

**Comportament de la
metal lotioneïna de ratolí
i dels seus fragments i en
presència dels
metalls pesants tòxics Hg(II) i Pb(II)**

Àngels Leiva Presa



2001

Universitat Autònoma de Barcelona

VOLUM I

**Comportament de la
metal lotioneïna de ratolí
i dels seus fragments i en
presència dels
metalls pesants tòxics Hg(II) i Pb(II)**

VOLUM I

Àngels Leiva Presa

Desembre 2001



Universitat Autònoma de Barcelona

**Comportament de la metal lotioneïna de
ratolí
i dels seus fragments i en presència
dels
metalls pesants tòxics Hg(II) i Pb(II)**

Memòria presentada per **Àngels Leiva Presa** per a
aspirar al grau de **Doctora en Ciències (Química)**

Tesi Doctoral realitzada sota la direcció de la Dra. Pilar
González Duarte i la Dra. Mercè Capdevila Vidal, del
Departament de Química de la
Universitat Autònoma de Barcelona

Dra. Pilar González Duarte

Dra. Mercè Capdevila
Vidal

Bellaterra, 13 de desembre de 2001

Agraïments

Un treball com és una Tesi Doctoral no es realitza només amb la voluntat personal de fer-lo, ni amb el vist-i-plau o acceptació necessari per dur-lo a terme, ni tan sols amb els coneixements científics específics que s'aprenen, "s'hereden" i "s'incuben" en treballar en un projecte durant un cert temps, ni amb el suport científic dels que "en saben més de...", ni "dels que proporcionen allò que cal per poder fer...", "ni dels que ..."; tot i tots ells innegablement imprescindibles i determinants. Cal, a més a més, un suport addicional que sovint aconseguim mitjançant altres persones, més o menys conegudes, d'una manera més o menys directa. I em refereixo a un suport general, en tots els aspectes que ens permeten ser i existir com a individus. Aquesta Tesi no és només un treball científic sinó que també forma part d'un temps de canvis i aprenentatge personals, de descobriment conscient i intuïtiu d'allò que és de veritat.

Vull expressar el meu agraïment a tots aquells que d'una manera o altra han participat a fer possible que, de fet, aquestes mateixes línies puguin ser escrites aquí i ara.

A la Dra. Pilar González-Duarte per la seva direcció científica, per reorientar tantes vegades l'objectiu del treball, pel seu aport constant, pel seu punt de vista general, per no deixar-se perdre en els detalls. Pel seu recolzament, tant en l'àmbit científic com en el personal, per la seva eficàcia, pel seu pragmatisme, per acceptar-me tal com sóc.

A la Dra. Mercè Capdevila Vidal per la seva disposició i ajut en tot, pels seus consells i la seva proximitat, pel seu recolzament constant, dia a dia, per la seva confiança en mi, pel seu esforç a entendre'm i interpretar les meves explicacions. Qui més a prop ha estat del treball i més confiança ha tingut en les idees i propostes suggerides.

A tots els companys de laboratori per tot el que inevitablement i/o de forma voluntària es comparteix; pel suport logístic i moral, pel seu interès, per les seves opinions i les discussions científiques.

A les directores i a tots els membres de l'equip de Genètica de la UB, responsables de la síntesi de les proteïnes estudiades, per la seva cura i preocupació perquè tot surti el millor possible, per la seva col·laboració i disponibilitat, pel seu diferent i valuós punt de vista científic.

Al personal dels equips dels Serveis Científico-Tècnics de la UB responsables d'Espectroscòpia òptica, d'Espectrometria de masses de plasma acoblat per inducció i d'Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció, i finalment, al d'Espectrometria de masses, i de forma especial al Dr. Isidre Casals per la seva opinió científica, pel seu interès, per la seva extremada disposició, adaptació i solució als diferents problemes.

Als membres del Servei d'Anàlisi Química de la UAB, en especial al Dr. Josep M^a Paulís, per la seva disposició a solventar els diferents problemes tècnics sorgits i pel seu assessorament en algunes qüestions científiques plantejades.

A tots els membres de la Unitat de Química Inorgànica, en especial a tot el "col·lectiu de tercer cicle", i en particular al Dr. Joan Sola pels seus comentaris i opinions científics desinteressats i a la Dra. Josefina Pons Picart per donar-me l'oportunitat d'iniciar-me, fa tants anys, en el món de la investigació científica.

A aquells, pocs i concrets, que m'han ofert allò que tenien en moments complicats.

A aquells que hi eren quan els he buscat i als que potser ni tan sols ho recorden.

A aquells que són de veritat.

Als meus pares i germans (als que dedico especialment aquest treball) perquè sempre els sento a prop, per estimar-me tant.

Abreujaments

aa	Aminoàcids
Cys	Cisteïna
CZE	Electroforesi capil lar de zona
DC	Dicroisme Circular
DTNB	Àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
ED	Espectre de diferència dels espectres d'absorció UV-Visible
eq	Equivalent molar
ESI-MS	Espectrometria de masses amb ionització per electrospai
GSH	Glutatió
His	Histidina
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
ICP-AES	Espectroscòpia d'emissió atòmica de plasma acoblat per inducció
ICP-MS	Espectrometria de masses de plasma acoblat per inducció
	Longitud d'ona
MT	Metal lotioneïna
PC	Fitoquelatina
S _{Cys}	Sofre cisteínic
TCLM	Transferència de càrrega del lligand cap al metall
TNB ²⁻	Dianió 5-tio-2-nitrobenzoat
Tris	Tris(hidroximetil)aminometà
UV	Espectre d'absorció UV-Visible

*BLOC I. Introducció, Objectius,
Disseny experimental i Metodologia d'anàlisi*

1. Introducció i objectius

Actualment, un dels problemes mediambientals més greus és el de la contaminació per metalls pesants. Metalls com Cd, Hg i Pb són tòxics pels éssers vius a qualsevol concentració, mentre que d'altres, fins i tot els essencials, ho són a concentracions elevades.

