
3. INTRODUCCIÓ A LA MODELITZACIÓ EN ELS ESTUDIS D'ESPECIACIÓ QUÍMICA D'IONS METÀL·LICS EN ELS SISTEMES BIOLÒGICS

Anna Izquierdo-Ridorsa* i Romà Tauler*

Els fluids biològics són solucions aquoses que presenten un pH definit i que contenen compostos orgànics biològicament actius i ions metàl·lics. En aquests medis es produeixen interaccions químiques de coordinació que són bàsiques per al desenvolupament de la vida i que no es poden ignorar quan es desitja estudiar la bioquímica d'un sistema viu. En conseqüència, s'ha originat una nova disciplina que fa servir la part teòrica i experimental de la química inorgànica i de coordinació i la biologia molecular: la química de la biocoordinació (1, 2).

L'activitat biològica de moltes molècules i ions depèn directament de processos de coordinació lligand-protó i lligand-ió metàl·lic, que influeixen sobre diversos factors, com poden ser la velocitat de la reacció de formació d'una forma activa, la velocitat de transport del producte bioactiu fins al receptor i l'afinitat del compost actiu pel receptor.

La coordinació de les molècules bioactives amb determinats ions metàl·lics pot afectar tots els processos anteriors i, per tant, pot influir sobre l'activitat biològica d'un sistema. Aquest fet es va posar en evidència amb el descobriment, a mitjan dècada dels seixanta, que certs complexos metàl·lics poden inhibir la reproducció dels bacteris, actuant sobre les molècules de DNA. Aquesta informació va portar molts científics a dirigir la seva atenció cap a les seves possibles aplicacions mèdiques, principalment en el tractament de

* Departament de Química Analítica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona.

les malalties canceroses. El primer compost que va demostrar una activitat terapèutica eficaç en el tractament d'aquestes malalties va ser un complex de platí(II): $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (cisplatí) (3). El mecanisme pel qual aquesta substància pot interferir la transmissió de la informació genètica s'atribueix a la interacció de l'ió platí(II) amb les posicions de guanina de les cadenes de DNA, que altera l'estructura tridimensional d'aquestes cadenes, la qual cosa afecta la possibilitat de replicació i de divisió cel·lular, i el procés de creixement incontrolat s'acaba.

Encara que l'interès per la química de la biocoordinació va créixer a partir del descobriment de les propietats del cisplatí, l'estudi del comportament dels ions metàl·lics en els sistemes vius és bàsic, perquè aquests ions tenen un paper molt important en molts altres aspectes de la bioquímica molecular.

Per a poder conèixer el paper que tenen els ions metàl·lics en els sistemes vius, és necessari arribar a conèixer la composició, estructura i estabilitat dels complexos que formen aquests ions metàl·lics amb les molècules biològicament actives en solució.

El nombre de lligands possibles en un sistema biològic és molt elevat, perquè tots els compostos orgànics que contenen heteroàtoms amb parells solitaris d'electrons poden ésser capaços d'interaccionar amb els ions metàl·lics.

L'estudi de l'especiació en sistemes naturals entre els ions metàl·lics i els lligands de pes molecular baix (com els aminoàcids i els anions carbonat, fosfat, salicilat, ascorbat...) s'ha intentat a partir de càlculs quantitativs basats en equilibris termodinàmics múltiples tal com ha estat descrit en el capítol precedent d'aquest llibre. Aquests càlculs han d'ésser basats en les constants d'equilibri de totes les reaccions en competència i en les concentracions totals de tots els metalls i lligands presents, i es porten a terme per programes de simulació amb ordinador (5, 6).

En l'estudi de l'especiació en sistemes que contenen lligands macromoleculars, s'ha de tenir en compte que les característiques àcid-base i complexants d'aquests lligands poden ésser influïdes per la possible presència dels efectes secundaris següents: efecte polifuncional, efecte polielectrolític i efecte conformacional (7). Aquests efectes poden afectar l'estabilitat de les espècies que es formen i, a més, solen variar amb el grau de complexació i/o de desprotonació.

L'efecte polifuncional és degut a la presència en la macromo-

lècula de més d'un centre actiu diferent. Aquest efecte es pot observar, per exemple, en els àcids nucleics, els quals contenen diferents grups funcionals amb propietats àcid-base i complexants molt variades.

