compounds. *Archives of Toxicology*. 2011, pp 1313–1359.
- (44) Jakobsson, E.; Argüello-Miranda, O.; Chiu, S. W.; Fazal, Z.; Kruczek, J.; Nunez-Corrales, S.; Pandit, S.; Pritchett, L. Towards a Unified Understanding of Lithium Action in Basic Biology and Its Significance for Applied Biology. *Journal of Membrane Biology*. 2017, pp 587–604.
- (45) Strupp, C. Beryllium Metal II. A Review of the Available Toxicity Data. *Annals of Occupational Hygiene*. 2011, pp 43–56.
- (46) Shah, A. N.; Tanveer, M.; Hussain, S.; Yang, G. Beryllium in the Environment: Whether Fatal for Plant Growth? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2016, pp 549–561.
- (47) Crisponi, G.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Nurchi, V. M.; Crespo-Alonso, M.; Lachowicz, J. I.; Faa, G. The Meaning of Aluminium Exposure on Human Health and Aluminium-Related Diseases. *Biomolecular Concepts*. 2013, pp 77–87.
- (48) Bondy, S. C. Low Levels of Aluminum Can Lead to Behavioral and Morphological Changes Associated with Alzheimer’s Disease and Age-Related Neurodegeneration. *NeuroToxicology*. 2016, pp 222–229.
- (49) Exley, C. Human Exposure to Aluminium. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*. 2013, pp 1807–1816.
- (50) Bush, A. I. The Metal Theory of Alzheimer’s Disease. *Adv. Alzheimer’s Dis.* **2012**, *3*, 277–281 DOI: 10.3233/978-1-61499-154-0-277.
- (51) Charlet, L.; Chapron, Y.; Faller, P.; Kirsch, R.; Stone, A. T.; Baveye, P. C. Neurodegenerative Diseases and Exposure to the Environmental Metals Mn, Pb, and Hg. *Coordination Chemistry Reviews*. 2012, pp 2147–2163.
- (52) Peter, A. L. J.; Viraraghavan, T. Thallium: A Review of Public Health and Environmental Concerns. *Environ. Int.* **2005**, *31* (4), 493–501 DOI: 10.1016/j.envint.2004.09.003.

- (53) Kazantzis, G. Thallium in the Environment and Health Effects. *Environ. Geochem. Health* **2000**, 22 (4), 275–280 DOI: 10.1023/A:1006791514080.
- (54) Shinde, C. G.; Venkatesh, M. P.; Kumar, T. M. P.; Shivakumar, H. G. Methotrexate: A Gold Standard for Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J. Pain Palliat. Care Pharmacother.* **2014**, 28 (4), 351–358 DOI: 10.3109/15360288.2014.959238.
- (55) Best, S. L.; Sadler, P. J. Gold Drugs: Mechanism of Action and Toxicity. *Gold Bull.* **1996**, 29 (3), 87–93 DOI: 10.1007/BF03214741.
- (56) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode [17]. *Nature.* 1965, pp 698–699.
- (57) Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. Crystal Structure of Double-Stranded DNA Containing the Major Adduct of the Anticancer Drug Cisplatin. *Nature* **1995**, 377 (6550), 649–652 DOI: 10.1038/377649a0.
- (58) Ohndorf, U. M.; Rould, M. A.; He, Q.; Pabo, C. O.; Lippard, S. J. Basis for Recognition of Cisplatin-Modified DNA by High-Mobility-Group Proteins. *Nature* **1999**, 399 (6737), 708–712 DOI: 10.1038/21460.

### Base de dades de proteïnes

La Royal Chemical Society (RSC) te un banc de dades estructurals de proteïnes i àcids nucleics (PDB) que permet cercar i visualitzar diferents biomolècules. <https://www.rcsb.org/>