Els efectes tòxics del mercuri ¹ són coneguts des de fa molt de temps i el HgCl₂, per exemple, ja havia estat emprat com a verí a l'edat mitjana. Els vapors de mercuri metàl·lic són tòxics ja que es difonen fàcilment a través dels pulmons cap a la sang i des de la sang fins al cervell causant en aquest seriosos danys neurològics. Tot i així, els compostos organomercurials, dels quals l'ió metilmercuri, MeHg⁺, és probablement el més abundant, són encara més tòxics que el mercuri metàl·lic o que els compostos inorgànics de Hg(II).² Els organomercurials són absorbits més ràpidament que les sals de Hg(II) per l'intestí a causa del seu caràcter ambivalent lipofílic/hidrofílic; per aquest motiu poden travessar fàcilment les membranes cel·lulars.³ Es concentren a la sang i arriben al cervell i al sistema nerviós central on causen efectes immediats i permanents irreparables. També és conegut que els compostos organomercurials s'enllacen fortament als grups -SH de les proteïnes.^{4,5} D'altra banda, el plom, tot i ser un dels metalls tòxics que més freqüentment causa focus de contaminació a la natura, sobretot atmosfèrica, és un metall menys tòxic que el mercuri. El motiu principal d'aquesta menor toxicitat del plom

1. C.A. McAuliffe (Ed.) *The Chemistry of Mercury*, Macmillan, London, 1977.

2. S. Krishnamurthy, *J. Chem. Ed.*, (1992) 69, 347.

3. E.J. Baran, *Química Bioinorgànica*, Ed. McGraw-Hill, Madrid, 1995.

4. N.N. Greenwood, A. Earnshaw, *Chemistry of the elements*, Butterworth-Heinemann, 1997.

5. F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Química Inorgànica Avanzada*, Ed. Limusa, 1998.

respecte al mercuri és atribuïble a què la seva absorció pels teixits és molt inferior a causa de la fàcil formació de compostos insolubles, tals com fosfats i carbonats. El Pb(II) actua com a inhibidor d'enzims, encara que menys fortament que el Hg(II), principalment dels que contenen grups -SH, interacciona amb proteïnes que contenen residus de Cys, impedeix la formació d'hemoglobina i també està relacionat amb danys al sistema nerviós central.^{4,6,7}

Afortunadament, els organismes vius han desenvolupat mecanismes que els permeten sobreviure en medis contaminats amb metalls pesants limitant les concentracions intracel·lulars d'aquests ions metàl·lics. Els procariotes resisteixen la presència de metalls mitjançant quatre mecanismes bàsics: modulació del seu transport, eflux actiu, reaccions redox i segrest per formació de compostos innocus.⁸ Els organismes eucariotes poden utilitzar també aquests mecanismes però la seva resistència als ions metàl·lics tòxics s'atribueix generalment al seu segrest mitjançant la formació de complexos i/o a través de la seva captació en orgànuls intracel·lulars. D'acord amb aquests mecanismes, avui en dia és àmpliament acceptat que la formació de complexos d'ions metàl·lics tòxics en eucariotes té lloc mitjançant tres biomolècules principals que es caracteritzen pel seu elevat contingut en residus de Cys: glutatió (GSH), fitoquelatines (PC) i metal·lotioneïnes (MT).^{9,10,11,12,13} Alguns estudis sobre la transferència d'ions metàl·lics pesants entre aquestes proteïnes

6. J.J. Chisholm, Lead poisoning, *Scientific American*, (1971) 224, 15.

7. R.M. Harrison, D.P.H. Laxen, *Lead pollution*, Chapman and Hall, London, 1981.

8. S. Silver, *Plasmid*, (1992) 27, 1.

9. R.K. Singhal, M.E. Anderson, A. Meister, *J. FASEB*, (1987) 1, 220.

10. W.E. Rauser, *Annu. Rev. Biochem.*, (1990) 59, 61.

11. R.K. Mehra, D.R. Winge, *J. Cell. Biochem.*, (1991) 45, 30.

12. R.K. Mehra, J. Miclat, V.R. Kodati, R. Abdullah, T.C. Hunter, P. Mulchandani, *Biochem. J.*, (1996) 314, 73.

13. M.J. Stillman, C.F. Shaw, K.T. Suzuki, *Metallothioneins*, VCH, New York, 1992.

evidencien que els ions metàl·lics potencialment tòxics són coordinats primerament pel glutatió i transferits posteriorment a les PC i/o a les MT.¹⁴ També s'ha determinat que, en tot tipus d'organismes, la presència de metalls tòxics en les cèl·lules indueix la síntesi de diverses proteïnes, les esmentades anteriorment i d'altres de més específiques de cada organisme, que actuen com a agents de detoxificació.