L'efecte polielectrolític es produeix a causa de la proximitat entre diferents centres funcionals de la macromolècula; la protonació o desprotonació d'un dels centres actius de la macromolècula modifica l'entorn (densitat electrònica, camp elèctric...) en què es troben els altres centres actius, i això pot afectar les característiques àcid-base d'aquests i dificulta o afavoreix el procés àcid-base. En aquests casos, no es té un valor definit de les constants d'equilibri, sinó que aquestes varien d'acord amb el grau d'avanç de la reacció.

L'efecte conformacional està relacionat amb els canvis de conformació que poden presentar-se en les macromolècules quan varien les condicions externes, com pot ser el pH o la concentració d'ions metàl·lics. Arribar a conèixer quina és la conformació de la macromolècula en cada moment té un gran interès perquè existeix una relació directa entre l'estructura tridimensional de les biomolècules i la seva funció biològica. Així, per exemple, l'estructura del DNA està formada per la unió de dues cadenes de polímer, en la qual les bases nitrogenades de cadascuna de les cadenes estan enllaçades per ponts d'hidrogen per a formar una doble hèlix. La formació d'aquesta doble hèlix fa possible una estructura regular i estable, amb la part interna hidròfoba i la part externa hidròfila. A temperatures superiors a la fisiològica, en medis d'acidesa superior a la fisiològica, o en presència de certs metalls pesants, es produeix una ruptura dels enllaços per pont d'hidrogen. La molècula de DNA perd aleshores la seva conformació inicial, i adquireix una conformació inactiva biològicament (molècula de DNA desnaturalitzada).

L'existència de tots aquests efectes fa que una avaluació exacta de les constants d'equilibri en els sistemes que contenen macromolècules sigui molt difícil i àdhuc impossible. Un primer intent de solucionar aquestes dificultats fou el d'assimilar cada macromolècula a una sèrie de compostos model de pes molecular baix amb centres actius de coordinació tan similars com fos possible als presents en la macromolècula. Així, en el cas dels polinucleòtids es poden considerar els mononucleòtids cíclics com a composts model, atès que presenten els mateixos centres de coordinació que cadascuna de les unitats monomèriques de la macromolècula (8).

No obstant això, i tot i que es poden trobar lligands model de pes molecular baix per a simular el comportament de qualsevol macromolècula, la validesa de l'extrapolació dels resultats obtinguts amb aquests models al comportament de les macromolècules és dubtosa, ja que aquests models no inclouen la influència que tenen els efectes polifuncional, polielectrolític i conformacional sobre les característiques àcid-base i de complexació de les macromolècules.

Una manera possible d'abordar l'estudi de les macromolècules és a partir de macromolècules model que contenen un tipus únic de grup funcional repetit al llarg de l'estructura. Així, pot estudiar-se la influència dels efectes polielectrolític i conformacional sobre les característiques àcid-base i de complexació, sense introduir complicacions addicionals degudes a la polifuncionalitat.

En el nostre grup de treball, en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, s'està treballant en la interpretació de les interaccions dels ions metàl·lics i del protó amb els àcids nucleics i amb els seus constituents en condicions semblants a les fisiològiques (8-12). En primer lloc, l'estudi dels constituents monomèrics dels àcids nucleics (bases nitrogenades, nucleòsids i nucleòtids) ha de permetre avaluar quins són els centres actius de coordinació en els lligands. A continuació, l'estudi d'alguns polinucleòtids sintètics, que contenen un tipus únic de base nitrogenada repetida al llarg de la macromolècula, és útil per avaluar la influència que tenen els efectes polielectrolític i conformacional sobre les característiques àcid-base i complexants d'aquests centres de coordinació.

A la figura 1 es representa l'estructura d'un nucleòsid, un nucleòtid, un nucleòtid cíclic (que és el compost monomèric més similar als polinucleòtids, en referència als centres actius de coordinació) i una cadena de polinucleòtid.

Els procediments de càlcul utilitzats en el tractament numèric de les dades experimentals que s'obtenen en l'estudi dels equilibris àcid-base i de complexació d'un sistema, per a l'estudi de l'especialització, es poden classificar en dos grups.

