

# La regulació homeostàtica de $Fe^{3+}$ al nostre organisme

Estudi del paper de l'aconitasa i del citrat

Guillem Ramírez Santos

INS Jaume Vicens Vives

Curs 2014-2015

2n de Batxillerat

Tutora: Cristina Tejero Bertran

En primer lloc, vull agrair, a la Universitat de Girona, la concessió d'una beca *Botet i Sisó* per realitzar aquest treball, i a l'Institut de Química Computacional i Catàlisi per cedir-me un espai de treball i la llicència del software, a més de facilitar-me l'accés als articles científics utilitzats en aquest treball. Aquesta beca m'ha portat a conèixer en Ferran Feixas, qui m'ha introduït en el meravellós món de la química computacional, i de forma completament desinteressada, únicament per la transmissió d'una passió.

La Fundació Catalunya-La Pedrera també és mereixedora del meu reconeixement en finançar-me i facilitar-me l'estada al centre XLAB de Göttingen (Alemanya). També vull manifestar la meva gratitud a aquest centre, especialment a Birgit Drabent i a Raphael Körbel, que m'han ajudat en la part experimental.

Una altra institució que ha estat important per al treball ha estat l'Institut Jaume Vicens Vives de Girona, especialment els professors del Departament de Química: Iván González, Susana Doblado i Cristina Tejero.

També vull donar les gràcies als meus bons amics, José Andrés Ballester, Carme Homs, Guillem Rosselló i Joan Ariño, que han tingut molta paciència amb mi.

Finalment, vull agrair, als meus pares, les correccions i el suport constant que he rebut. Moltes gràcies!

Girona, 1 de febrer de 2015

Jo, Dr. Ferran Feixas Geronès, investigador de l'Institut de Química Computacional i Catàlisi de la Universitat de Girona, he supervisat el treball de recerca d'en Guillem Ramírez Santos, estudiant de l'Institut Jaume Vicens Vives (Girona), que porta per títol "*La regulació homeostàtica del Fe<sup>3+</sup> al nostre organisme. Estudi del paper de l'aconitasa i del citrat*". En aquest treball s'estudien els mecanismes de regulació dels nivells de Fe<sup>3+</sup> a nivell proteic i no proteic utilitzant tècniques pròpies de la química i biologia computacionals. El mecanisme a nivell molecular d'aquests processos és completament desconegut i la seva correcta descripció pot ajudar a comprendre millor i millorar el tractament de malalties relacionades amb alteracions dels nivells de ferro al nostre organisme. El treball del Sr. Ramírez ha consistit, en primer lloc, a estudiar i descriure el mecanisme biològic pel qual la proteïna aconitasa regula els nivells de ferro a l'organisme. En segon lloc, el Sr. Ramírez ha dissenyat computacionalment noves molècules que permetin un transport més eficient de ferro al nostre organisme. La meua funció va consistir a supervisar la part computacional del treball: ensenyar-li com s'efectuen i interpreten els càlculs computacionals, tals com la dinàmica molecular i el disseny computacional de noves molècules. La idea original del treball i tots els càlculs que componen la memòria són treball exclusiu del Sr. Ramírez, que va treballar de manera autònoma durant el període que va estar sota la meua tutela. Segons la meua humil opinió, el treball realitzat pel Sr. Ramírez és molt complet i d'una gran qualitat científica tenint en compte la seva edat i la seva formació; és més aviat propi d'un estudiant de grau en química. Cal destacar tant la gran capacitat a nivell científic com l'actitud oberta i innovadora mostrada pel senyor Ramírez durant la realització del projecte. En particular, la capacitat de reconduir la direcció del projecte quan es plantejaven dificultats, així com la seva capacitat de treball i d'aprendre i aplicar noves tècniques per tal de cercar noves perspectives i respostes a la pregunta proposada inicialment. A més a més, cal remarcar la visió innovadora i capacitat d'anàlisi i comprensió mostrades pel Sr. Ramírez durant les discussions sobre l'elaboració del projecte i els resultats obtinguts.

Finalment, amb els resultats obtinguts pel Sr. Ramírez en aquest treball, s'està preparant un manuscrit amb l'objectiu d'enviar-lo a una revista internacional del camp de la química computacional.

I perquè així consti per escrit, firmo la present a Girona, amb data 1 de febrer de 2015.

Dr. Ferran Feixas Geronès

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ferran', with a long horizontal stroke extending to the right.

# Índex de continguts

<u>Prefaci</u> .....	6
<b>1. <u>Introducció</u></b> .....	<b>7</b>
<b>2. <u>Mecanisme de la regulació homeostàtica del ferro</u></b> .....	<b>10</b>
2.1. <u>La regulació de ferro al nostre organisme</u> .....	10
2.2. <u>Estructura cristal·lina i anàlisi</u> .....	13
2.3. <u>Estudi per dinàmica molecular</u> .....	15
<b>3. <u>Estudi del citrat de ferro</u></b> .....	<b>19</b>
3.1. <u>Procediment experimental</u> .....	19
3.2. <u>Optimització de l'estructura experimental</u> .....	20
3.3. <u>Obtenció del citrat de ferro</u> .....	22
3.4. <u>Estudi de la solvatació del complex</u> .....	26
<b>4. <u>Realització de propostes</u></b> .....	<b>28</b>
4.1. <u>Explicació general</u> .....	28
4.2. <u>Interacció del citrat amb ions metàl·lics</u> .....	29
4.3. <u>Molècules transportadores de ferro</u> .....	30
<b>5. <u>Conclusions i discussió</u></b> .....	<b>33</b>
<b>6. <u>Conceptes clau</u></b> .....	<b>35</b>
<b>7. <u>Referències bibliogràfiques</u></b> .....	<b>36</b>
<u>Apèndix</u> .....	39
<b>A. <u>Obtenció i aïllament de l'àcid cítric</u></b> .....	<b>39</b>
A.1. <u>Aïllament</u> .....	39
A.2. <u>Comprovació de la puresa</u> .....	41
<b>B. <u>Obtenció de la fórmula molecular de l'àcid cítric</u></b> .....	<b>43</b>
B.1. <u>Introducció</u> .....	43
B.2. <u>Anàlisi elemental</u> .....	43
B.3. <u>Test de grups funcionals</u> .....	44
B.4. <u>Titració àcid-base</u> .....	47
B.5. <u>Espectrometria de masses</u> .....	49
B.6. <u>Oxidació de l'àcid cítric</u> .....	51
B.7. <u>Ressonància magnètica nuclear</u> .....	54
B.8. <u>Referències bibliogràfiques</u> .....	55
<b>C. <u>Exemple de càlcul computacional teòric</u></b> .....	<b>56</b>
<b>D. <u>Figures computacionals complementàries</u></b> .....	<b>57</b>

## Prefaci

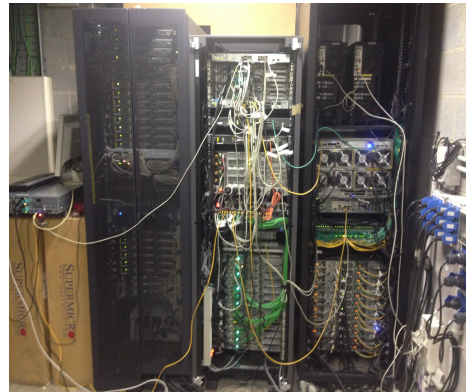
*“How insidious Nature is when one is trying to get at it experimentally!”*

**Albert Einstein**

Carta a Michele Besso (15/02/1915)

La curiositat i les ganes de conèixer-ho tot han estat una constant de l'ésser humà. Ja va ser a la Prehistòria quan la humanitat va començar a experimentar. El "què passarà si faig això?" ha significat grans èxits per a la població, com ara el descobriment de la utilitat del foc per coure la carn, l'obtenció del buit o la construcció de la primera pila galvànica.

Després de milers d'anys d'experimentació, sembla que arriba un punt en què adquirir coneixement a través d'ella ja no ens resulta tan fàcil com abans. Les noves teories que regnen en la química s'han tornat tan complexes que contemplen situacions que són pràcticament impossibles de reproduir en un laboratori. Gràcies al desenvolupament tecnològic, podem realitzar càlculs d'una elevada dificultat mitjançant l'ús d'eines computacionals. Els superordinadors (clústers informàtics) simulen experiments ràpidament, amb un preu de manteniment molt menor que el d'un laboratori comú.



*Clúster d'ordinadors de l'Institut de Química Computacional i Catalisi de la Universitat de Girona. Realització pròpia.*

Sóc conscient dels avenços que suposaran els càlculs computacionals en el món científic. És per això que volia que el meu treball fos paradigma del funcionament científic actual: l'estudi d'un tema important com ho és la regulació de ferro al nostre organisme, tractat computacionalment a partir de dades experimentals procedents d'articles científics. La ciència està al servei de les persones i s'haurà de procedir segons el procediment més adequat, ja sigui mitjançant els càlculs teòrics o mitjançant l'experimentació. De fet, en aquest treball també s'ha realitzat un estudi experimental, en el qual s'ha caracteritzat l'àcid cítric i s'han descrit les seves propietats.

Ara centrem-nos en el ferro, element indispensable per al nostre cos, que està associat amb nombroses malalties i disfuncions.

## 1. Introducció

El nostre organisme està compost, en primer lloc, pels sis bioelements primaris (C, H, N, O, P, S), la concentració dels quals és aproximadament del 96% a la matèria viva, i són els components principals de molècules com l'ADN o les proteïnes. No obstant això, alguns bioelements secundaris (Ca, Na, K, Mg, Fe, etc), els anomenats indispensables, hi tenen una concentració molt menor, però el paper que realitzen als organismes és vital.

El ferro és un d'aquests elements indispensables. A més de ser el quart element amb més presència a l'escorça terrestre i haver estat rellevant per al desenvolupament tecnològic –tant que ha arribat a anomenar l'època històrica coneguda com l'Edat del Ferro– té una presència important a pràcticament tots els organismes vius. Aquest és el cas del cos humà, que el necessita per a dur a terme funcions bàsiques com el transport d'oxigen mitjançant l'hemoglobina, la reducció d'oxigen a aigua mitjançant els citocroms o l'oxidació dels peròxids tòxics mitjançant les peroxidases. A pesar d'això, el paper fonamental del ferro en molts d'aquests processos encara està per determinar.

Així doncs, el nostre organisme necessita la presència d'aquest element, una concentració que és d'uns 6 g en un adult mitjà d'uns 75 kg, encara que existeixen variacions en funció del metabolisme de l'individu [1]. En qualsevol cas, un nivell de ferro inferior al necessari està catalogat com ferropènia, i és la principal causa de l'anèmia o baixa concentració d'hemoglobina a la sang, fet que dificulta el transport d'oxigen. Es calcula que prop de cent milions de persones pateixen aquesta anomalia [2].

Per altra banda, una concentració superior a 15 g en un ésser humà rep el nom d'hemocromatosi, i és perjudicial, pot causar cirrosi del fetge, ictus del cor, diabetis o artritis [3]. De totes maneres, per tal de poder millorar la comprensió i el tractament d'aquestes malalties és necessari estudiar les proteïnes que regulen aquests processos en l'àmbit molecular, així com els possibles lligands no proteics d'aquest metall.

El nostre organisme ha dissenyat un complex homeostàtic que regula la presència de ferro a la sang. La cara més visible té com a membre principal la proteïna aconitasa, que té una participació essencial en el cicle de Krebs isomeritzant el citrat per obtenir l'isocitrat. Aquesta reacció està catalitzada per un clúster  $Fe_4S_4$  situat al centre actiu de l'aconitasa. A diferència de la majoria de proteïnes, l'aconitasa realitza dues funcions. S'especula que aquesta pateix un canvi de conformació (estructura tridimensional) i de funció si no pot unir-se amb el citrat i el clúster

Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>. La prote3na amb la nova forma, 3s a dir, sense el cl3ster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, hist3ricament ha rebut el nom de prote3na reguladora del ferro o IRP1, per3 estudis de la seq3encia i l'estructura cristal·logr3fica han portat els científics a interpretar que podria tractar-se de la mateixa prote3na que l'aconitasa [4]. En qualsevol cas, la IRP1 realitza un rol totalment diferent: s'uneix a una regi3 no tradu3da (UTR) situada a l'extrem 5' del m, corresponent a la prote3na ferritina, per inhibir-ne la traducci3, al mateix temps que potencia la pres3ncia de la prote3na transferrina en col·locar-se en una altra regi3 no tradu3da a l'extrem 3'. La seva acci3 permet evitar una futura escissi3 endonucleol3fica o degradaci3 de l'associat a la s3ntesi d'aquesta prote3na. Aquestes dues prote3nes (transferrina i ferritina) s3n claus per a l'emmagatzematge i transport de ferro, i la seva s3ntesi est3 regulada per la IRP1. D'aquesta forma, l'aconitasa (o IRP1) 3s la prote3na responsable de regular la reserva de ferro a l'organisme, encara que el mecanisme que permet, a aquesta prote3na, alternar la funci3 dependent dels nivells de ferro de l'organisme 3s encara desconegut (vegeu Figura 1). Per altra banda, quan les prote3nes estan saturades, el ferro interacciona amb mol3cules com el citrat, que 3s el seu principal transportador no proteic.