Donat que les MT poden desenvolupar un paper important en el segrest d'ions metàl·lics tòxics, els quals, tant *in vivo* com *in vitro*, n'indueixen la seva síntesi en diferents òrgans, en els darrers anys ha augmentat considerablement l'interès per aquestes metal·loproteïnes de composició i trets estructurals molt característics.

Des del descobriment d'aquesta família de metal·loproteïnes el 1957,¹⁵ el progrés realitzat en el seu coneixement ha estat notable i en la darrera dècada els avanços en les tècniques d'Enginyeria Genètica han permès la seva bioproducció mitjançant microorganismes modificats genèticament. Aquesta metodologia ha permès superar els problemes de baix rendiment i puresa qüestionable que suposa l'aïllament d'aquestes proteïnes a partir d'organismes vius o la seva síntesi química alhora que ha facilitat l'obtenció, i, per tant, l'estudi, dels seus dos fragments constitutius i de les seves formes mutades. Estudis preliminars del grup de recerca en el que s'emmarca aquesta Tesi Doctoral han permès comprovar que les MT obtingudes per la tècnica de l'ADN recombinant conserven la funcionalitat de les MT procedents d'organismes vius.¹⁶

14. R.K. Mehra, R. Kodati, R. Abdullah, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, (1995) 215, 2, 730.

15. M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, (1957) 79, 4813.

16. N. Cols, N. Romero, M. Capdevila, B. Oliva, S. Atrian, R. González-Duarte, P. González-Duarte, *J. Inorg. Biochem.*, (1997), 68, 157.

Si bé, tal com s'ha esmentat, s'ha avançat molt en el coneixement de les MT, actualment, 44 anys després del seu descobriment, encara no es coneixen del cert les seves funcions fisiològiques. El grup de recerca encapçalat per les Dres. Pilar González Duarte i Sílvia Atrian està dirigint els seus esforços cap a l'estudi de la funcionalitat d'aquestes metal·loproteïnes en base a la capacitat de MT de diferents organismes vius per enllaçar-se a diversos ions metàl·lics. El treball que es presenta a continuació pretén aprofundir en el coneixement del comportament de la MT recombinant de mamífer enfront d'ions metàl·lics tòxics, Hg(II), MeHg⁺ i Pb(II), amb la finalitat d'establir les bases que determinen la possible activitat detoxificadora de les MT en organismes vius.

1.1. Tiolats metàl·lics

1.1.1. Tiolats de Hg(II)

La tendència del Hg(II) a coordinar-se als grups tiolat és coneguda des de fa temps. Aquesta elevada afinitat fa que el Hg(II) s'enllaci fàcilment a centres actius de metal·loproteïnes que contenen residus de cisteïna (MT i proteïnes reguladores de mercuri).^{17,18,19,20} Així, per a proposar i entendre millor la geometria de coordinació que adopta aquest centre metàl·lic en determinats sistemes biològics és molt útil partir de l'estudi de complexos model Hg(II)-tiolat.

Però la química de coordinació dels tiolats de Hg(II) és complexa. En primer lloc, cal destacar que la geometria de coordinació dels complexos homolèptics de Hg(II) amb lligands tiolat pot ser digonal, trigonal o tetraèdrica, a diferència de la geometria "preferida" pels altres metalls del grup 12, Zn(II) i Cd(II), generalment tetraèdrica, si bé a la bibliografia no s'ha trobat una sistemàtica que permeti establir quins factors fan que el Hg(II) adopti una o altra geometria. És difícil fer una predicció de la geometria de coordinació del Hg(II) en els complexos Hg(II)-tiolat. Les més habituals són digonal, tetraèdrica i, en menor proporció, trigonal.²¹ En sistemes biològics, tot i que es proposen les tres geometries, les més comunes són la digonal i la trigonal. Com a segona causa de complexitat cal assenyalar la presència d'interaccions secundàries Hg-L.²² Estudis

17. E.S. Gruff, S.A. Koch, *J. Am. Chem. Soc.*, (1990) 112, 1245.

18. J.G. Wright, H.T. Tsang, J.E. Penner-hahn, T.V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.*, (1990) 112, 2434.

19. S.P. Watton, J.G. Wright, F.M. Macdonell, J.W. Bryson, M. Sabat, T.V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.*, (1990) 112, 2824.

20. J.G. Wright, M.J. Natan, F.M. Macdonell, D.M. Ralston, T.V. O'Halloran, *Prog. Inorg. Chem.*, (1990) 38, 323.

21. I.G. Dance, *Polyhedron*, (1986) 5, 1037.

22. D. Grdenic, *Q. Rev.*, (1965) 19, 303.

estructurals en estat sòlid han permès observar que alguns lligands addicionals es troben a distàncies més llargues que les que s'esperen per a enllaços covalents amb l'ió Hg(II), però més curtes que la suma dels seus radis de Van der Waals. Freqüentment, aquestes interaccions a llarga distància no compleixen requeriments geomètrics simples i, en conseqüència, es descriuen com a enllaços secundaris. En darrer lloc, és necessari tenir en compte l'absència de correlació entre la fórmula empírica i la geometria de coordinació del metall en molts complexos Hg(II)-tiolat. Així, diversos estudis han posat de manifest que diferents compostos amb la mateixa relació estequiomètrica Hg(II)-tiolat presenten diferents geometries de coordinació i no s'ha pogut establir una causa comuna que decanti cap a una o altra geometria pel Hg(II).^{21,23,24,25,26,27,28,29}

Tot i la dificultat generada per aquest gran nombre de variables no sistematitzables, la correlació entre les característiques espectroscòpiques i els nombres de coordinació del Hg(II) de complexos model ben caracteritzats estructuralment pot ajudar a esbrinar els entorns de coordinació d'aquest ió metàl·lic en els centres actius de proteïnes.