1. Procediments tradicionals d'ajust mínim quadràtic, que es basen en la postulació inicial d'un model químic, és a dir, en la postulació d'una sèrie d'espècies definides pels seus coeficients estequiomètrics i per unes constants de formació estimades. Aquests procediments de càlcul també requereixen el compliment dels balanços de matèria i de la llei d'acció de masses. Permeten arribar a

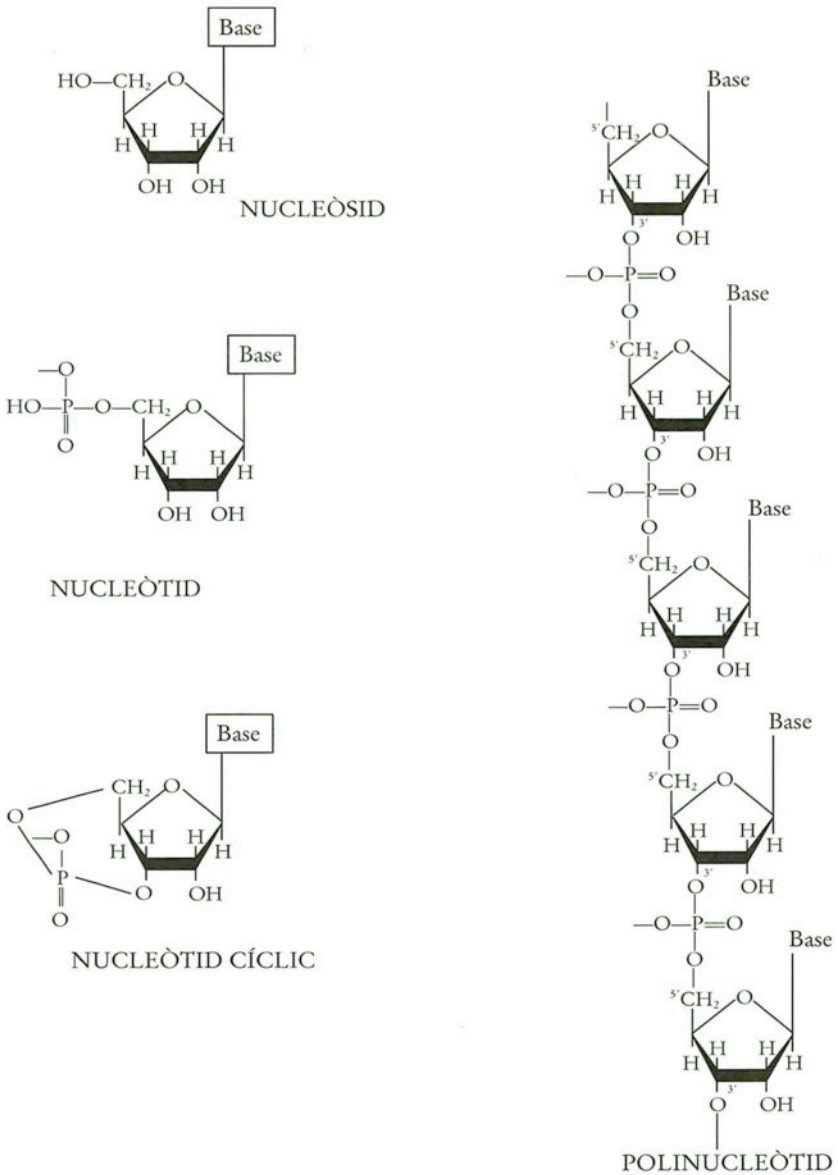


FIGURA 1. Estructura química d'un polinucleòtid i de les unitats monomèriques següents: nucleòsid, nucleòtid i nucleòtid cíclic.

obtenir els valors de les constants d'estabilitat per a cadascuna de les espècies postulades.