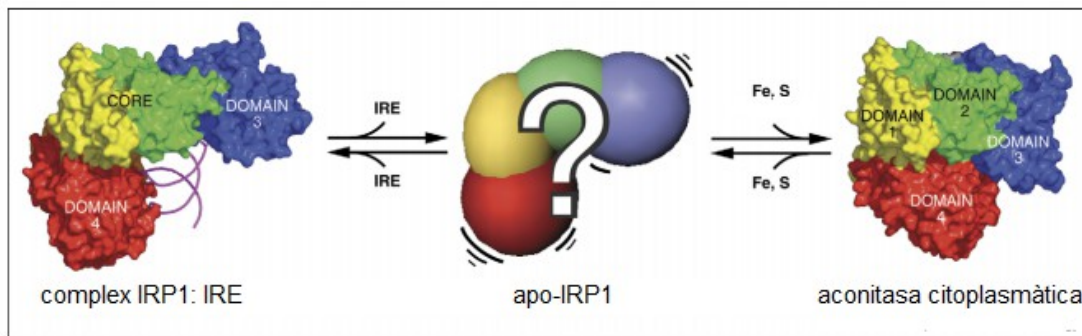


Fig. 1: Esquema de la hip3tesi científica actual: el pas de la IRP1 a l'aconitasa es d3na per la interacci3 amb el cl3ster de ferro. No obstant aix3, es desconeixen els mecanismes del proc3s, aix3 com l'estat intermedi de la prote3na [5].

Per tant, pot ser convenient tractar malalties relacionades amb un nivell inadequat de ferro a la sang partint d'aquests sistemes (aconitasa i citrat). La majoria dels tractaments consisteixen en una variaci3 de la dieta o la injecci3 d'ions f3rrics, per3 controlar la via homeost3tica podria permetre tractar, d'una forma m3s adequada, pacients amb una mala absorpci3 del ferro o amb una disfuncionalitat no relacionada amb la ingesti3, sin3 amb la gesti3 del ferro dins del seu organisme.

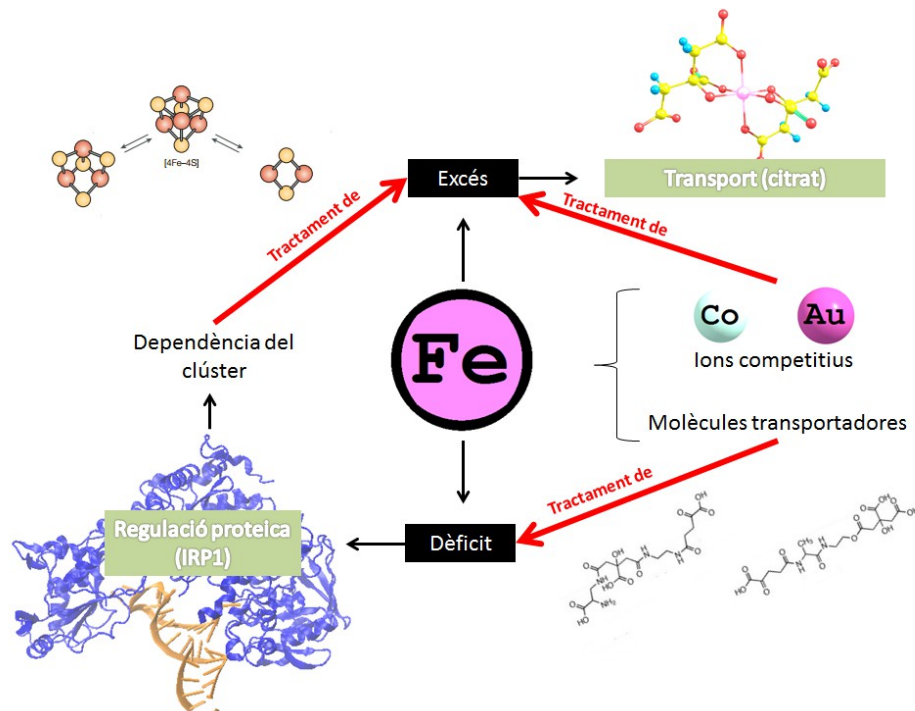


Fig. 2: Esquema representatiu del treball realitzat. Realització pròpia.

El principal objectiu d'aquest treball consisteix a estudiar teòricament, a través d'eines computacionals, el mecanisme de regulació proteic i no proteic de l'emmagatzematge de ferro al nostre organisme, així com el seu transport mitjançant la molècula de citrat. Gràcies a aquesta informació, s'exploraran possibles vies per al tractament de malalties associades a alteracions en el sistema homeostàtic. En primer lloc, es pretén analitzar el paper del citrat i del clúster  $Fe_4S_4$  en el canvi de conformació de l'aconitasa, un procés que hauria de permetre regular de manera directa o indirecta els ions fèrrics en el cas que, efectivament, l'aconitasa i la IRP1 fossin la mateixa proteïna, i aquesta pogués alternar la seva conformació en funció de la concentració de ferro. Cal destacar que l'evidència actual es basa en la interpretació dels científics després de la similitud entre les dues proteïnes, i la hipòtesi aquí plantejada és que l'absència del clúster  $Fe_4S_4$  (associada amb nivells baixos de ferro) a l'aconitasa permet el canvi de conformació i de funció (com hem vist a la Figura 1). Aquest procés està fins ara per determinar i pot tenir una connexió directa amb malalties relacionades amb la deficiència o l'excés de ferro.

En segon lloc, es realitzarà un estudi sobre el citrat de ferro, el major lligand no proteic de ferro (III) als organismes i alhora un dels medicaments més importants per combatre l'absència de ferro. Després d'un procediment experimental per caracteritzar l'àcid cítric, la investigació sobre la interacció entre el citrat i l'ió fèrric permetrà conèixer millor les propietats del citrat que el constitueixen com un bon



transportador d'ions f3rrics, i, partint d'aquests coneixements, es realitzaran propostes te3riques de noves mol3cules que puguin servir per combatre un nivell inadequat de ferro a la sang.

S'usaran eines pr3pies de la qu3mica computacional per tal d'assolir els prop3sits d'aquest treball. Aquestes eines permeten estudiar les propietats de les mol3cules que no es poden obtenir per mitj3 experimental. Un exemple d'aix3 seria una simulaci3 del moviment d'una prote3na, descriure el mecanisme d'una reacci3 o dissenyar nous f3rmacs. L'3s de cl3sters d'ordinadors permet estudiar tots aquests fen3mens d'una manera precisa i en un temps raonable, sense necessitat de realitzar els experiments en un laboratori.

## 2. Mecanisme de la regulaci3 homeost3tica del ferro

### 2.1. La regulaci3 de ferro al nostre organisme

El ferro 3s absorbit al nostre organisme a l'altura del duod3, dins de l'intest3 prim. Per a una correcta absorci3, ha d'estar en estat d'oxidaci3 de  $Fe^{3+}$  [6, 7]. A causa d'aquesta forma i3nica, no pot estar lliure al plasma sanguini per la facilitat amb la qual precipitaria, ni tampoc dins del citoplasma, ja que danyaria l'entorn cel·lular. 3s per aix3 que 3s transportat a trav3s dels vasos sanguinis per una prote3na anomenada transferrina, que el porta cap a la matriu 3ssia i altres 3rgans. Les transferrines transporten prop de 25 mg de ferro al dia, i tenen dos locus amb una alta afinitat pel ferro (aproximadament  $10^{23}M^{-1}$  en un pH de 7.4) [8]. Si la saturaci3 de les transferrines excedeix el 45%, el ferro formar3 el que Hershko (1978) va nomenar *non-transferrin bound iron* (NTBI) [9]. El concepte del NTBI es correspon amb qualsevol mol3cula de car3cter no proteic que presenti certa afinitat amb el ferro dins de l'organisme. Els complexos NTBI s3n usats m3dicament per determinar la concentraci3 de  $Fe^{3+}$  a la sang, i actualment constitueixen una ambiciosa via d'investigaci3 per detectar i evitar malalties derivades de l'hemocromatosi (exc3s de ferro). La ra3 d'aix3 3s que, en moltes ocasions, les mol3cules NTBI actuen com deposici3 de ferro als teixits d'alguns 3rgans com el p3ncrees, el fetge o el cor (vegeu Figura 3). Aquesta deposici3 als teixits est3 relacionada amb un augment de toxicitat a l'organisme. Encara es desconeixen les raons de la tend3ncia a les deposicions, per3 factors com una alta polaritat de la mol3cula o una interacci3 no prou forta amb el ferro s'han proposat com a possibles explicacions de l'acumulaci3 de ferro als teixits. Una altra propietat per al transportador de ferro no proteic ideal 3s que presenti una alta afinitat per la transferrina, facilitant aix3 la transfer3ncia de ferro al principal transportador proteic.

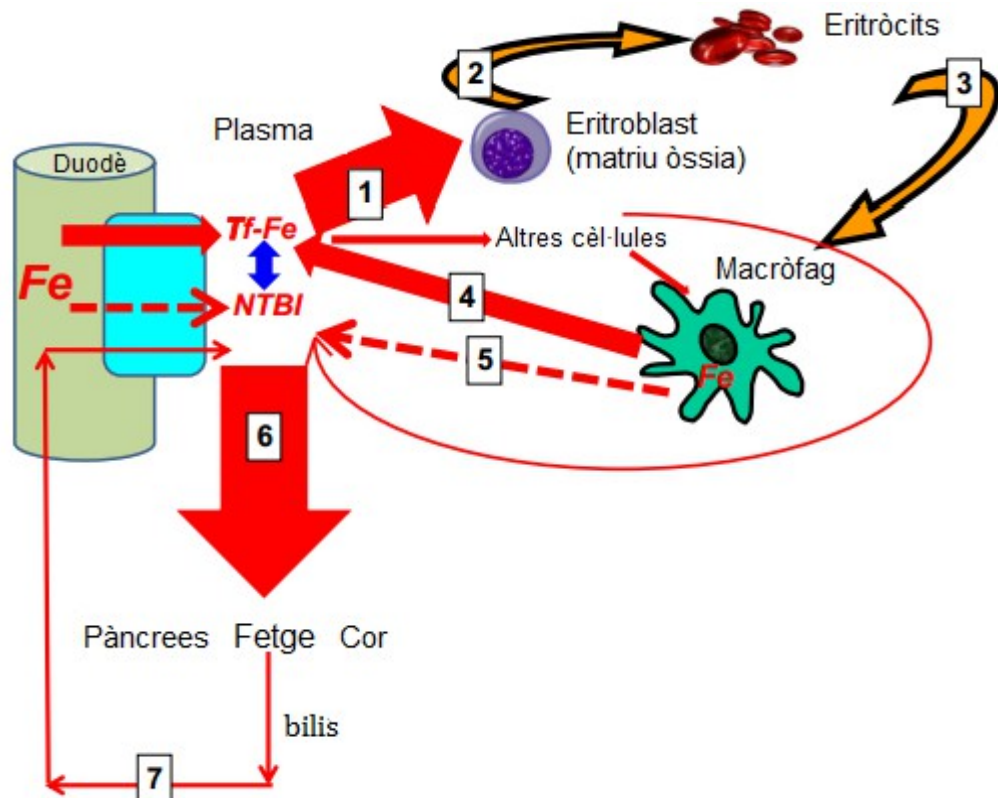


Fig. 3: Cicle del ferro al nostre organisme. En el cas que s'uneixi amb la transferrina (1), el ferro formarà les cèl·lules sanguínies (2) fins que es degradi en el sistema reticle-endotelial per un macròfag (3). Una vegada alliberat de la melsa, o bé s'uneix de nou a la transferrina (4) o bé formarà un complex NTBI, que afectarà el fetge, el cor o el pàncrees (6). També és possible que se secreti al sistema digestiu i torni a absorbir-se (7) [10].

Existeixen, a més, diferents formes d'emmagatzematge del ferro. Les dues proteïnes més importants en aquest sentit són la ferritina i l'hemosiderina. La primera és la major reserva de ferro a la nostra sang (cada una pot emmagatzemar uns 4500 àtoms de ferro) i la seva afinitat pel ferro és major que la de la transferrina, la qual cosa pot ser contraproduent per a l'organisme en una situació de baixa concentració de ferro [11, 12]. L'organisme de les persones amb una baixa concentració de ferro a la sang desenvolupa una resposta, inhibint la formació de ferritina i potenciant la transferrina. Fins al dia d'avui es coneixen dues proteïnes d'acció reguladora d'aquest mecanisme: la IRP1 i la IRP2. La primera es troba en una major concentració que la segona als organismes, i en els últims anys s'ha descobert que la seva seqüència d'aminoàcids és la mateixa que la de l'aconitasa (enzim involucrat en el cicle de Krebs), i s'ha creat la hipòtesi que es tracta de la mateixa proteïna, capaç de realitzar dues funcions. La rellevància d'aquesta relació és enorme, ja que l'aconitasa està unida a un clúster  $Fe_4S_4$  i una molècula de citrat. En el cas que la concentració de  $Fe^{3+}$  a l'organisme sigui prou baixa com per afectar la síntesi del clúster de ferro-

sofre, l'aconitasa deixaria d'isomeritzar citrat a isocitrat (cicle de Krebs) i s'obriria, adoptant la conformaci3 de la IRP1 [13].

L'acci3 de la IRP1 s'ha d'entendre mitjançant el concepte IRP-IRE binding. Les proteïnes reguladores tenen uns locus (IRP) que tenen molta afinitat per determinades seccions del m (IRE) que no es tradueixen, sin3 que serveixen com a regulaci3 de l'expressi3 de la proteïna. Aquest mecanisme 3 com3 en molts organismes, i d'especial importància en el metabolisme humà, arribant a deu la llista de les IRES esmentades en publicacions científiques [14].

La IRP1 es pot unir a una IRE tant per inhibir la s3ntesi de ferritina com per potenciar la producci3 de transferrina (Figura 4) i d'aquesta manera regular els nivells de ferro a l'organisme. Per tant, la seva acci3 3 especialment 3til en els casos d'anèmia per baixa concentraci3 de Fe<sup>3+</sup> a la sang. De fet, la hiperferritin3mia hereditària 3 una malaltia associada a una mutaci3 que afecta l'expressi3 de la secci3 del IRE del gen que transcriu la ferritina, existint-ne, a m3s, altres malalties gen3tiques relacionades.