Per aquest motiu cal remarcar que molt sovint el Hg(II) ha estat considerat erròniament un ió "espectroscòpicament silenciós" a causa de la seva configuració d¹⁰.²⁰ El Hg(II) és espectroscòpicament diferent de la resta d'elements del grup 12 a causa de que efectes relativistes tendeixen a

23. P.J. Blower, J.R. Dilworth, *Coord. Chem. Rev.*, (1987) 76, 121.

24. D.C. Bradley, N.R. Kunchur, *J. Chem. Phys.*, (1964) 40, 2258.

25. D.C. Bradley, N.R. Kunchur, *Can. J. Chem.*, (1965) 43, 2786.

26. D.C. Kunchur, *Nature*, (1964) 204, 468.

27. H. Barrera, J.C. Bayón, P. González-Duarte, J. Sola, J.M. Viñas, J.L. Briansó, M.C. Briansó, X. Solans, *Polyhedron*, (1982) 1, 647.

28. J.C. Bayón, J.L. Briansó, M.C. Briansó, P. González-Duarte, *Inorg. Chem.*, (1979) 18, 3478.

29. I. Casals, P. González-Duarte, W. Clegg, *Inorg. Chim. Acta*, (1991) 167, 184.

disminuir l'energia dels seus orbitals 6s, i en menor extensió la dels orbitals 6p. Com a resultat, s'obté un acoblament nuclear més efectiu que, de fet, incrementa les energies dels orbitals 5d i 4f. Així, el descens energètic dels orbitals 6s, juntament amb l'increment d'energia dels orbitals 5d, explica que els valors energètics de les transicions $5d^{10}-5d^96s^1$ del Hg(II) siguin baixos comparats amb els de Zn(II) i Cd(II).³⁰ Així doncs, les dades espectroscòpiques dels complexos de Hg(II) poden ser emprades per a caracteritzar els diferents entorns de coordinació del Hg(II).

Les tècniques espectroscòpiques més emprades habitualment per a l'estudi de tiolats de Hg(II) i de les que es disposa de més informació són les espectroscòpies vibracional (IR i Raman), electrònica (d'absorció UV-Visible) i de RMN (sobretot RMN de ^{199}Hg). Cal tenir en compte que alguns paràmetres espectroscòpics, com són l'energia de les transferències de càrrega del lligand cap al metall S Hg(II) i el desplaçament químic de ^{199}Hg , varien sistemàticament en funció del nombre de coordinació del centre metàl·lic.

Pel que fa a l'espectroscòpia vibracional cal considerar que la Teoria de Grups permet predir, per a una simetria local determinada al voltant del Hg(II), el nombre de modes de vibració normals actius a l'IR o al Raman.³¹ A més, hi ha una certa relació entre el nombre de coordinació i l'energia dels modes vibracionals. Així, a partir dels espectres IR i Raman de complexos de fórmula $\text{Hg}(\text{SR})_n$ s'hauria de poder deduir el nombre i la geometria de coordinació al voltant del Hg(II). A la pràctica, hi ha dos factors que compliquen l'anàlisi dels espectres vibracionals. Primerament,

30. P. Pyykö, J.P. Desclaux, *Acc. Chem. Res.*, (1979) 12, 276.

31. F.A. Cotton, *Chemical Applications of Group Theory*, Wiley, New York, 1973.

de vegades és força difícil fer l'assignació de les bandes de baixa energia a vibracions Hg-S específiques a causa de les vibracions dels propis lligands en la mateixa regió espectral. Afortunadament, hi ha força dades bibliogràfiques referents a la vibració de l'enllaç Hg-Cl³² que permeten fer les assignacions dels modes Hg-S gràcies a què els modes vibracionals de complexos HgCl_n i Hg(SR)_n isoestructurals són també isoenergètics, ja que els pesos atòmics del Cl i del S són molt propers. Així, en alguns casos, els modes vibracionals Hg-S han estat determinats en base a models Hg-Cl prèviament assignats.³³ Alternativament, també es poden preparar compostos anàlegs de Cd(II) o Zn(II) per tal d'assignar les bandes pròpies del lligand i esbrinar la influència dels metalls, ja que les vibracions de tensió M-S, on M=Zn, Cd o Hg, apareixen en regions d'energia diferents (Zn>Cd>Hg). A més, a l'hora d'extreure informació dels espectres vibracionals, també cal tenir en compte que no hi ha una correlació senzilla entre l'estequiometria Hg(II)-tiolat i el nombre de coordinació del Hg(II).