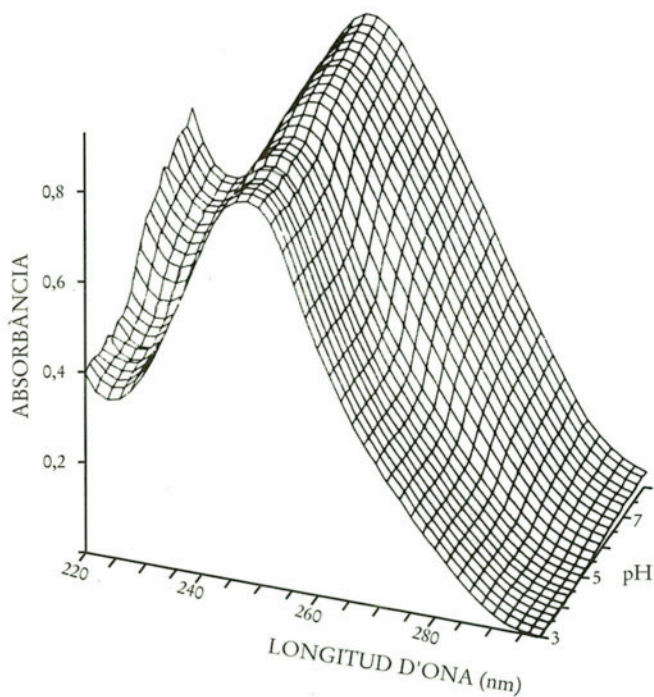
2. Procediments matemàtics basats en tècniques relacionades amb l'anàlisi de factors, que no requereixen la postulació inicial d'un model químic ni el compliment de la llei d'acció de masses. Aquests procediments permeten de determinar el nombre d'espècies presents, avaluar-ne el diagrama de distribució i els seus espectres individuals. A partir dels resultats obtinguts es pot postular un model i calcular les constants d'estabilitat de les espècies que es formen. Dins d'aquest grup es pot incloure el procediment SPFAC, desenvolupat per R. Tauler (13-15).

Aquests últims procediments són una eina molt poderosa en l'estudi dels sistemes que contenen lligands macromoleculars, on els procediments tradicionals d'ajust minimoquadràtic no poden aplicar-se en la majoria dels casos a causa de la possible presència en el lligand dels efectes polielectrolític, conformacional i polifuncional, que influeixen sobre les característiques dels centres de coordinació dels lligands, i modifiquen l'estabilitat de les espècies que es formen. Per tot això, l'anàlisi de les dades experimentals que s'obtenen en aquests sistemes exigeix la utilització de procediments de càlcul que no siguin basats en la postulació prèvia d'un model químic ni en el compliment de la llei d'acció de masses.

Les dades experimentals de les quals es parteix en el procediment SPFAC són els espectres d'absorció obtinguts al llarg de cadascuna de les valoracions espectromètriques del sistema en estudi. Aquestes dades es poden representar en forma matricial, tal com s'indica a la figura 2. Per a cada valoració espectromètrica s'obté una matriu D en la qual cada fila correspon a una solució (a una mesura diferent de pH al llarg de la valoració) i cada columna correspon a cadascuna de les longituds d'ona a les quals es porten a terme les mesures.

El procediment SPFAC permet l'anàlisi simultani de diferents valoracions espectromètriques del mateix sistema obtingudes a diferents concentracions inicials dels constituents. En aquest cas, la matriu de dades D que s'analiza és una matriu D augmentada que conté un nombre de files igual al nombre total d'espectres obtinguts en les diferents valoracions (figura 3). El nombre de columnes és el mateix, perquè tots els espectres en totes les valoracions s'han d'obtenir a les mateixes longituds d'ona.

Per a aconseguir més informació d'un mateix sistema, al llarg d'una mateixa valoració poden aplicar-se simultàniament diferents



$$D = \begin{pmatrix} d_{1,1} & d_{1,2} & \dots & d_{1,NW} \\ d_{2,1} & d_{2,2} & \dots & d_{2,NW} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ d_{NS,1} & d_{NS,2} & \dots & d_{NS,NW} \end{pmatrix}$$

FIGURA 2. Representació tridimensional dels espectres d'absorció experimentals obtinguts al llarg d'una valoració d'un sistema en estudi, i representació matricial d'aquestes dades. *NS* és el nombre d'espectres obtinguts (a cada valor de pH mesurat). *NW* és el nombre de canals de mesura (nombre de longituds d'ona, en l'exemple).