La IRP1 t3 una elevada importància en l'àmbit biol3gic en regular els nivells de Fe<sup>3+</sup>, però el mecanisme pel qual es produeix aquesta regulaci3 3 encara desconegut. La principal hip3tesi científica 3 que la manca del cl3ster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> a l'aconitasa provoca un canvi conformacional significatiu a la proteïna induint-ne l'obertura i permetent aix3 adoptar la conformaci3 t3pica de la IRP1. El proc3s de s3ntesi dels cl3sters del tipus Fe-S està sent actualment estudiat, i una mala formaci3 d'ells pot ser atribuïda a la mala expressi3 d'un gen que codifica una proteïna (com la *Isa-protein-related ISCA* als bacteris) o, sobretot, la no disponibilitat del cl3ster de ferro-sofre pot ser deguda a una baixa concentraci3 d'aquests elements [16, 17].

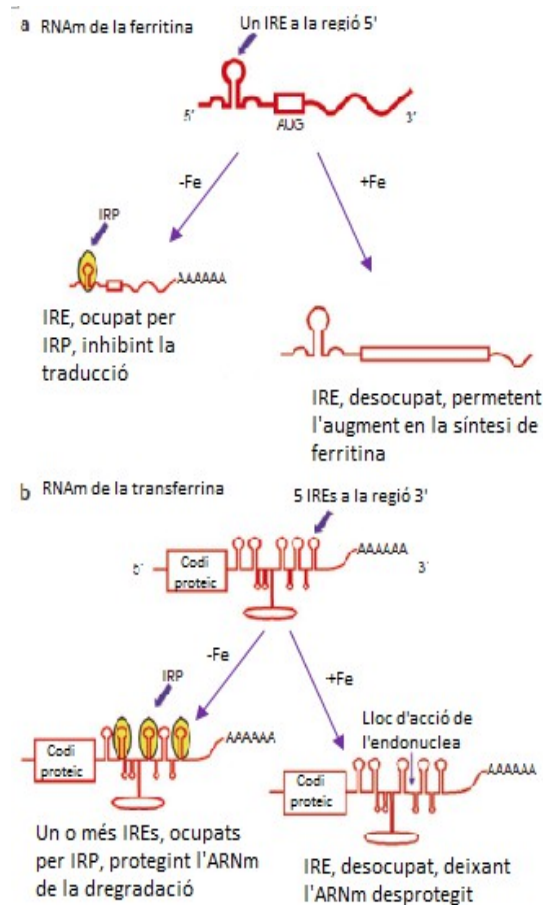


Fig. 4: Esquema de la unió de la IRP1 a la IRE de la ferritina (a) i de la transferrina (b) [15].

## 2.2. Estructura cristal·lina i anàlisi

Hi ha conformacions tant de l'aconitasa (PDB: 1C96) com de la IRP1 (PDB: 3SN2) que són de domini públic (Protein Data Bank). Ambdues estructures es van obtenir per difracció de raigs X.

L'estructura de l'aconitasa procedeix de Lloyd (1999) [18] i té una resolució de 1,8 Å. De Volz (2011) [19] procedeix l'estructura de la IRP1, d'una resolució de 2,8 Å. A partir d'una anàlisi visual d'elles, es pot observar com la seqüència d'aminoàcids de totes dues proteïnes és la mateixa, però l'estructura tridimensional és sorprenentment diferent amb un canvi de conformació que provoca la seva obertura (vegeu Figura 5). Per facilitar l'anàlisi tridimensional s'han definit tres parts: el cos, el domini 1 i el domini 2 (vegeu Figura 6).

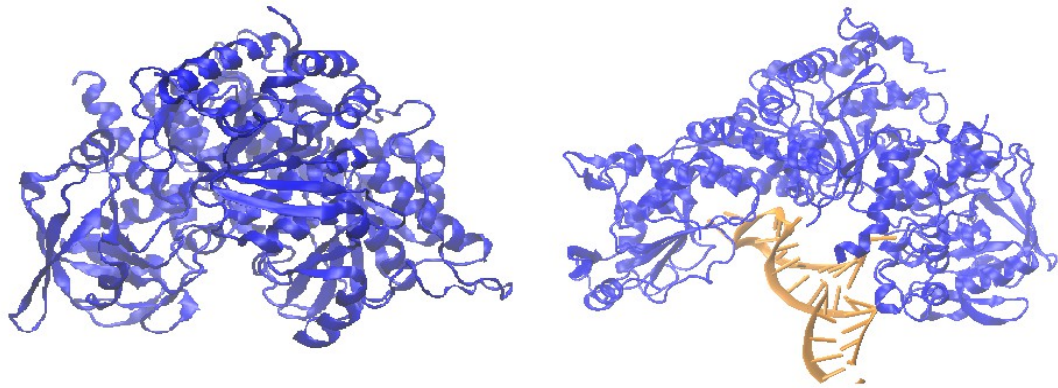


Fig. 5: A l'esquerra, l'aconitasa de Lloyd. A la dreta, la IRP1 unida al ARNm de Volz. Realització pròpia.

Mitjançant el programa VMD (versió 1.9) s'ha analitzat el centre actiu de l'aconitasa (PDB: 1C96). Una molècula d'àcid cítric i una de  $Fe_4S_4$  es troben dins d'ell, interaccionant fortament amb els aminoàcids que el constitueixen.

És digna d'esmentar la perfecció geomètrica amb la qual el citrat encaixa a través d'una xarxa d'enllaços d'hidrogen amb la proteïna, que dona la idea que la seva unió a l'aconitasa és molt favorable. D'aquesta manera, es realitza una interacció que, amb el clúster  $Fe_4S_4$  com a catalitzador, permet l'obtenció d'isocitrat dins del cicle de Krebs. El clúster

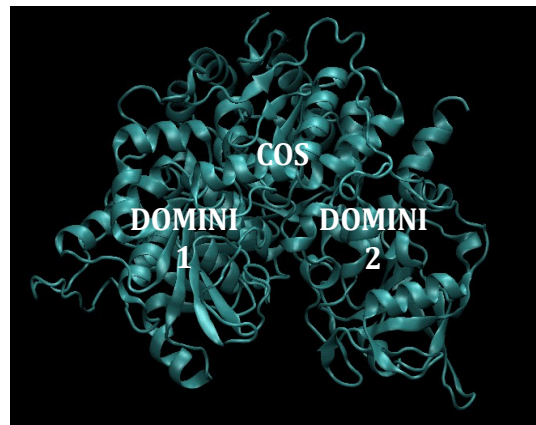


Fig. 6: Visió esquematitzada de la proteïna. Realització pròpia.

est3 fixat per tres cisteines, amino3cids amb grups tiol (R-SH), que presenten una gran afinitat pel ferro.

S'han considerat com especialment rellevants els amino3cids que estan a una dist3ncia de 5 Å o menor, ja que presentaven una interacci3 m3s gran que els de la resta de l'entorn, formant enllaços d'hidrogen amb la mol3cula de citrat. Aquests amino3cids s3n els següents<sup>A</sup>:

- Arginina-580
- Glutamina-72
- Histidina-101
- Arginina-644
- Serina-643
- Serina-166
- Arginina-447
- Arginina-452

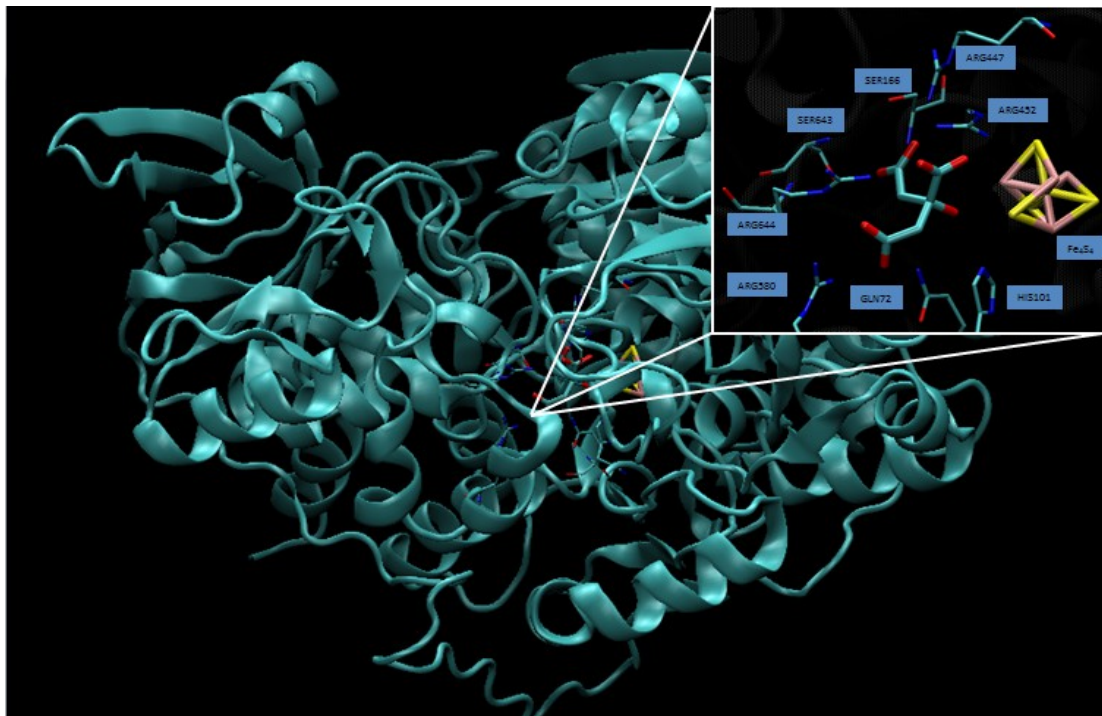


Fig. 7: Vista general de l'aconitasa. La imatge ampliada mostra el centre actiu amb una mol3cula d'3cid c3tric i el cl3ster met3l·lic. S'han indicat els vuit amino3cids que mostren unes interaccions fortes amb l'isocitrat.  
Realitzaci3 pr3pia.

<sup>A</sup> A la seqü3ncia d'amino3cids publicada per Lloyd es considera tamb3 la ALA-642, situada a 7,3 Å.

Aquests aminoàcids són d'una gran rellevància, ja que una mutació a la seqüència de codons de l'ADN que els transcriu impediria la creació d'un centre actiu tan atractiu per al citrat i el clúster de ferro com ho és el de l'aconitasa, afectant el mecanisme de la reacció catalitzada per l'aconitasa, reduint la conversió de citrat a isocitrat i dificultant l'obtenció d'energia mitjançant el cicle de Krebs.

La principal incertesa sobre el funcionament del lloc actiu de l'aconitasa és la importància del clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>. Existeixen referències bibliogràfiques que també ho suggereixen. A Suècia, per exemple, es va detectar una malaltia genètica caracteritzada per la deficiència en la concentració d'aconitases. Els individus que la patien presentaven intolerància a l'exercici físic, entre d'altres símptomes relacionats amb una baixa producció d'energia. Recentment, s'ha descobert que aquesta malaltia estava lligada a mutacions en el gen que codifica la ISCU, una de les proteïnes que participen en la síntesi del clúster [20].

### **2.3. *Estudi per dinàmica molecular***

Les proteïnes són objectes altament dinàmics, adoptant un gran nombre de conformacions diferents en un període curt de temps. Aquesta flexibilitat els permet interaccionar amb altres molècules, com ara fàrmacs, ADN, ARN o altres proteïnes. Aquestes interaccions són la base de la vida en tots els organismes. La majoria d'aquestes interaccions o canvis conformacionals tenen lloc en una escala de temps inferior als mil·lisegons. Actualment, no hi ha tècniques experimentals que permetin estudiar la dinàmica d'aquests fenòmens tan importants per a la vida d'un organisme. És per aquesta raó que cal un "microscopi computacional", una tècnica computacional que permeti fer simulacions amb les proteïnes.

La tècnica de la dinàmica molecular és un mètode computacional que permet analitzar el moviment de les proteïnes i altres biomolècules amb una gran precisió. La tècnica consisteix a tractar els nuclis dels àtoms que formen la proteïna com a càrregues dins d'un camp elèctric, de tal manera que les interaccions es regeixen per conceptes de la física clàssica [21]. Aquesta tècnica permet obtenir, en un període relativament curt de temps, el moviment i les interaccions dels àtoms d'una macromolècula gran i així poder analitzar canvis conformacionals. En reconeixement del gran avenç que ha suposat en el camp de la química i la biologia, Martin Karplus, Michael Levitt i Arieh Warshel, principals desenvolupadors de la tècnica, van rebre el premi Nobel de Química l'any 2013.

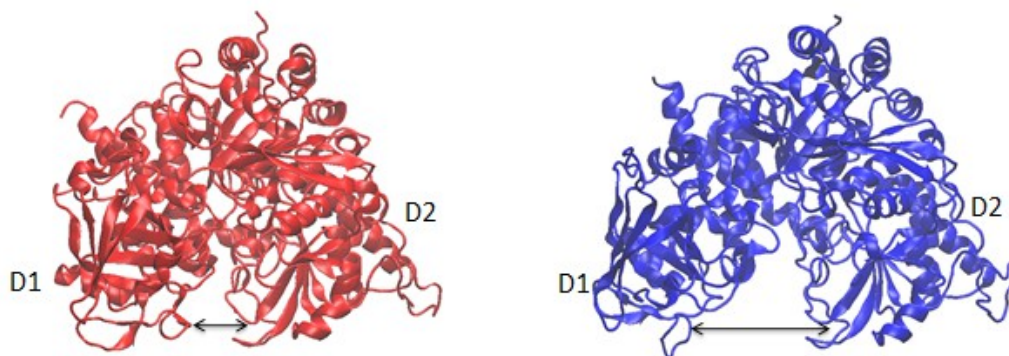
El procediment de preparació de l'estructura cristal·logràfica experimental (PDB: IC96) per a l'aplicació de la dinàmica molecular ha estat el següent:

- Addició dels protons. S'han afegit els corresponents amb el pH fisiològic (pH = 7).
- Optimització de la distribució dels protons.
- Addició de l'energia cinètica. Augment de la temperatura a 300 K.
- Producció d'una trajectòria de dinàmica molecular. El programa utilitzat ha estat l'AMBER 12 (versió GPU).