Els tiolats de Hg(II) més estudiats són els d'estequiometria Hg(SR)₂. Les dades vibracionals d'aquests compostos són consistents amb una coordinació lineal en la majoria dels complexos. Quan existeixen interaccions secundàries importants o quan la geometria de coordinació és tetraèdrica, sovint no es pot establir una correcta assignació dels modes vibracionals Hg-S, tot i que les dades d'IR i Raman reflecteixen desviacions de la coordinació digonal senzilla. A causa de què en la química dels tiolats de Hg(II) és molt freqüent que aquests lligands actuïn com a pont entre dos centres i també que hi hagi interaccions secundàries

32. G.A. Bowmaker, *Spectroscopy of Inorganic-Based Materials*, R.J.H. Clark and R.E. Hester (Eds.), Wiley, New York, 1987.

33. G.A. Bowmaker, I.G. Dance, B.C. Dobson, D.A. Rogers, *Aust. J. Chem.*, (1984) 37,1607.

metall-ligand, els estudis en fase gasosa serien especialment útils per tal d'obtenir informació sobre espècies aïllades, la qual cosa permetria establir definitivament els perfils vibracionals dels complexos de Hg(II) amb coordinació digonal. L'estudi comparatiu de les dades d'espectroscòpia vibracional de compostos $\text{Hg}(\text{SR})_2$ en fase vapor i en dissolució donaria informació de l'efecte de les interaccions secundàries que donarien lloc a coordinacions tetraèdriques i trigonals.

La Taula 1.1. dona una relació de les dades d'IR i Raman per a compostos d'estequiometria $\text{Hg}(\text{SR})_2$, $[\text{Hg}(\text{SR})_3]$ i $[\text{Hg}(\text{SR})_4]^{2-}$ en estat sòlid i en solució. Aquestes dades il·lustren una clara delineació entre una estereoquímica digonal i trigonal o tetraèdrica al voltant del Hg(II). Els complexos lineals només presenten vibracions de tensió a longituds d'ona superiors a 260 cm^{-1} . En canvi, les bandes que es troben en els espectres vibracionals de complexos tri- i tetracoordinats apareixen dins del mateix rang energètic i són, per tant, indistingibles. Es coneixen molts compostos heterolèptics de Hg(II) on els centres metàl·lics adopten generalment una geometria pseudotetraèdrica.³⁴ Ara bé, en base a les energies vibracionals, sovint és difícil distingir entre espècies d'estequiometria $[\text{Hg}(\text{SR})_4]^{2-}$ i d'altres de fórmula $\text{Hg}(\text{SR})_3\text{L}$ o $\text{Hg}(\text{SR})_2\text{L}_2$ on L és un lligand diferent del tiol.

34. P.A.W. Dean, *Prog. Inorg. Chem.*, (1978) 24, 109.

Espectroscòpia vibracional de complexos $\text{Hg}(\text{SR})_n$

Compost	Sòlid			Solució		
	Coordinació Hg(II)	IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})	Dissolvent	IR	Raman
$\text{Hg}(\text{SMe})_2$ ^{35,36,37}	lineal	337 338	297 295,2 98	Piridina	335	
$\text{Hg}(\text{SEt})_2$ ^{35,37}	lineal	268 405 268	246 394 245	Piridina CCl ₄	330 330	304
$\text{Hg}(\text{S-n-Pr})_2$ ³⁷	---	256		Piridina	359	329
$\text{Hg}(\text{S-n-Bu})_2$ ³⁷	tetraèdrica	252	218	Piridina	361	325
$\text{Hg}(\text{S-t-Bu})_2$ ^{35,37}	tetraèdrica	337 172	185 188	Piridina CCl ₄	246 274	223
$\text{Hg}(\text{BALH})$ ³³	---	~348	~298			
$\text{Hg}(\text{SPh})_2$ ^{38,39}		365	344			
$[\text{Hg}(\text{4-MP})_2](\text{ClO}_4)_2$ ²⁷	lineal	395	372			
$[\text{Hg}(\text{2-MEP})_2](\text{ClO}_4)_2$ ²⁷	---	350	302			
$\text{Hg}(\text{SCH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_3)_2)$ ^{40,41}	---	311	305			
$\text{Hg}(\text{S}_{\text{Cys}})_2$ ⁴²	---		327			
$[\text{Et}_4\text{N}]_2[\text{Hg}_2(\text{SMe})_6]$ ³³	tetraèdrica	260- 280	259	EtOH		282
$[\text{Et}_4\text{N}][\text{Hg}(\text{S-t-Bu})_3]$ ³³	trigonal	206	208	EtOH		206

35. A.J. Canty, R. Kishimoto, G.B. Deacon, G.J. Farquharson, *Inorg. Chim. Acta*, (1976) 20,161.
 36. N. Iwasaki, J. Tomooka, K. Toyoda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1974) 47, 1323.
 37. P. Biscarini, L. Fusina, G. Nivellini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1974), 2140.
 38. A.J. Canty, R. Kishimoto, (1975) 253, 123.
 39. A.J. Canty, R. Kishimoto, *Inorg. Chim. Acta*, (1977) 24, 109.
 40. C. Perchard, G. Zuppioli, F. Gouzerh, Y. Jeannin, F. Robert, *J. Mol. Struct.*, (1981) 72, 119.
 41. G. Zuppioli, C. Perchard, M.H. Baron, C. deLoze, *J. Mol. Struct.*, (1981) 72, 131.
 42. N. Ueyama, M. Nakata, A. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, (1985) 58, 464.