tècniques espectromètriques (UV-visible, ressonància d'espín electrònic o diroisme circular, entre d'altres). En el cas d'utilitzar les tres tècniques esmentades, per a cada solució es tindrà un espectre d'absorció en el UV, un espectre de RSE i un espectre de diroisme circular. Per a poder extreure la màxima informació de les dades

$$D = \begin{pmatrix} d_{1,1} & d_{1,2} & \dots & d_{1,NW} \\ d_{2,1} & d_{2,2} & \dots & d_{2,NW} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ d_{NS,1} & d_{NS,2} & \dots & d_{NS,NW} \\ I_{1,1} & I_{1,2} & \dots & I_{1,NW} \\ I_{2,1} & I_{2,2} & \dots & I_{2,NW} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ I_{RS,1} & I_{RS,2} & \dots & I_{RS,NW} \\ k_{1,1} & k_{1,2} & \dots & k_{1,NW} \\ k_{2,1} & k_{2,2} & \dots & k_{2,NW} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ k_{CS,1} & k_{CS,2} & \dots & k_{CS,NW} \end{pmatrix}$$

FIGURA 3. Representació matricial de les dades obtingudes al llarg de tres valoracions espectromètriques diferents del mateix sistema. *NS*, *RS* i *CS* són, respectivament, el nombre d'espectres obtinguts en la primera, en la segona i en la tercera valoració.

obtingudes amb les diferents tècniques espectromètriques, és convenient tractar-les simultàniament, i per tant, tota aquesta informació ha d'estar continguda en la mateixa matriu de dades. Això s'aconsegueix ampliant el nombre de columnes de la matriu de dades a tots els canals de mesura: per a cada solució es tindrà una fila que conté un espectre global que serà el d'absorció UV-visible, a continuació el de RSE i a continuació el de dicroisme circular (figura 4).

En la figura 5 s'indiquen les etapes que se segueixen en el procediment SPFAC: es parteix de la matriu que conté les dades experimentals (que pot ser la corresponent a una única valoració, o bé la matriu ampliada, en les files si s'analitza més d'una valoració o/i en

$$D = \begin{pmatrix} d_{1,1} & d_{1,2} & \dots & d_{1,NW} & t_{1,1} & t_{1,2} & \dots & t_{1,PW} & h_{1,1} & h_{1,2} & \dots & h_{1,UW} \\ d_{2,1} & d_{2,2} & \dots & d_{2,NW} & t_{2,1} & t_{2,2} & \dots & t_{2,PW} & h_{2,1} & h_{2,2} & \dots & h_{2,UW} \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot & \cdot & \cdot & \dots & \cdot \\ d_{NS,1} & d_{NS,2} & \dots & d_{NS,NW} & t_{NS,1} & t_{NS,2} & \dots & t_{NS,PW} & h_{NS,1} & h_{NS,2} & \dots & h_{NS,UW} \end{pmatrix}$$

FIGURA 4. Representació matricial de les dades obtingudes al llarg d'una valoració en la qual s'han aplicat simultàniament tres tècniques espectromètriques diferents. *NW*, *PW* i *UW* són, respectivament, el nombre de canals de mesura en la primera, en la segona i en la tercera tècniques.

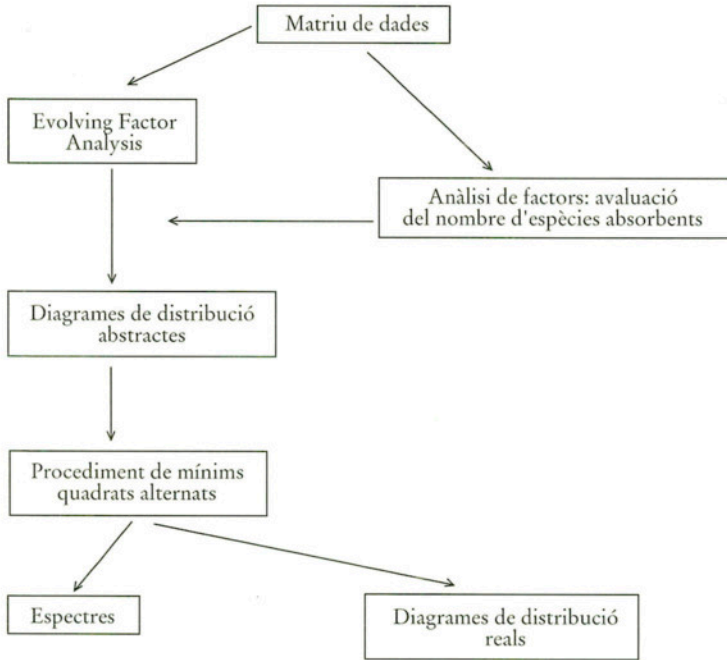


FIGURA 5. Representació esquemàtica de les etapes que se segueixen en el procediment SPFAC.