L'aplicació de la dinàmica molecular ha perms una sèrie de redistribucions dels àtoms a l'espai en funció del temps, amb uns increments de l'ordre dels femtosegons ( $10^{-15}$ s). El procés s'ha realitzat a l'aconitasa sense el clúster ni el citrat, amb el citrat a la regió activa i sense el clúster i amb el citrat en el seu exterior i sense el clúster. S'han simulat un total de 200 nanosegons ( $10^{-9}$ s) per a cada cas (equivalent a una setmana de càlcul en un superordinador).

Les simulacions han aportat molta informació sobre el moviment i les interaccions de l'aconitasa.

En primer lloc, a les simulacions s'ha observat com la conformació tridimensional de l'aconitasa sense citrat ni clúster  $Fe_4S_4$  tendeix cap a la forma de la IRP1 (vegeu Figura 8), augmentant la separació i l'angle entre els dominis 1 i 2.

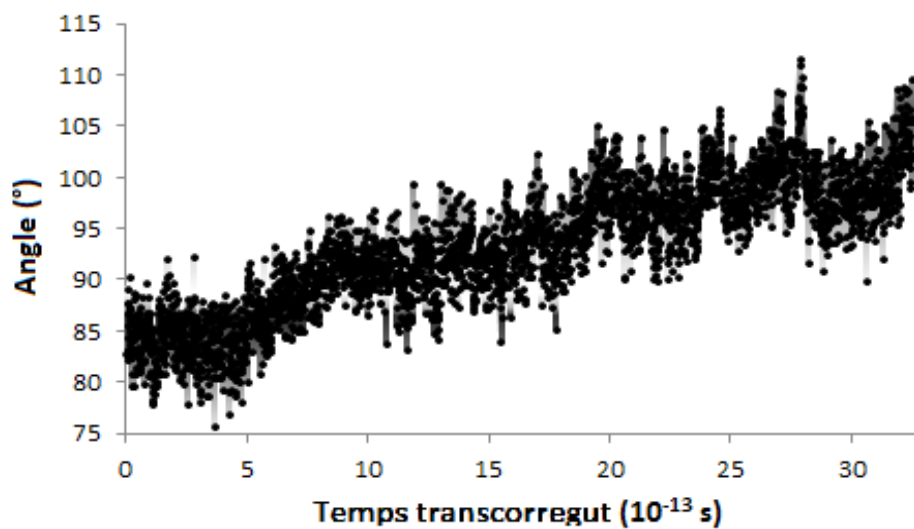


*Fig. 8: Canvi de conformació de l'aconitasa per passar a ser la IRP1, estudiat a través de la dinàmica molecular. A l'esquerra, l'estructura de partida (aconitasa). A la dreta, l'estructura final obtinguda computacionalment. Realització pròpia.*

Per a una millor il·lustració de l'obertura de l'aconitasa, s'ha realitzat el Gràfic 1. S'hi pot veure l'angle format entre tres aminoàcids en funció del temps. Aquests

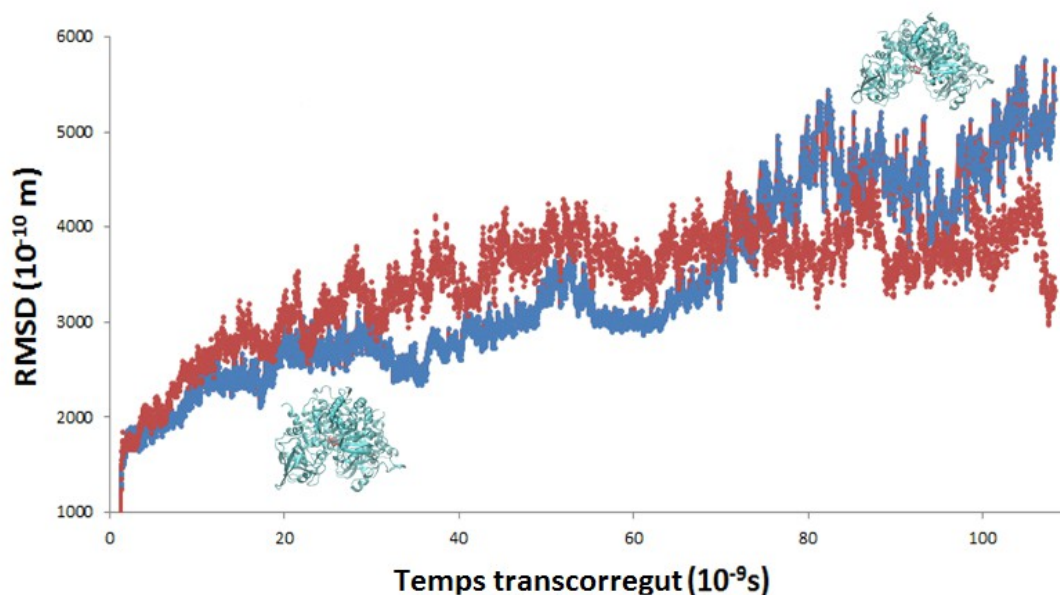
aminoàcids són representatius de les tres regions de l'aconitasa a què s'han fet referència en el punt anterior (domini 1, domini 2 i cos central).

A l'aconitasa (1C96), l'angle inicial és de  $80,1^\circ$ . A la IRP1 (3SN2), l'angle format és de  $112,3^\circ$ . La simulació mostra l'increment notable d'aquest angle, augmentant i aproximant-se als valors de la IRP1. Aquest és un exemple representatiu de com i cap a on és l'evolució de la conformació de l'aconitasa sense el citrat ni el clúster, fet que comporta l'evidència que totes dues proteïnes són en realitat la mateixa i hi ha un mecanisme de connexió entre elles.



Gràf. 1: L'angle format entre els aminoàcids VAL-498, GLU-611 i ALA-154 en funció del temps. La molècula estudiada ha estat l'aconitasa (1C96) sense citrat ni clúster metàl·lic. Realització pròpia.





Gràf. 2: Increment de la posició de l'aconitasa (IC96) sense clúster ni citrat (vermell) i sense clúster (blau) en funció del temps. Realització pròpia.

En segon lloc, s'ha observat a les simulacions que el citrat, al centre actiu, pot inicialment evitar el canvi de conformació, però l'aconitasa acaba assumint la mateixa conformació que sense ell, ja que al cap d'uns 60 nanosegons es trenquen els enllaços d'hidrogen del citrat amb els aminoàcids del centre actiu. Per avaluar el canvi conformacional, s'ha calculat com canvia el valor quadràtic mitjà de les posicions dels àtoms al llarg de la simulació respecte a a les posicions de l'estructura inicial.

La magnitud del valor quadràtic mitjà de l'increment de les posicions dels àtoms al llarg d'un moviment és coneguda com RMSD, i pot representar-se mitjançant la següent fórmula:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i' - X_i)^2} \quad (1)$$

On  $n$  és el nombre d'àtoms,  $X_i$  la posició inicial de l'àtom número  $i$  i  $X_i'$  la seva posició actual.

Segons veiem al Gràfic 2, tant l'aconitasa amb citrat com l'aconitasa sense citrat, tot i presentar uns increments de posició diferents a la primera part de la simulació, acaben tendint a la mateixa situació. El citrat és capaç de mantenir la proteïna tancada, però al cap d'uns 60 nanosegons el citrat es mou del centre actiu, fent que la proteïna s'obri. Fins i tot, els àtoms de la proteïna amb citrat, molècula que s'ha deslocalitzat del centre actiu, acaben tenint un increment quadràtic mitjà més gran,

perquè la presència de citrat ja no afecta l'obertura. Aquest fet confirma indirectament la dependència de l'aconitasa del clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, ja que sense ell no pot mantenir la conformació tancada i assumir el seu rol més important (servir per a la reacció d'isomerització del citrat), adoptant la conformació de la IRP1. Finalment, s'ha arribat a la conclusió que, sense la presència del clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, és molt improbable que un citrat procedent de l'exterior s'uneixi al centre actiu de l'aconitasa. La simulació del citrat, situat a l'exterior de l'aconitasa, ha permès veure que és molt difícil que s'uneixi el citrat estant la proteïna en conformació oberta i sense el clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, que exerceix unes importants forces d'atracció.

Per tant, aquests resultats confirmen l'important paper del clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> en el canvi de conformació de l'aconitasa. Sense el clúster l'aconitasa no pot realitzar la seva funció i canvia la conformació per tal d'activar els mecanisme de regulació de ferro dins l'organisme. En aquesta part del treball s'han realitzat les simulacions que s'han considerat més importants i s'han repetit per comprovar les dinàmiques dels sistemes. Altres simulacions necessàries per a una millor comprensió del mecanisme complet d'aquest canvi de conformació hauran d'incloure el clúster, que s'ha intentat evitar perquè la seva conformació no ha estat prou estudiada en el món científic fins ara.

És important destacar la rellevància de la confirmació del paper del clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> en la regulació de Fe<sup>3+</sup>. Una concentració alta, per exemple, pot ser tractada potenciant la síntesi del clúster, que serviria per a (i) emmagatzemar el ferro, (ii) evitar la inhibició de ferritina i (iii) obtenir més energia al nostre cos mitjançant el cicle de Krebs.

### **3. Estudi del citrat de ferro**

L'àcid cítric és el principal lligand no proteic (NTBI) del Fe<sup>3+</sup> al nostre organisme [22]. La seva importància en la regulació del ferro constitueix una important via d'investigació, ja que es podrien tractar més específicament malalties relacionades amb una concentració desproporcionada de ferro.

El citrat d'amoní fèrric és usat mèdicament per aportar ions de ferro, juntament amb el sulfat fèrric o la sacarosa de ferro, entre d'altres. Recentment, la US Food and Drug Administration (FDA) va aprovar el fàrmac Zerenex (Keryx Biopharmaceuticals) basat en el citrat per l'aportació d'ions de ferro i la regulació de grups fosfat, en el tractament de la malaltia crònica del ronyó [23].

La química dels complexos que forma el citrat amb el  $\text{Fe}^{3+}$  i amb altres ions metllics s de gran interès, perquè aquesta informació pot usar-se com a base a l'hora de dissenyar fàrmacs o complexos que permetin regular el ferro. Les dificultats d'obtenir experimentalment conclusions vàlides sobre els compostos relacionats amb el citrat de ferro [24] obren les portes a abordar el problema amb els mitjans de la química computacional.

En aquest apartat s'han investigat les propietats químiques de l'àcid cítric que el confereixen un bon transportador del ferro. Per començar, s'ha determinat la seva fórmula i estructura molecular mitjançant l'experimentació. A continuació, s'ha estudiat la seva estructura tridimensional i la seva interacció amb el ferro per via computacional. Finalment, s'ha fet servir un entorn aquós per comparar les interaccions de l'o fèrric en solució o enllaçat al citrat i, d'aquesta manera, aconseguir entendre per què el citrat és el major lligand no proteic del ferro.

### 3.1. *Procediment experimental*

S'ha seguit un procediment experimental per tal de determinar la fórmula molecular de l'àcid cítric aix com les seves propietats. Els experiments es van realitzar durant la setmana del 28 de juliol al 3 d'agost en un laboratori del centre XLAB de Gttingen (Alemanya). Certs experiments, que requerien l's d'una maquinària més complexa, s'han realitzat al Departament de Química de la Universitat de Gttingen.

S'ha seguit l'esquema de treball següent<sup>B</sup>:

- Aïllament de l'àcid cítric mitjançant  $\text{CaCl}_2$  i la matriu polimerosa Amberlite<sup></sup> IR-120 H<sup>+</sup>.
- Comprovació de la puresa. s de les tècniques de cromatografia en capa fina i cromatografia d'alta eficàcia.
- s de dades experimentals procedents d'una anàlisi elemental.
- Test per a grups funcionals.
- Titració cid-base per obtenir el nombre de grups carboxílics.
- Espectrometria de masses.
- Oxidació de l'àcid cítric per determinar la posició del seu grup hidroxil.

---

<sup>B</sup> Una major explicació de tots els procediments i experiments pot trobar-se a l'pendix, apartats A i B.

- Ús de la tècnica de la ressonància magnètica nuclear (NMR) per comprovar la hipòtesi final.

El procediment ha tingut l'objectiu de conèixer la presència i la distribució dels diferents grups funcionals que conformen l'àcid cítric. La conclusió extreta d'aquest punt, comprovada posteriorment amb la bibliografia, és que l'àcid cítric està conformat per tres grups carboxílics i un grup hidroxil, a la molècula representada a la Figura 9. Aquesta informació serà rellevant per determinar la interacció del citrat amb el ferro.

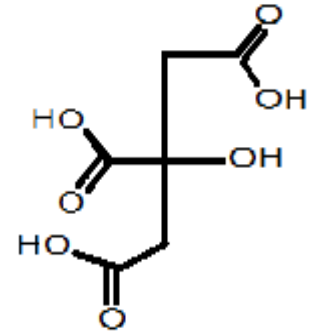


Fig. 9: Molècula caracteritzada d'àcid cítric. Realització pròpia.

### 3.2. Optimització de l'estructura experimental

L'obtenció de la disposició tridimensional dels àtoms de l'àcid cítric s'ha realitzat computacionalment optimitzant amb el programa Gaussian 09 l'estructura obtinguda experimentalment. Computacionalment es pot predir quina és l'estructura més estable d'una molècula (menor energia) i determinar-ne les propietats més rellevants. El mètode usat per optimitzar i calcular l'energia ha estat el B3LYP (teoria del funcional de la densitat) i la funció de base 6-31G\*. A cada càlcul s'han estudiat les freqüències vibracionals de la molècula per tal de comprovar que l'optimització hagi donat lloc a un mínim d'energia.