$[N(PPh_{3/2})]_2[Hg(S-t-Bu)_3]$	---	212	211
$[PPh_4][Hg(SPh)_3]$ ⁴³	---	178	180
$[PPh_4]_2[Hg(SPh)_4]$ ⁴³	---	165	179

Taula 1.1. Dades vibracionals de complexos inorgànics $Hg(SR)_n$ en estat sòlid i en solució.²⁰

Abreujaments utilitzats a la Taula 1.1.: BALH=2,3-dimercaptopropanol, DMPH= 1,3-dimercapto-2-propanol, 4-MP=1-metil-4-mercaptopiperidina, 2-MEP=1-metil-2(2-mercaptoetil)piperidina.²⁰

De la mateixa manera que la tècnica anterior, l'espectroscòpia electrònica també proporciona informació relacionada amb la geometria de coordinació i la identitat dels lligands en complexos metàl·lics, i, per tant, permet una aproximació a l'elucidació de la coordinació del Hg(II) en metal·loproteïnes.

Actualment es disposa de dades dels espectres electrònics en solució d'alguns tiolats alifàtics de Hg(II) d'estructura coneguda. Cal remarcar, per un costat, que el coneixement de l'estructura en fase sòlida no pressuposa que aquesta es mantingui en solució, i, en conseqüència, que les bandes d'absorció que s'observen en solució no tenen perquè correspondre als entorns de coordinació que existeixen en el compost en estat sòlid. D'altra banda, les dades espectroscòpiques útils es restringeixen a les de tiolats alifàtics ja que l'aromaticitat dels lligands emmascara les bandes de transició de càrrega del lligand cap al metall, $S \rightarrow Hg(II)$.^{20,44,45} Aquestes bandes de TLM $S \rightarrow Hg(II)$ es resumeixen a la

43. J. Liesk, G. Klar, *Z. Inorg. Allg. Chem.*, (1977) 435, 103.

44. C.K. Jorgensen, *Prog. Inorg. Chem.*, (1970) 12, 101.

45. M. Vašák, J.H.R. Kägi, *Metal Ions in Biological Systems*, H. Sigel (Ed.), Marcel Dekker, New York 1983, 15, 213.

Taula 1.2. D'acord amb aquestes dades, tots els tiolats de Hg(II), independentment de que la seva geometria de coordinació sigui digonal, trigonal o tetraèdrica, presenten una absorció el màxim de la qual es troba aproximadament a 230 nm. Ara bé, els complexos amb coordinació trigonal i tetraèdrica presenten, a més a més, espatlles (sh) addicionals a longituds d'ona superiors. Anàlogament al que s'ha observat en l'espectroscòpia vibracional, les dades d'espectroscòpia electrònica no permeten distingir entre complexos $[\text{Hg}(\text{SR})_x]$ tri- o tetracoordinats, si bé poden diferenciar-se dels de coordinació digonal, els quals no presenten transicions electròniques a energies baixes.

Espectroscòpia d'absorció UV-Visible de complexos $\text{Hg}(\text{SR})_n$		
Complex	màx (nm)	(M^{-1} cm^{-1})
Geometria de coordinació tetraèdrica		
$[\text{Me}_4\text{N}]_2[\text{Hg}_2(\text{SEt})_6]^{46}$	232	22920
	260 (sh)	14810
	280 (sh)	8580
Geometria de coordinació plano-trigonal		
$[\text{Me}_4\text{N}][\text{Hg}(\text{S}^i\text{Pr})_3]^{46}$	232	25130
	260 (sh)	16276
	280 (sh)	8000

46. S.P. Watton, *Tesi Doctoral*, Northwestern University, Evanston, Illinois, 1993.

[Et ₄ N][Hg(S- ⁱ Bu) ₃] ¹⁹	232	24540
	260 (sh)	17450
	280 (sh)	7350
[Et ₄ N][Hg(SC ₆ H ₁₁) ₃] ⁴⁷	230	23200
	255 (sh)	14200
Geometria de coordinació		
digonal		
Hg(SEt) ₂ ⁴⁶	232	2968
Hg(S- ⁱ Pr) ₂ ⁴⁶	232	3277

Taula 1.2. Dades d'espectroscòpia electrònica en solució de complexos model Hg(SR)_n.⁴⁸

Quant a l'espectroscòpia de RMN de ¹⁹⁹Hg cal remarcar que les freqüències de RMN estan íntimament relacionades amb la quantitat i distribució de càrrega entorn dels nuclis estudiats, i, per tant, són sensibles a l'entorn de coordinació del metall. La sensibilitat de la RMN de ¹⁹⁹Hg (I=1/2) respecte al nombre de coordinació primari del Hg(II) fa que aquesta tècnica també sigui una eina molt útil per a elucidar la coordinació d'aquest metall en complexos moleculars ben definits i, per comparació, en proteïnes. Aquesta tècnica pot aplicar-se a complexos en solució o en estat sòlid però en cadascuna de les dues maneres existeixen uns avantatges i uns inconvenients. Els espectres de RMN de ¹⁹⁹Hg en solució de compostos de Hg(II) són relativament fàcils d'obtenir però són difícils d'interpretar a causa de la seva dependència amb el dissolvent, la concentració i l'intercanvi ràpid dels lligands. En canvi, la RMN en estat sòlid ofereix l'avantatge de l'estaticitat de l'entorn de coordinació però hi ha problemes de sensibilitat inherents a aquesta tècnica. Sigui com sigui, les dades de RMN de ¹⁹⁹Hg en solució i en estat

47. T. Alsina, W. Clegg, K.A. Fraser, J. Sola, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1992) 1393.

48. L.M. Utschig, J.G. Wright, T.V. O'Halloran, *Methods in Enzymology*, (1993) 226, 94.

sòlid permeten diferenciar els tiolats de Hg(II) di-, tri- o tetracoordinats.