les columnes si cada valoració s'estudia per més d'una tècnica espectromètrica). En primer lloc s'aplica l'anàlisi de factors a la matriu de dades per a determinar el nombre d'espècies absorbents diferents que apareixen al llarg de la valoració. Aquest nombre d'espècies es pot estimar a partir de la magnitud del valor propi associat a cada vector propi calculat en l'anàlisi de factors. Existeixen procediments matemàtics diferents que ajuden a discriminar entre els vectors propis associats amb les espècies presents en el sistema en estudi i els vectors propis associats a l'error aleatori propi de les dades experimentals: procediment de *cross validation*, desenvolupat per Wold (16), i *teoria de l'error en anàlisi de factors*, desenvolupada per Malinowski (17), entre d'altres. La matriu experimental de dades també s'analitza per mitjà de l'*evolving factor analysis* (EFA), descrit per Gampp i col·laboradors (18, 19). El procediment d'EFA és el següent: primer s'analitza la submatriu, que conté només dues files

(és a dir, les solucions corresponents als dos primers punts de la valoració), i es determina per anàlisi de factors quants components hi ha i la magnitud del valor propi associat a cada component; a continuació s'afegeix una fila més a la submatriu anterior (la solució corresponent al següent valor de pH en la valoració) i es torna a determinar quants components hi ha i la magnitud dels seus valors propis, i així successivament per a submatrius cadascuna de les quals conté una solució més que l'anterior. El mateix procediment s'ha de fer seguint un ordre decreixent de valors de pH. La representació de la variació amb el pH de la magnitud del valor propi associat a cada component permet arribar a obtenir una representació abstracta dels perfils de concentració. Aquesta representació serveix com a estimació inicial dels perfils de concentració, i a partir d'aquí s'inicia un procediment de mínims quadrats alternats (ALS, *alternating least squares*) per a arribar a obtenir els espectres d'absorció corresponents a cadascuna de les espècies i el diagrama de distribució real de les espècies.

Aquest nou procediment matemàtic, el procediment SPFAC, s'ha aplicat a l'estudi de les propietats àcid-base dels polinucleòtids poli(U) i poli(I), i a l'estudi de la seva complexació amb els ions coure(II). Aquests polinucleòtids contenen un únic tipus de base nitrogenada repetida al llarg de la seva estructura: la base pirimidínica uracil en la molècula de poli(U) i la base purínica hipoxantina en la molècula de poli(I) (figura 6).

L'estudi espectrofotomètric dels sistemes H-poli(U) i H-poli(I) ha indicat en ambdós casos l'absència d'efecte polielectrolític (figura 7); es pot observar que el valor del pK_a en cadascun dels sistemes no varia al llarg de les valoracions, a mesura que augmenta el grau

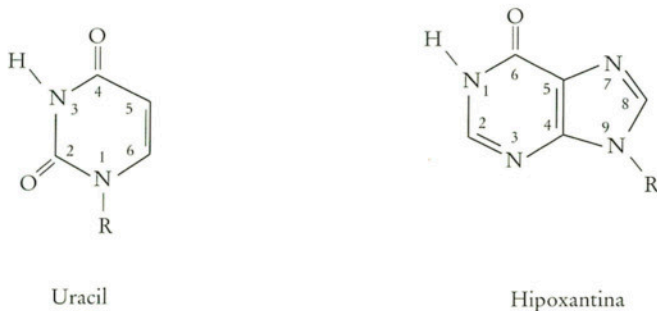


FIGURA 6. Estructura química de les bases nitrogenades uracil i hipoxantina.