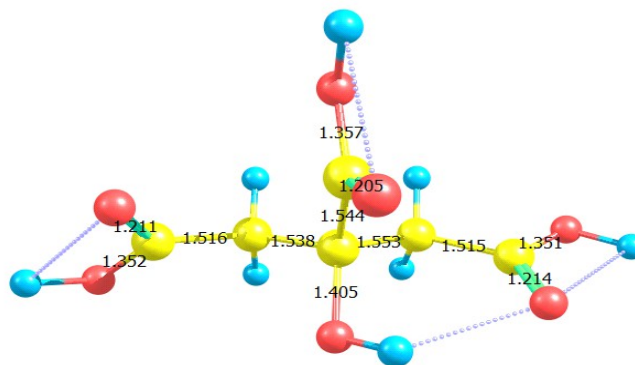


Fig. 10: Estructura tridimensional de l'àcid cítric. Les distàncies entre àtoms s'han indicat en angstroms ( $10^{-10}$  m). Realització pròpia.

Després d'unes quantes optimitzacions, s'ha triat l'estructura amb una energia més baixa (-760,050 hartrees<sup>c</sup>). S'han forçat alguns canvis, especialment en l'orientació del grup hidroxil, per emular una estructura procedent d'una difracció de raigs X

<sup>c</sup> Un hartree és una unitat d'energia equivalent a 627,509 kcal/mol.

experimental<sup>D</sup>, amb la qual cosa s'aconsegueix un sistema menys estable (una diferència de l'ordre de  $10^{-6}$  Ha), però més realista, a causa que aquesta última conformació tenia en compte l'entorn cristall de l'àcid cítric.

L'cid cítric es troba desprotonat en medi fisiològic, adoptant la forma de citrat. Per aquest motiu s'ha determinat la seva estructura en aquest estat amb tres càrregues negatives.

S'han desprotonat els grups carboxil de l'àcid cítric i s'ha optimitzat la geometria de partida. Per determinar si el nivell de teoria (B3LYP/6-31G\*) s l'adequat per descriure la molècula de citrat, aquests càlculs s'han realitzat amb els mètodes B3LYP i BP86. Les bases han estat 6-31G\* i 6-311+G(d,p). El canvi de mètode (BP86) i de base (6-311+G(d,p)) no ha suposat un canvi significatiu en els valors d'energia. Per aquest motiu, tots els càlculs realitzats a continuació seran utilitzant B3LYP i la base 6-31G\*.

Energia total	B3LYP i base 6-311+G(d, p)	BP86 i base 6-31G*	B3LYP i base 6-31G*
Citrat teòric	-758,350	-758,036	-758,012
Citrat exp.	-758,011	-758,035	-758,011

Taula 1: Comparació entre les diferents energies del sistema del citrat procedent de l'àcid cítric teòric i de l'àcid cítric experimental.

Després d'una comparació energtica entre l'optimització de citrat purament teòric i el que ha intentat emular la disposició experimental, l'àcid cítric teòric ha estat el que presentava una geometria més estable. Tot i aix, la diferència ha estat petita, i s'ha decidit fer servir el segon per a una major adequació amb la realitat d'un sistema més gran.

### 3.3. Obtenció del citrat de ferro

Es poden considerar diferents interaccions entre el citrat i un i metlic com és el  $Fe^{3+}$ , especialment si tenim en compte que l'i feric pot interaccionar amb diferents grups funcionals del citrat. El criteri utilitzat per determinar la magnitud de la interacció ha estat el de trobar el sistema més estable per a la interacció amb el metall.

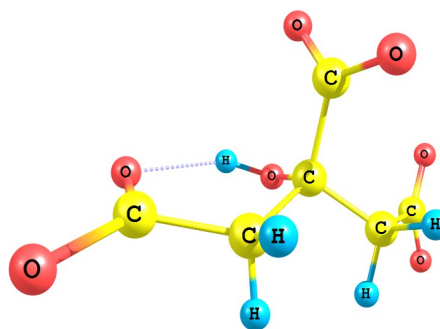


Fig. 11: Vista del citrat procedent de la geometria experimental. Realització pròpia.

<sup>D</sup> L'estructura experimental fou obtinguda durant una sessió prctica a la Universitat d'Oxford (Regne Unit). La conformació pot consultar-se a <http://www.ccp14.ac.uk/ccp/web-mirrors/crystals/didcot.html>

S'ha seguit un esquema de treball semblant a l'adoptat per Ahlstrand (2013) [25] a l'hora de mesurar les energies d'interacció entre ions metàl·lics i lligands de rellevància biològica. En primer lloc, les interaccions poden donar-se de forma monodentada, bidentada i tridentada, en funció del nombre d'interaccions entre l'ió metàl·lic i el compost. S'han generat diferents geometries per representar les diferents interaccions i determinar-ne la més forta.

Els sistemes monodentats eren pràcticament impossibles d'estudiar a causa de la seva inestabilitat, i tendien a formar una interacció bidentada. Sí que s'han optimitzat amb èxit interaccions bidentades, però aquestes eren de mitjana d'uns 0,030 hartrees menys estables que les tridentades, les més estables. Les interaccions tetridentades han convergit a tridentades, el que indica que les interaccions tridentades són les més rellevants per a aquest sistema. La interacció pot donar-se amb els oxígens dels grups carboxílics o amb l'oxigen del grup hidroxil.

És important destacar que s'ha determinat el paper del grup hidroxil del citrat en l'enllaç amb el ferro, el qual no queda clar en l'àmbit experimental. Després d'observar que aquest grup interaccionava amb el clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> al centre actiu de l'aconitasa, s'ha decidit estudiar-ne la interacció, ja que pot ser una peça clau per entendre la química del citrat de ferro. La pregunta a respondre en aquest punt és per què l'ió fèrric interacciona millor amb un grup hidroxil en lloc d'un grup carboxílic.

S'han proposat diferents models de sistemes, fins que aquests han convergit cap als models I i II. En el model I, el grup hidroxil, juntament amb dos carboxílics, formaven una interacció amb el ferro, mentre que en el model II les interaccions eren entre el ferro i tres grups carboxílics.

El criteri per triar la disposició més favorable ha tingut en compte tant l'energia dels sistemes com la distribució i compartició dels electrons entre el citrat i l'ió fèrric. Com més electrons compartits entre dos àtoms més forta serà la interacció. Per començar, s'ha fet servir la magnitud de l'energia de la interacció ( $\Delta E$ ) com a mesura de la facilitat de la unió entre el citrat i l'ió.

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - (E_{\text{ió}} + E_{\text{ligand}}) \quad (2)$$

$$\Delta E_{\text{I}} = -2021,82678775 - [-757,855322904 + (-1261,26931469)] = -2,702150156 \text{ Ha}$$

$$\Delta E_{\text{II}} = -2021,75269022 - [-757,943827407 + (-1261,26931469)] = -2,539548123 \text{ Ha}$$

D'aquest primer estudi energ3tic, se'n pot extreure que el model I 3s m3s estable en tant que hi ha un increment d'energia major en enllaçar-se l'io. Dit d'una altra manera: la interacci3 3s m3s favorable.

A continuaci3, s'ha mesurat la densitat electr3nica i el compartiment d'electrons entre els 3toms (ordre d'enllaç), ja que una elevada compartici3 electr3nica entre dos enllaços 3s indicador d'una forta interacci3 i de la formaci3 d'un enllaç covalent. Per a aquest aspecte s'ha fet servir el programa apostar-3D (versi3 1.0), programa desenvolupat a la Universitat de Girona pel Dr. Eloi Ramos-C3rdoba i el Dr. Pedro Salvador.

En el model I (vegeu Figura 12), l'io f3rric ha format tres enllaços amb tres ox3gens: compartint 1,090 electrons, 1,011 i 1,085 (grup hidroxil). L'3ltim d'aquests ox3gens ha compartit 0,812 electrons amb el carboni amb el qual estava unit i ha debilitat la seva unio amb l'hidrogen, compartint ara uns 0,105 electrons. Aquest hidrogen s'ha enllaçat a l'oxigen d'un grup carbox3lic a l'inici de la cadena, amb una interacci3 de 0,564 electrons. Aix3 ha perm3s la localitzaci3 de la c3rrega en aquest extrem de cadena, ja que s'ha protonat de nou. De fet, aquesta conformaci3 recorda l'oxidaci3 del citrat per convertir-se en isocitrat dins del cicle de Krebs. 3s especialment rellevant que tingui similituds amb una reacci3 qu3mica que proporciona energia.

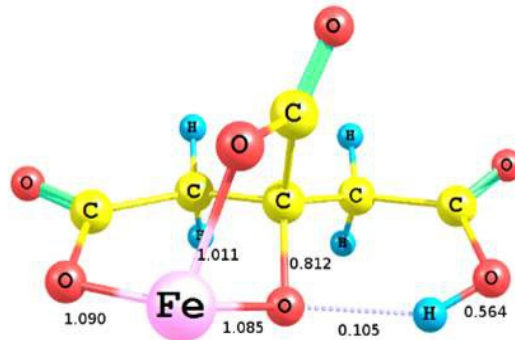


Fig. 12: Vista del model I. Els electrons compartits per alguns 3toms s3n indicats. Realitzaci3 pr3pia.

En el model II (vegeu Figura 13), l'io f3rric comparteix 0,932, 0,788 i 0,646 electrons amb els ox3gens del citrat (2,4 en total, xifra menor als 3,2 compartits en el model I). L'oxigen del grup hidroxil forma un enllaç de 0,853 electrons amb el carboni i de 0,583 amb l'hidrogen. Aquest hidrogen forma una interacci3 de 0,071 amb un oxigen de final de cadena, que comparteix 1,140 electrons amb el carboni que est3 unit i localitza la c3rrega en el grup carbox3lic.

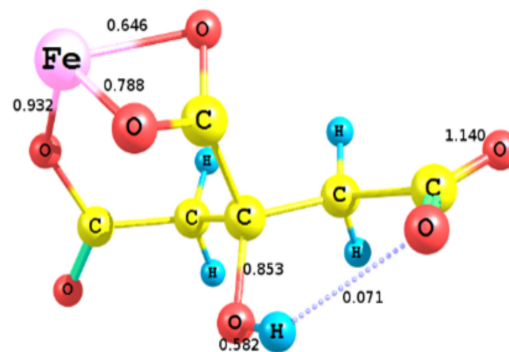


Fig. 13: Vista del model II. Els electrons compartits per alguns 3toms s3n indicats. Realitzaci3 pr3pia.

Veiem com la interacció entre l'ió metàl·lic i el grup hidroxil en el model I permet localitzar la càrrega millor, i les interaccions amb el  $Fe^{3+}$  són més fortes. És per aquest motiu que s'ha raonat que el model I és la forma més estable del monòmer de citrat fèrric. Aquest model posa de rellevància les principals característiques del citrat per interaccionar fortament amb el ferro.

Per a una millor comprensió de com canvien les propietats químiques del citrat en unir-se amb el  $Fe^{3+}$  s'ha generat la Taula 2, que posa de manifest les càrregues elèctriques dels àtoms d'ambdós complexos.

Número	Àtom	Càrrega del citrat	Càrrega del citrat fèrric
1	C	0,534	0,631
2	C	-0,362	-0,375
3	C	0,296	0,137
4	C	-0,326	-0,403
5	C	0,505	0,607
6	C	0,530	0,688
7	H	0,099	0,214
8	H	0,048	0,209
9	H	0,087	0,210
10	H	0,034	0,189
11	H	0,384	0,445
12	O	-0,698	-0,406
13	O	-0,655	-0,581
14	O	-0,718	-0,590
15	O	-0,651	-0,436
16	O	-0,700	-0,416
17	O	-0,672	-0,591
18	O (OH)	-0,733	-0,627
19	Fe	3,000	1,094

Taula 2: Comparació de la càrrega elèctrica dels àtoms de citrat i de citrat fèrric (model I). El nombre assignat a cada àtom és arbitrari.



El principal canvi es troba a l'ió feric, que passa de tenir una càrrega de 3,000 en estat lliure a una de 1,094 electrons, ja que el citrat actua cedint dos electrons a  $Fe^{3+}$ . s significatiu que tots els oxígens, grup hidroxil incls, hagin passat a tenir una càrrega menys negativa gràcies a la interaccio amb el  $Fe^{3+}$ .

Ninh Pham (2008) [26] i Silva (2009) [27] van proposar que la forma més rellevant en les relacions de concentracio, en la temperatura i en el pH de la sang humana és el dímer de citrat  $[Fe(Cit)_2]^{5-}$ . No obstant aixo, l'estructura d'aquesta forma és molt variable, de manera que s'han generat dos models computacionals en funcio de propostes de Silva (Figura 14, molècules 1 i 2).

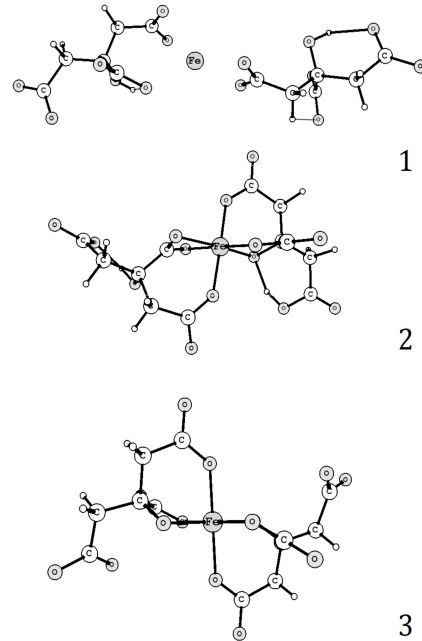


Fig. 14: Vista dels tres models de  $[Fe(Cit)_2]^{5-}$ . Els dos primers són teòrics i el tercer prové d'una estructura experimental. Realitzacio pròpia.

També s'ha fet servir l'estructura experimental obtinguda mitjançant la difraccio de raigs X de Matzapetakis (1998) [28] com a punt de partida per a una optimitzacio computacional (Figura 14, molècula 3), que finalment s'ha usat com a referent per als càlculs de l'apartat següent.