Les dades actuals porten a establir que els desplaçaments químics en els espectres en solució de tiolats alifàtics de Hg(II) corresponen a nombres de coordinació: dos, en l'interval comprès entre -1200 i -800 ppm; tres, entre -80 i -160 ppm; i, quatre, entre -300 i -500 ppm.⁴⁹ La Taula 1.3. mostra les dades en solució d'alguns d'aquests tiolats de Hg(II). També s'ha observat que és freqüent trobar discrepàncies entre els desplaçaments químics en estat sòlid i en solució de força espècies.⁵⁰ Aquest fet fa difícil la sistematització de les dades únicament en base a les dades de RMN en solució i, en conseqüència, la determinació de la geometria de coordinació del Hg(II). Així doncs, la correlació entre els desplaçaments químics en estat sòlid i en solució permet caracteritzar les propietats dinàmiques de les espècies en solució i, conjuntament amb la informació provinent de l'espectroscòpia vibracional i electrònica, tenir un perfil raonablement detallat de la química dels tiolats de Hg(II).

49. L.M. Utschig, J.W. Bryson, T.V. O'Halloran, *Science*, (1995) 268, 380.

50. N. Govindaswamy, J. Moy, M. Millar, S.A. Koch, *Inorg. Chem.*, (1992) 31, 5343.

Ressonància magnètica nuclear de ^{199}Hg de complexos
alifàtics $\text{Hg}(\text{SR})_n$

Compost	Dissolvent	(^{199}Hg) (ppm)
$\text{Hg}(\text{glutatió})_2$ ⁵¹	H_2O	-993
$\text{Hg}(\text{SCN})_2$ ⁵²	dmsó	-1101
$\text{Hg}(\text{SMe})_2$ ⁵³	CHCl_3 (sat.)	-871
$\text{Hg}(\text{SEt})_2$ ⁵³	CHCl_3 (0.1M)	-805
$\text{Hg}(\text{S-n-Pr})_2$ ⁵⁴	CDCl_3	-814
$\text{Hg}(\text{S-i-Pr})_2$ ⁵⁵	dmsó	-889
$\text{Hg}(\text{S-n-Bu})_2$ ⁵³	CHCl_3 (0.1M)	-801
$\text{Hg}(\text{S-t-Bu})_3$ ⁵⁵	dmsó	-157
$\text{Hg}(\text{S-i-Pr})_4$ ^{2-, 55}	CH_3OH	-152
$\text{Hg}(\text{SMe})_4$ ^{2-, 56}	$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	-374
$\text{Hg}(\text{SEt})_4$ ^{2-, 56}	$\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$	-302

Taula 1.3. Dades dels desplaçaments químics de ^{199}Hg en solució de complexos model $\text{Hg}(\text{SR})_n$.²⁰

Com a conclusió global s'extreu que la predicció de la identitat, el nombre i la disposició geomètrica dels lligands tiolat en l'esfera de coordinació del $\text{Hg}(\text{II})$ és força difícil si només es disposa de les dades d'espectroscòpia vibracional, electrònica i RMN en solució d'aquests complexos. Tot i així, es pot afirmar que l'anàlisi espectroscòpica de complexos model $\text{Hg}(\text{SR})_n$ és essencial per a poder interpretar les estequiometries i entorns de coordinació de les espècies que es formen durant les valoracions de metal·lotioneïna amb $\text{Hg}(\text{II})$. Cal tenir en compte, però, que

51. A.O. Summers, *Ann. Rev. Microbiol.*, (1986) 40, 607.

52. P. Peringer, P.P. Winkler, *Inorg. Chim. Acta*, (1981) 52, 257.

53. P.A. Dean, J.J. Vittal, M.H. Trattner, *Inorg. Chem.*, (1987) 26, 4245.

54. M.M. Kubicki, R. Kergoat, J.E. Guerschais, I. Bkouche-Waksman, C. Bois, P. L'Haridon, *J. Organomet. Chem.*, (1981) 219, 329.

55. M.J. Natan, C. Millikan, J.G. Wright, T.V. O'Halloran, *J. Am. Chem. Soc.*, (1990) 112, 3255.

56. G.K. Carson, P.A.W. Dean, *Inorg. Chim. Acta*, (1982) 66, 157.

l'espectroscòpia vibracional i l'electrònica permeten diferenciar entre entorns de coordinació Hg(II)-tiolat digonals i tri- o tetracoordinats, però no entre aquests dos darrers. Un problema que cal tenir en compte quan s'utilitzen aquestes tècniques espectroscòpiques és que les dades obtingudes depenen fortament de la presència d'interaccions secundàries Hg S i de la naturalesa del dissolvent quan es treballa en solució. I, finalment, cal remarcar que l'espectroscòpia de RMN de ^{199}Hg en estat sòlid i en solució és probablement la tècnica que, conjuntament amb les dades obtingudes a partir de les espectroscòpies IR, Raman i absorció UV-Visible, pot proporcionar unes dades més fiables i característiques dels diferents entorns de coordinació del Hg(II), si bé manquen dades bibliogràfiques per a poder disposar d'una sistematització adequada.