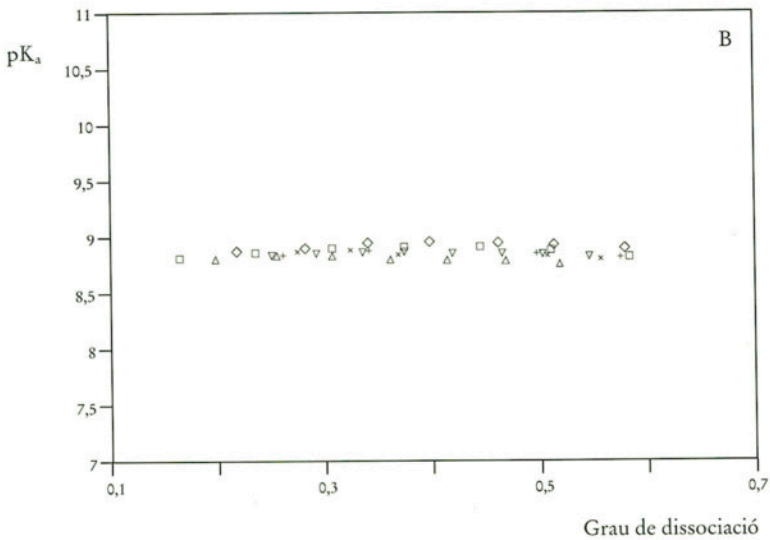
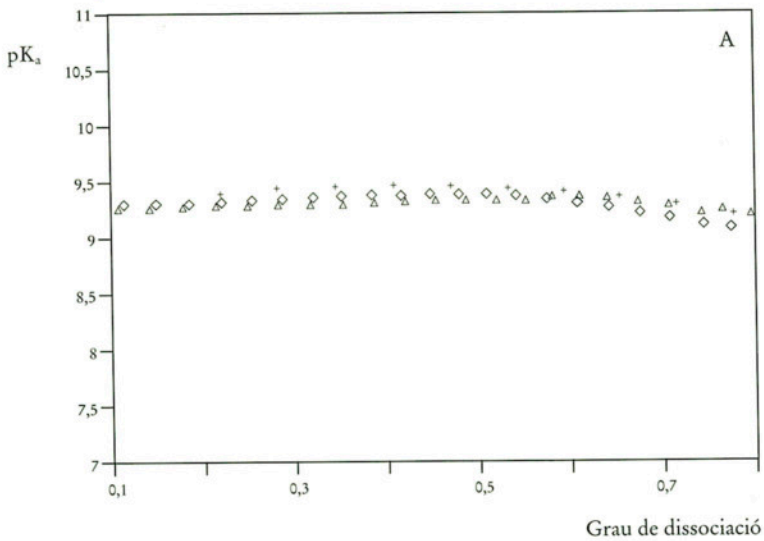


FIGURA 7. Representació dels valors de pK_a enfront del grau de dissociació pels lligands: A) poli(U); B) poli(I).

de dissociació de les macromolècules. Aquests resultats poden ésser atribuïts al fet que les bases nitrogenades en aquests polinucleòtids estan suficientment distants en l'espai perquè la desprotonació d'una d'elles no afecti les característiques àcid-base de les altres.

En el sistema Cu(II)-poli(U) només s'ha detectat la presència de dues espècies mitjançant el procediment SPFAC. A partir d'estudis de RSE s'ha pogut comprovar que la primera espècie correspon a l'ió coure(II) lliure en solució, i la segona espècie, a un complex dímer, que probablement conté dos ions coure(II) cadascun unit a una base nitrogenada del poli(U) i units entre si per ponts d'hidròxid (figura 8). Aquesta estructura condueix a canvis conformationals en el polinucleòtid, des d'una conformació de cabdell aleatori (*random coil*) fins a una conformació més endreçada.

L'estudi del sistema coure(II)-poli(I) ha mostrat que la presència dels ions coure(II) provoca un canvi conformational del polinucleòtid àdhuc a valors àcids de pH, als quals encara no hi ha complexació via la posició N(1) de la base nitrogenada. El polinucleòtid poli(I) presenta una conformació relativament ordenada, en forma d'hèlix, en la qual hi ha apilament de les bases nitrogenades. La presència dels ions coure(II) provoca en aquest sistema, a diferència del que passa en el sistema coure(II)-poli(U), un trencament d'aquest ordre, probablement pel fet que els ions coure(II) s'uneixen a la posició N(7) de les bases nitrogenades, i la repulsió entre ions coure(II) afavoreix el trencament de l'hèlix. Un augment del pH afavoreix la complexació dels ions coure(II) via la posició N(1) desprotonada, però ja no són observables altres canvis conformationals en el sistema.