### 3.4. Estudi de la solvatacio del complex

L'estudi de la solvatacio del complex s d'una gran importància per veure si les estructures teòriques obtingudes també es complirien en un medi aquós com és el plasma sanguini. S'han estudiat les situacions següents:

- L'ió feric en un entorn aquós.
- El complex  $[Fe(Cit)_2]^{5-}$  en la seva estructura cristal·logràfica.

L'entorn aquós de l'ió feric s'ha simulat amb sis molècules d'aigua. La rao d'aixo s que la disposicio més comuna del ferro s octaèdrica.

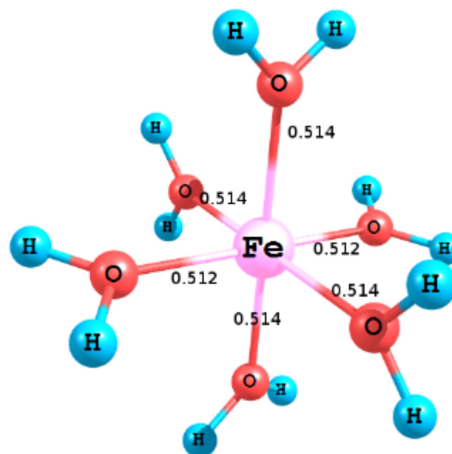


Fig. 15: Vista de l'estructura i la comparticio electrònica de l'ió feric en entorn aquós. Realitzacio pròpia.

La Taula 3 recull els electrons compartits en les sis interaccions del  $\text{Fe}^{3+}$  amb els seus respectius lligands en ambdós casos.

Interacció (dímer experimental)	Interacció ( $\text{Fe}^{3+}$ solvatat)
0,418	0,514
0,655 (grup hidroxil)	0,514
0,502	0,512
0,502	0,514
0,418	0,514
0,655 (grup hidroxil)	0,512
<b>3,150 (total)</b>	<b>3,080 (total)</b>

Taula 3: Comparació entre els electrons compartits per part de l'ió fèrric amb el dímer i amb l'entorn aquós.

Hi ha una compartició electrònica més gran entre el citrat i el ferro que no en el cas de l'entorn aquós amb l'ió (3,150 electrons destinats a formar l'enllaç amb el ferro en el primer cas). A més, les interaccions presentades pels grups hidroxils són d'una compartició electrònica especialment alta. És per aquest motiu que es pot afirmar que, en cas de tenir en un entorn aquós citrat i  $\text{Fe}^{3+}$ , les molècules d'aigua no impediran la interacció. És a dir, la interacció entre el  $\text{Fe}^{3+}$  i el citrat és més gran que no entre el  $\text{Fe}^{3+}$  i l'aigua (vegeu Figures 15 i 16).

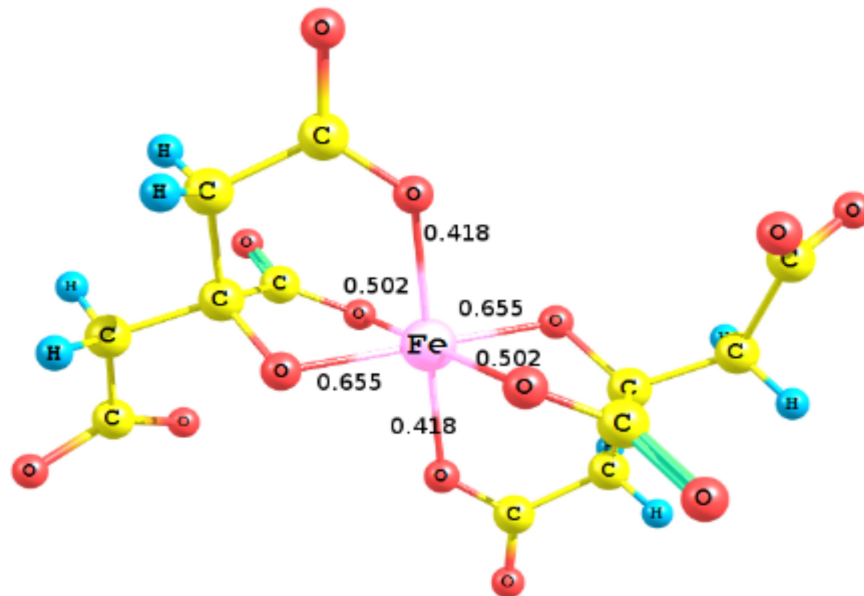


Fig. 16: Vista de l'estructura i la compartició electrònica del citrat fèrric. Realització pròpia.

S'han repetit els càlculs utilitzant també  $\text{Ca}^{2+}$  com a ió metàl·lic. Els resultats han estat força semblants, però amb unes interaccions significativament menors a les del

$\text{Fe}^{3+}$ . Podem concloure que el citrat és un lligand molt bo per al transport de ferro per raó de la seva gran interacció.

En aquest apartat s'han estudiat i justificat les propietats químiques del citrat de ferro, les quals el confereixen com el major lligand no proteic del ferro i el seu s com a medicament en el tractament de deficiències de ferro. No obstant això, s'han associat altes concentracions de citrat de ferro amb la deposició de ferro als teixits, fet que comporta toxicitat [29]. Per aquest motiu és necessari trobar molècules que millorin les prestacions del citrat en el tractament de malalties relacionades amb alteracions de ferro a la sang. Mitjançant les característiques d'aquest complex, es proposaran noves molècules teòriques per tal de transportar  $\text{Fe}^{3+}$  sense danyar l'organisme.

## 4. Realització de propostes

### 4.1. *Explicació general*

Un cop conegudes i estudiades les propietats del citrat fèrric, és el torn d'utilitzar el coneixement de les seves propietats amb una finalitat concreta. En aquest apartat es tractar de trobar complexos que o bé serveixin per evitar la complexació del  $\text{Fe}^{3+}$  amb l'àcid cítric o bé permetin un bon transport del  $\text{Fe}^{3+}$ .

Cal destacar que aquesta part del treball no tindrà en compte molts factors discutibles, com la interacció entre les diferents proteïnes i la molècula per transferir el  $\text{Fe}^{3+}$ , o si hi ha alguna altra molècula al nostre organisme capaç d'inhibir o interactuar amb el fàrmac proposat. Cal mantenir en perspectiva que, encara que l'estudi teòric suggerís una interacció, no ha de succeir el mateix en un entorn biològic, amb moltes variables que aquest estudi computacional no tindrà en compte. Per tal de validar les prediccions computacionals caldria realitzar assajos experimentals amb les molècules proposades.

En tots els casos s'ha realitzat una optimització computacional de la geometria de partida (mètode B3LYP, base 6-31G\*). S'ha comprovat la validesa dels resultats mitjançant els càlculs de freqncies.

### 4.2. *Interacció del citrat amb ions metllics*

El carcter quelant del citrat fa que l'estudi de la seva interacció amb diferents ions metllics tingui un especial interès. En primer lloc, es pot comparar l'afinitat del citrat amb altres ions per veure fins a quin punt és probable que un citrat s'uneixi

amb un ió fèrric en un entorn biològic. En segon lloc, un estudi d'ions metàl·lics sense presència al nostre organisme permet proposar substàncies d'ingestió externa que competirien amb el  $Fe^{3+}$  per a la unió amb el citrat.

S'han analitzat les interaccions entre el citrat i alguns dels ions amb més presència al nostre organisme ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  i, en menor mesura,  $Co^{3+}$  y  $Mn^{3+}$ ). A més, també s'han analitzat els ions metàl·lics  $Al^{3+}$  y  $Au^{3+}$  <sup>E</sup>. Aquests últims ions, tot i tenir una presència gairebé testimonial en la majoria dels entorns biològics, són de vegades usats com a principis actius en fàrmacs. S'han descartat els ions amb una càrrega elèctrica equivalent o superior a quatre perquè són molt poc donats en condicions biològiques, i podrien danyar l'entorn.

La geometria de partida ha consistit en el complex de citrat fèrric amb l'ió fèrric canviat per l'oportú. S'han optimitzat els complexos tenint en compte tant la càrrega com la multiplicitat de spin del sistema. S'ha calculat el valor de  $\Delta E$ , definit en l'anterior apartat.

Complex	Energia complex (Ha)	Energia citrat (Ha)	$\Delta E$ (Ha)
$Fe^{3+}$	-2021,827	-757,855	-2,702
$Ca^{2+}$	-1435,977	-757,946	-1,164
$Mg^{2+}$	-958,528	-757,930	-1,370
$K^+$	-1358,220	-758,002	-0,493
$Na^+$	-920,634	-758,000	-0,553
$Al^{3+}$	-1000,757	-757,870	-2,500
$Au^{3+}$	-893,553	-757,855	-2,352
$Co^{3+}$	-1909,105	-757,852	-2,838
$Mn^{3+}$	-1909,105	-757,852	-2,634

Taula 4: Energies de les interaccions del citrat amb els ions estudiats.

De la Taula 4 es poden extreure diferents conclusions. La primera és que, en general, no s'han observat interaccions prou fortes en un entorn biològic com per competir amb la unió del citrat amb l'ió fèrric. La pràcticament única excepció en aquest sentit és la interacció amb el cobalt ( $\Delta E = -2,838$  Ha), que presenta fins i tot una major afinitat amb el citrat. Aquesta dada és d'una gran rellevància, ja que ratifica el paper essencial del citrat com a transport no proteic del  $Fe^{3+}$ .

<sup>E</sup> El citrat d'or (III) és utilitzat com a complex per a la síntesi de nanopartícules d'or [30].

Una altra conclusió seria que els ions amb una càrrega elèctrica equivalent a tres s que presenten una interacció forta. La presència d'aquests ions al nostre organisme competiria amb la funció del citrat com a transport de  $\text{Fe}^{3+}$ . Les possibilitats que aquests ions ens podrien oferir són, a falta d'un estudi que pugui aportar ms informació, il·limitades; podrien servir tant com a substància txica que inhibeixi la producció d'energia mitjançant el cicle de Krebs amb la seva uno al citrat, com per alliberar els ions fèrrics del citrat, estimulant o bé el transport proteic de  $\text{Fe}^{3+}$  o bé la seva deposició en teixits. També cal tenir en compte que potser aquesta molècula entri a l'interior de les cèl·lules i fins i tot de les mitocòndries, fet que podria tenir unes conseqüencies indesitjables, produint una elevada toxicitat. Per tant, és complicat no extreure'n cap aplicació concreta, i més sense conèixer les interaccions amb la resta del metabolisme. Tot i aix, és interessant saber que aquests ions s'unirien amb el citrat i es podrien alliberar els ions fèrrics, ions que potser podrien servir per restablir nivells de ferro, sintetitzant clústers  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  necessaris per al metabolisme.

#### **4.3. Molècules transportadores de ferro**

Si bé la funció del punt anterior era trobar un i que interaccions ms fortament amb el citrat, l'objectiu d'aquest punt consistir a trobar una molècula que interaccioni d'una manera més forta que el citrat amb el  $\text{Fe}^{3+}$ .

Aquesta molècula podria constituir una interessant via d'investigació, ja que possiblement no depositaria amb tanta facilitat el ferro als teixits dels òrgans, sinó que el seguiria transportant fins a arribar a una proteïna. Les deposicions de ferro poden associar-se a baixes energies d'interacció o, fins i tot, al fet que el citrat tingui un carcter molt polar a causa dels grups carboxílics i l'hidroxil, que li permeten interaccionar amb altres molècules. s per aix que s'han intentat proposar molècules que tinguin un carcter menys polar o que presentin unes interaccions més fortes amb l'i fèrric.

Les molècules estudiades o bé s'han esmentat en publicacions anteriors com a possibles lligands del  $\text{Fe}^{3+}$  en medis biològics o bé són d'elaboració pròpia per a aquest estudi. S'han dissenyat diferents molècules inspirades en els grups i propietats de l'àcid cítric, però intentant optimitzar els grups carboxílics i hidroxil amb la finalitat de presentar una interacció més forta.

Complex	Nombre d'electrons de coordinació del $Fe^{3+}$
Vibrioferrina [31]	3,733
Estructura X	3,579
Estructura XIII	3,549
Dímer de citrat (experimental)	3,378
Dímer d'acetat [22]	3,312
Estructura XI	3,306
Solvatat (6 $H_2O$ )	3,192

Taula 5: Nombre d'electrons de coordinació (electrons compartits entre ferro i lligand) de l'ió fèrric als diversos complexos estudiats.

Les molècules que s'han considerat més rellevants s'han anotat a la Taula 5 juntament amb el nombre d'electrons de coordinació dels ions fèrrics. A major nombre d'electrons compartits, més forta és la interacció amb el lligand, i millor transportadora de ferro és la molècula.

Les estructures X i XIII (vegeu Figures 17 i 18) han estat les dues molècules d'aportació pròpia que han resultat ser més estables, juntament amb un ió  $Fe^{3+}$ . La X incorporava un àtom de clor en lloc d'un oxigen en un grup carboxil, i el grup hidroxil s'havia desprotonat; la XIII incorporava un grup metil unit a un hidroxil en lloc d'un grup carboxil. Evitant els grups carboxil i potenciant els hidroxil, podem obtenir una molècula que presenti una major interacció i sigui menys polar, possiblement millorant les prestacions del citrat com a lligand i fàrmac.

S'han provat les estructures de la vibrioferrina i l'acetat, ja que són importants lligands del ferro a organismes diferents de l'humà, com per exemple, els bacteris. Especialment remarcable és la interacció de la vibrioferrina (vegeu Figura 19), molt superior a la de la resta de molècules; també és important el fet que es tracti de la interacció d'una única molècula, a diferència dels altres complexos que es coordinen amb el ferro mitjançant dímers. Això és molt interessant ja que redueix la polaritat i molt probablement tingui una tendència menor a dipositar als teixits. És per això que la vibrioferrina podria ser un bon punt de partida per al disseny de nous fàrmacs que aportin ferro a l'organisme.