1.1.2. Tiolats de Pb(II)

És ben conegut que el Pb(II) forma complexos amb un rang d'estequiometries molt ampli i amb una gran variabilitat de lligands on els àtoms enllaçants són preferentment: C, N, O, S i halògens. No obstant aquesta diversitat, s'han trobat compostos exclusivament tiòlics malgrat que la majoria dels compostos que contenen tiolats com a lligands també tenen un o més dels altres àtoms donadors esmentats.⁵⁷ Dins dels tiolats de Pb(II) s'han caracteritzat compostos on el nombre de coordinació varia des de 2 fins a 8 essent els més abundants els que presenten 4 i 3 o 6 lligands tiolat, si bé també s'ha descrit que molt rarament els de 4 tiolats

57. Cerca bibliogràfica al *Cambridge Structural Database*.

adopten una disposició perfectament tetraèdrica.^{58,59,60} Així, l'estereoquímica dels complexos de Pb(II) és molt àmplia i comprèn geometries de coordinació: angular, piramidal, tetraèdrica, piràmide de base quadrada, bipiràmide trigonal, octaèdrica, bipiràmide pentagonal i d'altres de més complexos.^{61,62,63,64,65,66} En molts casos aquests entorns de coordinació presenten distorsions respecte a la geometria ideal i interaccions a llarga distància Pb-L. A més a més, l'estructura cristal·lina de compostos caracteritzats per difracció de raigs X indica que el parell d'electrons del Pb(II) que no s'utilitza per a la formació d'enllaços sovint té efectes importants sobre l'estereoquímica del compost.^{67,68}

Així doncs, de la mateixa manera que s'ha exposat pel Hg(II), la caracterització estructural i espectroscòpica de tiolats inorgànics de Pb(II) és una eina fonamental per a la determinació de l'entorn de coordinació del Pb(II) en els centres actius de proteïnes.

No obstant aquesta necessitat, a la bibliografia no es troba cap estudi sistemàtic sobre l'espectroscòpia òptica de tiolats de Pb(II) en què s'assignin les posicions de les absorcions característiques dels diferents

58. P.G. Harrison, *Silicon, Germanium, Tin and Lead. Comprehensive Coordination Chemistry: The Synthesis, Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds*; G. Wilkinson (Ed.), Pergamon Press, New York, 1987, 3, 183.

59. R.D. Hancock, A.E. Martell, *Chem. Rev.*, (1989) 89, 1875.

60. L. Shimoni-Livny, J.P. Glusker, C.W. Bock, *Inorg. Chem.*, (1998) 37, 1853.

61. P.A.W. Dean, J.J. Vittal, N.C. Payne, *Inorg. Chem.*, (1985) 24, 3594.

62. P.A.W. Dean, J.J. Vittal, N.C. Payne, *Inorg. Chem.*, (1984) 23, 4232.

63. G. Christou, K. Folting, J.C. Huffman, *Polyhedron*, (1984) 3, 1247.

64. P.B. Hitchcock, M.F. Lappert, B.J. Samways, E.L. Weinberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1983), 1492.

65. K.H. Ebert, H.J. Breunig, C. Silvestru, I. Stefan, I. Haiduc, *Inorg. Chem.*, (1994) 33, 1695.

66. S.G. Hardin, P.C. Healy, W.G. Mumme, A.H. White, G. Winter, *Aust. J. Chem.*, (1982) 35, 2423.

67. P. Colamarino, *Inorg. Chem.*, (1976) 15, 800.

68. E. Hough, D.G. Nicholson, *J. Chem. Soc. Dalton*, (1976) 1, 1782.

entorns de coordinació que pot presentar el Pb(II). De fet, fins no fa massa anys, s'havia considerat erròniament que el Pb(II) era un ió espectroscòpicament silenciós, cosa que ha comportat la manca de desenvolupament d'unes metodologies rigoroses que permetin analitzar les interaccions Pb(II)-l·ligands. El 1999, però, Payne i col·laboradors⁶⁹ publiquen que la coordinació del Pb(II) a proteïnes que contenen residus de Cys, i per tant, l·ligands tiolat, provoca l'aparició de bandes de transferència de càrrega Pb(II)-tiolat molt intenses en la regió compresa entre 250 i 400 nm i posen en entredit la creença general que el Pb(II) és cinèticament inert.

D'altra banda, és conegut que l'ió Pb(II) s'hidrolitza parcialment en aigua. En solucions de perclorat, el primer equilibri d'hidròlisi dóna lloc a la formació de $[\text{PbOH}]^+$, però la principal espècie present en solució aquosa és $[\text{Pb}_4(\text{OH})_4]^{4+}$.⁵ En solucions de clorurs, es formen complexos bàsics amb grups OH^- (hidroxilats) que sovint precipiten com a hidròxids.⁷⁰ Així, un dels inconvenients principals en la manipulació de solucions aquoses de Pb(II) és l'aparició de precipitats en un rang força ampli de pH.

69. J.C. Payne, M.A. ter Horst, H.A. Godwin, *J. Am. Chem. Soc.*, (1999) 121, 6850.

70. P. Tsai, R.P. Cooney, *J. Chem. Soc. Dalton*, (1976) 1631.