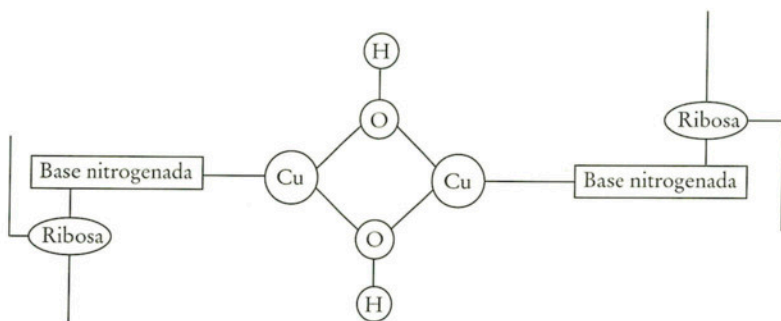


FIGURA 8. Possible estructura de l'espècie dímera que es forma en el sistema coure(II)-poli(U).

Tots aquests canvis conformacionals induïts pels ions coure(II) en els polinucleòtids són una prova més de com els ions metàl·lics poden afectar les característiques biològiques dels polinucleòtids naturals, i de la importància que aquests fets poden tenir des d'un punt de vista terapèutic.

BIBLIOGRAFIA

1. S. E. SHERMAN i S. L. LIPPARD (1987). *Chem. Rev.*, **87**, 1137.
2. K. BURGER (1990). *Biocoordination chemistry: coordination equilibria in biologically active systems*. Chichester: Ellis Horwood Ltd.
3. B. ROSENBERG, L. VANCAMP, J. E. TROSKO i V. H. MANSOUR (1969). *Nature* (Londres), **222**, 385.
4. A. M. FICHTINGER-SCHEPMAN, J. L. VAN DER VEER, J. H. DEN HARTONG, P. H. LOHMAN i J. REEDJIK (1985). *Biochemistry*, **24**, 707.
5. M. FILELLA (1989). *Bull. Soc. Cat. Cièn.* (2a època), **10**, 93.
6. P. M. MAY, P. W. LINDER i D. R. WILLIAMS (1977). *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 588.
7. J. BUFFLE (1988). *Complexation in aquatic systems: an analytical approach*. Chichester: Ellis Horwood Ltd.
8. E. CASASSAS, R. GARGALLO, I. GIMÉNEZ, A. IZQUIERDO-RIDORSA i R. TAULER (1994). *J. Inorg. Biochem.*, **56**, 187.
9. R. TAULER, J. F. CID i E. CASASSAS (1990). *J. Inorg. Biochem.*, **38**, 277.
10. E. CASASSAS, A. IZQUIERDO-RIDORSA i R. TAULER (1990). *J. Inorg. Biochem.*, **39**, 327.
11. E. CASASSAS, R. GARGALLO, I. GIMÉNEZ, A. IZQUIERDO-RIDORSA i R. TAULER (1993). *Anal. Chim. Acta*, **283**, 538.
12. R. TAULER, A. IZQUIERDO-RIDORSA, R. GARGALLO i E. CASASSAS (1995). *Chemom. Intell. Lab. Systems*, **27**, 163.
13. R. TAULER i E. CASASSAS (1989). *Anal. Chim. Acta*, **223**, 257.
14. R. TAULER, E. CASASSAS i A. IZQUIERDO-RIDORSA (1991). *Anal. Chim. Acta*, **248**, 447.
15. R. TAULER, A. IZQUIERDO-RIDORSA i E. CASASSAS (1993). *Chemom. and Intell. Lab. Systems*, **18**, 293.
16. S. WOLD (1978). *Technometrics*, **20**, 397.

17. E. R. MALINOWSKI i D. E. HOWERY (1991). *Factor analysis in chemistry*. 2a ed. Nova York: Wiley.
18. H. GAMPP, M. MAEDER, C. J. MEYER i A. D. ZUBERBÜHLER (1985). *Talanta*, **32**, 1133.
19. H. GAMPP, M. MAEDER, C. J. MEYER i A. D. ZUBERBÜHLER (1986). *Talanta*, **33**, 943.