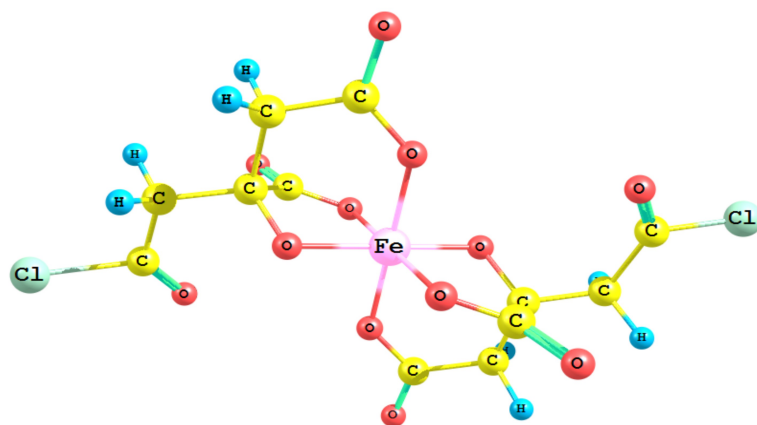


Fig. 17: Aspecte de l'estructura X. Realitzaci3 pr3pia.

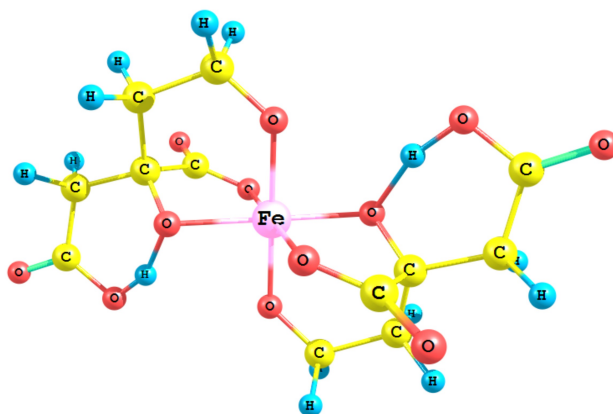


Fig. 18: Aspecte de l'estructura XIII. Realitzaci3 pr3pia.

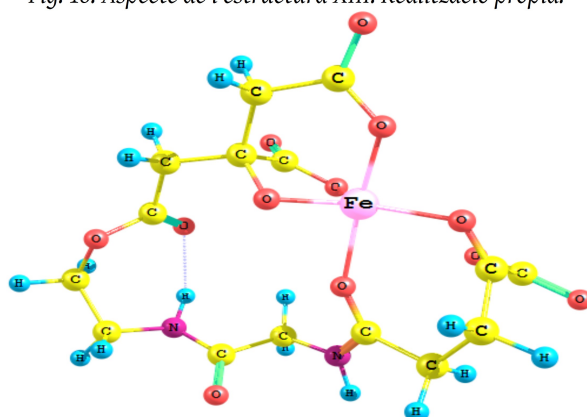


Fig. 19: Aspecte de la vibrioferrina. Realitzaci3 pr3pia.

## **5. Conclusions i discussió**

Aquest treball ha estudiat les vies més importants de regulació del ferro a l'organisme humà. S'ha optat per tractar tant els mecanismes de regulació proteics com els no proteics, amb la finalitat d'aportar noves perspectives de com podria tractar-se el cas d'un nivell inadequat de ferro.

En primer lloc, s'ha realitzat un estudi de la relació entre la proteïna aconitasa i la IRP1 a través de simulacions moleculars. Aquest estudi computacional és la primera evidència directa, al marge de les estructures cristal·logràfiques obtingudes experimentalment, que hi ha un mecanisme de canvi de conformació que connecta l'aconitasa amb la IRP1. Per tant, s'ha mostrat que l'aconitasa pot realitzar dues funcions: la isomerització del citrat, important per a l'obtenció d'energia, i la regulació dels nivells de ferro a la sang. Aquests resultats han confirmat una important hipòtesi científica.

Especialment interessant és el paper que exerceix el clúster Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> en el procés de canvi de conformació de l'aconitasa. Les dades recollides parlen d'una dependència de l'aconitasa en ell, i la seva absència provoca el canvi de conformació observat. S'han de realitzar més estudis teòrics per tenir una major certesa i, en la mesura que sigui possible, utilitzar l'experimentació, però aquesta confirmació plantejaria la possibilitat de tractar una elevada concentració de ferro en un organisme humà mitjançant una major síntesi de clústers de ferro i sofre. D'aquesta manera, s'aconseguiria disminuir la inhibició de ferritina, i es procediria a l'emmagatzematge de ferro. Aquesta via d'investigació és molt prometedora, i vull manifestar el meu interès que s'investigui la síntesi biològica d'aquests clústers, que actualment són un important objecte d'estudi.

La segona part d'aquest treball ha estat la que ha tractat el transport de ferro per part de molècules no proteiques. L'estudi del citrat de ferro ha permès comprendre el perquè del citrat com a lligand principal, compost que monopolitza aquest paper a l'organisme humà. Les simulacions computacionals han generat noves pistes sobre la importància dels grups carboxílics i, especialment, del grup hidroxil del citrat, que es planteja com un dels factors clau que constitueixen el citrat com el major lligand no proteic.

Aquestes informacions han estat d'una gran utilitat a l'hora de dissenyar una sèrie de possibles fàrmacs per transportar el ferro. S'han aconseguit interaccions més fortes, i fins i tot s'han proposat molècules d'una menor polaritat, presents en medis biològics. Per les fortes interaccions que presenta amb el ferro, la possibilitat de sintetitzar amb microorganismes i la seva presència en medis biològics, la



vibrioferriina podria ser una bona alternativa als actuals f3rmacs, ja sigui per aportar ions f3rriics d'una forma no t3xica com per prevenir la deposici3 de ferro als teixits, en el cas d'una concentraci3 elevada. Per tant, la seva acci3 dins dels medis biol3gics hauria de ser investigada m3s a fons.

En resum, els resultats obtinguts en els estudis te3rics d'aquest treball indiquen que s'han de plantejar nous punts de vista per millorar el tractament d'un nivell adequat de ferro a l'organisme. 3s per aix3 que la investigaci3 ha de prosseguir, i les eines computacionals poden ser claus per poder simular i predir les interaccions de les biomol3cules o els f3rmacs involucrats en la regulaci3 del ferro.

## 6. Conceptes clau

**Àcid cítric** – molècula orgànica amb participació en el cicle de Krebs. Està formada per tres grups carboxil i un hidroxil.

**Aconitasa** – proteïna que s'encarrega de la isomerització del citrat en isocitrat en el cicle de Krebs.

**Anèmia** – disminució de la concentració d'hemoglobina a la sang. La seva causa principal és la baixa concentració de ferro.

**Cicle de Krebs** – successió d'unes deu reaccions encadenades donades en la matriu dels mitocondris. La seva importància és vital als organismes, ja que permet generar energia (obté molècules ATP).

**Clúster** – en química, petita associació de partícules (entre 3 i  $3 \cdot 10^7$ ). En el món de la informàtica, agrupació d'ordinadors per obtenir més poder computacional.

**Dinàmica molecular** – tècnica de química computacional usada per descriure el moviment de les molècules, especialment les proteïnes, en termes de física clàssica.

**Energia d'interacció** – canvi d'energia d'un complex interaccionant amb un altre respecte a l'energia que tenen aquests dos complexos per separat. Com més negatiu sigui el valor de l'energia, major serà la interacció.

**Homeòstasi** – capacitat del metabolisme de mantenir una condició inte estable.

**ARNm** – molècula d'ARN que serveix de model per a la síntesi d'una proteïna als ribosomes.

**Non-transferrin bound iron** – tota forma o complex que assumeixi el ferro quan es troba al nostre organisme sense estar interaccionant amb una proteïna.

**Nombre d'electrons de coordinació** – nombre d'electrons que un àtom comporti amb els altres. Aquesta magnitud pot ser un bon indicador de la interacció d'un complex amb un altre.

**Optimització** – mètode computacional que permet buscar la geometria tridimensional més estable o l'estat d'una menor energia d'una molècula.

**Ordre d'enllaç** – nombre d'electrons que un àtom comparteix amb un altre.

## 7. Referències bibliogràfiques

- (1) R. Casiday i R. Frey, *Iron Use and Storage in the Body*, Departament de Química de la Universitat de Washington, 2007.
- (2) T. Vos et al, *Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*, *The Lancet*, 380, 2163–2196, 2012.
- (3) R. Berkow, *Iron Overload/Hemochromatosis*, *The Merck Manual*, The American Hemochromatosis Society, Edició 16a, 1992.
- (4) J. Dupuy, A. Volbeda, P. Carpentier, C. Dault, J. Moulis i J. C. Fontecilla-Camps, *Crystal Structure of Human Iron Regulatory Protein 1 as Cytosolic Aconitase*, *Structure*, 14, 129–139, 2006.
- (5) K. Volz, *The functional duality of iron regulatory protein 1*, *Current Opinion in Structural Biology*, ScienceDirect, 18, 106–111, 2008.
- (6) A. J. Busti, D. S. Lehew, B. J. Daves i G. C. McKeever, *What is the mechanism by which histamine-2 receptor antagonists (H2RA) decrease the absorption (or bioavailability) of oral iron replacement in patients with iron deficiency anemia?*, *PW Drug Interact Newsletter*, 44, 1–5, 2009.
- (7) J.C. Aster, *The Hematopoietic and Lymphoid System*, Saunders Elsevier, 435–437, 2007.
- (8) P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, *Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin*, *Joul of Biological Chemistry*, 253, 1930–1937, 1978.
- (9) C. Hersko, G. Graham, G. W. Bates i E. A. Rachmilewitz, *Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity*, *Haematol*, 40, 253–263, 1978.
- (10) P. Brissot, M. Ropert, C. Le Lan i O. Loral, *Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 403–410, 2012.
- (11) E. C. Theil, *Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms*, *Annual Review of Biochemistry*, 56, 289–315, 1987.
- (12) S. C. Andrews, P. Arosio, W. Bottke, J. F. Briat, M. von Darl, P. M. Harrison, J. P. Laulhre, S. Levi, S. Lobreaux i S. J. Yewdall, *Structure, function, and evolution of ferritins*, *Joul of Inorganic Biochemistry*, 47, 161–174, 1992.
- (13) A. T. Hadfield, *The Double Life of Aconitase*, *Structure*, 14, 2–4, 2006.
- (14) W. E. Walden, A. I. Selezneva, J. Dupuy, A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, E. C. Theil i K. Volz, *Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 complexed with Ferritin IRE-*, *Science*, 314, 1903–1907, 2006.

- (15) T. A. Rouault, *The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease*, Nature Chemical Biology, 8, 406-414, 2006.
- (16) T. A. Rouault i W. Tong, *Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis*, Nature Reviews on Molecular Cell Biology, 6, 345-351, 2006.
- (17) R. Lill, *Function and biogenesis of iron-sulphur proteins*, Nature, 460, 831-838, 2009.
- (18) S. J. Lloyd, H. Lauble, G. S. Prasad i C. D. Stout, *The mechanism of aconitase:1.8 resolution crystal structure of the S642a: citrate complex*, Protein Science, 8, 2655-2662, 1999.
- (19) K. Volz, A. I. Selezneva i W. E. Walden, *The role of stem-loop bend angle in iron-responsive element recognition by iron regulatory protein 1*. No publicat, pot consultar-se a <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3SN2>
- (20) F. Mochel i R. G. Haller, *Myopathy with Deficiency of ISCU*, GeneReviews, 2011.
- (21) B. J. Alder i T. E. Wainwright, *Studies in Molecular Dynamics. I. General Method*, Joul of Chemical Physics, 31, 459, 1959.
- (22) M. Grootveld, J. D. Bell, B. Halliwell, O. I. Aruoma, A. Bomford i P. J. Sadler, *Non-transferrin-bound iron in plasma or serum from patients with idiopathic hemochromatosis. Characterization by high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy*, Joul of Biological Chemistry, 15, 4417-4422, 1989.
- (23) G. Block, S. Fishbane, S. Shemesh, A. Sharma, M. Wolf i G. Chertow, *A double-blind placebo controlled randomized trial of ferric citrate coordination complex for the treatment of iron-deficiency anemia and reduction of serum phosphate in patients with non-dialysis dependent chronic kidney disease*, ERA-EDTA Congress, 2014. La notícia de l'aprovació pot consultar-se a <http://www.medscape.com/viewarticle/831211>
- (24) I. Gauthier-Luneau, C. Merle, D. Phanon, C. Lebrun, F. Biaso, G. Serratrice i J. L. Pierre, *New Trends in the Chemistry of Iron(III) Citrate Complexes: Correlations between X-ray Structures and Solution Species Probed by Electrospray Mass Spectrometry and Kinetics of Iron Uptake from Citrate by Iron Chelators*, Chemistry- A European Joul, 11, 2207-2219, 2005.
- (25) E. Ahlstrand, D. Spangberg, K. Hermansson i R. Friedman, *Interaction energies between metal ions (Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>) and biologically relevant ligands*, Intetional Joul of Quantum Chemistry, 113, 2554-2562, 2013.
- (26) A. Ninh Pham i T. D. Waite, *Oxygenation of Fe in the Presence of Citrate in Aqueous Solutions at pH 6.0-8.0 and 25 °C: Interpretation from an Fe/Citrate Speciation Perspective*, Joul of Physical Chemistry, 112, 643-651, 2008.
- (27) A. M. N. Silva, X. Kong, M. C. Parkin, R. Cammack i R. C. Hider, *Iron(iii) citrate speciation in aqueous solution*, The Royal Society of Chemistry, Dalton Transactions, 8616-8625, 2009.

- (28) M. Matzapetakis, C. P. Raptopoulou, A. Tsohos, V. Papaefthymiou, N. Moon i A. Salifoglou, *Synthesis, spectroscopic and structural characterization of the first mononuclear, water soluble iron-citrate complex*, Joul of the American Chemical Society, 120, 13266-13267, 1998.
- (29) O. S. Chen, S. Hemenway i J. Kaplan, *Genetic analysis of iron citrate toxicity in yeast: implications for mammalian iron homeostasis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 99, 16922-16927, 2002.
- (30) J. Park i J. S. Schumaker-Parry, *Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles*, Joul of the American Chemical Society, 136, 1907-1921, 2014.
- (31) J. Cheung, M. E. P. Murphy i D. E. Heinrichs, *Discovery of an Iron-Regulated Citrate Synthase in Staphylococcus aureus*, Cell Press Chemistry & Biology, 19, 1568-1578, 2012.

## Apèndix

### A. Obtenció i aïllament de l'àcid cítric

#### A.1. Aïllament

S'han necessitat els materials següents:

- Espremedora de suc de llimona
- Dos gots de precipitats de 250 ml i dos de 100 mL
- Proveta de 100 ml
- Dues pipetes de Pasteur
- Tamís
- Gasa de cotó
- Embut
- Agitador magnètic
- Espàtula
- Termòmetre
- Disc cristal·litzador
- Paper de filtre
- Vareta de vidre
- Matràs Kitasato
- Càmera d'escalfar a 70°C
- Embut Büchner

Els reactius han estat dues llimones, aigua desionitzada, una dissolució de  $NH_3$  (25% en massa), una dissolució de  $CaCl_2$  (1 M), Amberlite® I2-120  $H^+$  i paper universal indicador del pH.

- S'ha obtingut el suc de llimona amb l'espumadora. S'ha posat la gasa de cotó al tamisat i s'ha filtrat el suc de la polpa i altres components, fins que s'han obtingut uns 100 ml de suc.

- Se li ha afegit la dissoluci3 de  $\text{NH}_3$  al suc de llimona a la vegada que es removia la barreja. S'ha aturat un cop hi ha aparegut un color groc fosc (que ens indica un pH al voltant d'11).



Fig. 20: D'esquerra a dreta, veiem els tres primers passos del proc3s experimental. A l'esquerra, el suc de llimona filtrat. Al centre, el suc de llimona mostrant cert car3cter b3sic despr3s de l'addici3 de  $\text{NH}_3$ . A la dreta, es recull el citrat c3lcic mitjan3ant la filtraci3. Realitzaci3 pr3pia.

- S'han afegit 70 mL de la dissoluci3 de  $\text{CaCl}_2$  i s'ha escalfat amb l'agitador magn3tic durant uns vuit minuts a  $70^\circ\text{C}$ . S'ha filtrat la soluci3 a trav3s de l'embut de B3chner. El precipitat 3s citrat de calci (la massa obtinguda ha estat de 15,46 g). Dos grams del precipitat s'han posat amb 20 mL d'aigua destil·lada. S'han afegit 26 g d'Amberlite® I2-120 H\* i s'ha agitat la barreja durant uns deu minuts.

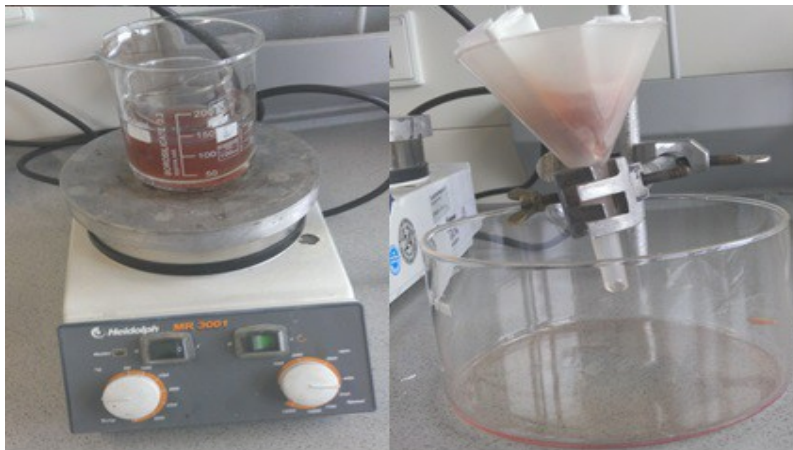
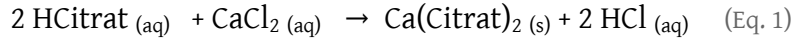


Fig. 21: Vista de dos passos del procediment experimental. A l'esquerra, el citrat c3lcic es barreja amb Amberlite® I2-120 H\*. A la dreta, la filtraci3 permet obtenir una dissoluci3 d'3cid c3tric, que cristal·litzar3. Realitzaci3 pr3pia.

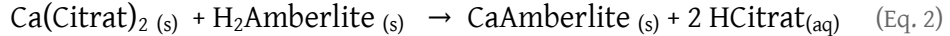
- S'ha filtrat la dissoluci3 en un cristal·litzador mitjan3ant un embut i paper de filtre. S'ha col·locat el cristal·litzador a la c3mera d'escalfar i s'han esperat dues hores i vint-i-tres minuts per tal que s'evapor3s l'aigua i l'3cid c3tric cristal·litz3s. El proc3s

d'aïllament de l'àcid cítric del suc de llimona s'ha basat en les reaccions representades per les equacions 1 i 2. L'addició de  $NH_3$  i l'escalfament de la dissolució han permès un medi més favorable per a la primera reacció.



L'Eq. 1 és un tant inexacta en tant que encara no sabem quants protons és capaç d'alliberar l'àcid cítric, sent la nomenclatura correcta només en el cas que el compost fos monopròtic. Mitjançant l'intercanvi d'ions entre l'àcid cítric i el clorur de calci s'ha obtingut citrat càlcic, que ha precipitat i s'ha aïllat amb una filtració.

La diferència entre el citrat càlcic i l'àcid cítric radica en els ions a què està unit el citrat. Per tant, el següent pas ha consistit a canviar els ions de calci per protons amb la finalitat d'obtenir l'àcid cítric. És per això que s'ha fet servir la matriu polimèrica Amberlite® I2-120  $H^+$  (amb àcid sulfònic de grup funcional). Aquest producte comercial és usat als laboratoris per la seva condició d'intercanviador d'ions, desprenent protons a l'entorn.



Seguint l'Eq. 2, com que l'àcid cítric és soluble en aigua i la macromolècula del gel polimèric no ho és causa de la seva gran grandària, mitjançant una filtració s'ha obtingut una dissolució en aigua de l'àcid cítric. El producte final, aïllat, s'ha format mitjançant la cristallització.

### **A.2. Comprovació de la puresa**

S'han comparat les cromatografies en capa fina del compost aïllat i d'una mostra comercial (EMPROVE® 99,99% de puresa).

La fase estacionària ha estat una placa de gel de sílica. La fase mòbil ha estat una barreja entre n-Butanol, àcid fòrmic i aigua en una proporció de 75:15:10 en massa. El procediment ha estat el següent:

– A uns dos centímetres d'un extrem del gel de sílica s'ha abocat una gota de la dissolució de l'àcid cítric aïllat, usant un capil·lar de vidre. A uns centímetres més a la seva dreta s'ha abocat la dissolució de la mostra comercial d'àcid cítric.



– Despr3s d'afegir la dissoluci3 de la fase m3bil en un got de precipitats de tal manera que s'ompli fins a l'altura d'un cent3metre, es posa el gel de s3lica verticalment, sense que les gotes de les mostres estiguin en contacte amb el dissolvent.

– Despr3s d'esperar unes dues hores, els resultats es poden veure o b3 amb llum ultraviolada o submergint el gel de s3lica en blau de bromotimol, ja que els components separats s3n incolor amb llum de l'espectre visible.

La Figura 22 ofereix una vista dels resultats d'aquesta cromatografia. Es pot observar com la part corresponent a la de l'3cid c3tric a3llat experimentalment ofereix una t3nue transpar3ncia, consistent en la dispersi3 d'impureses. No obstant aix3, cal destacar que



Fig. 22: Resultats de la cromatografia en capa fina. Realitzaci3 pr3pia.

aquesta t3cnica qualitativa es pot veure afectada f3cilment per errors experimentals, ja que un petit fregament del gel de s3lica pot modificar els resultats. 3s per aix3 que es va decidir donar el pas a una t3cnica m3s precisa com ho 3 la cromatografia l3quida d'alta efic3cia (HPLC).

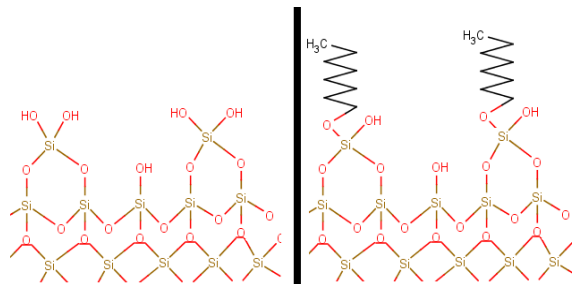


Fig. 23: A l'esquerra, imatge del medi de dispersi3 de la cromatografia en capa fina. A la dreta, imatge del medi de dispersi3 de la cromatografia d'alta efic3cia. Realitzaci3 pr3pia.

L'an3lisi s'ha realitzat en un aparell HPLC Agilent® 1100 Series. El Gr3fic 3 3 una mostra dels resultats obtinguts. Una integraci3 de la intensitat de senyal donada per unitat de temps ens mostra com la subst3ncia que ha abandonat el mitj3 de dispersi3 al voltant dels 2,727 minuts representa el 99,4% de l'3rea total. Aquests resultats confirmen l'excel·lent puresa de l'3cid c3tric a3llat, i justifiquen utilitzar la mostra comercial per als propers experiments.

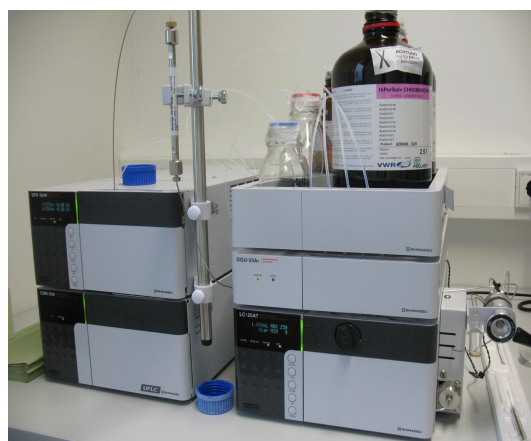
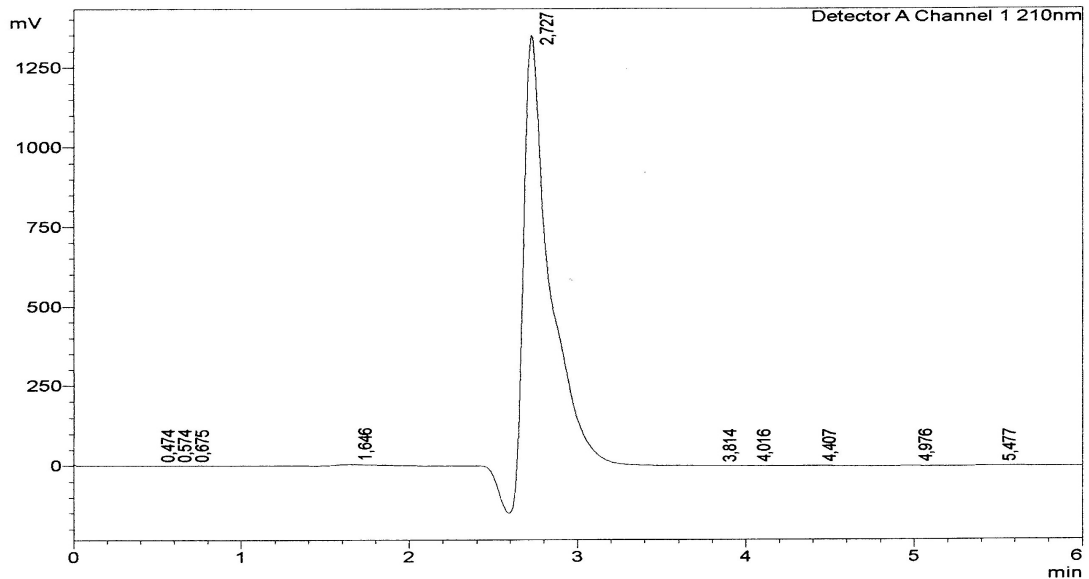


Fig. 24: Vista de l'aparell en el qual s'ha realitzat la cromatografia d'alta efic3cia. Realitzaci3 pr3pia.



Gràf. 3: Resultats de la cromatografia d'alta eficàcia. En aquest gràfic veiem la intensitat de corrent en funció del temps. Realització pròpia.

## B. Obtenció de la fórmula molecular de l'àcid cítric

### B.1. Introducció

En aquest apartat s'estudiarà experimentalment l'àcid cítric amb la finalitat d'obtenir-ne la fórmula molecular, i aquest serà el pas previ necessari per poder descriure les interaccions del citrat amb el  $\text{Fe}^{3+}$ . Les tècniques usades han estat l'anàlisi elemental, test de grups funcionals, espectrometria de masses, titració àcid-base, anàlisi d'una oxidació i espectrometria magnètica nuclear.

### B.2. Anàlisi elemental

Partint que l'àcid cítric és un compost orgànic sintetitzat pel nostre organisme, és possible reduir notablement la quantitat d'elements que el poden formar. Carboni, hidrogen, oxigen, nitrogen, sofre i fòsfor són els elements més importants -especialment els tres primers- i amb més presència a les biomolècules del nostre organisme.

L'anàlisi elemental permet, mitjançant la detecció dels productes d'una combustió, determinar la proporció de certs elements en una mostra estudiada. Els bioelements esmentats al paràgraf anterior són els estudiats normalment. En el cas de l'oxigen, en ser ell mateix reactiu de la combustió, la seva proporció no pot determinar-se directament.

S'han utilitzat les dades d'una an3lisi d'una mostra a3llada experimentalment d'3cid c3itric, mesurats el 24 de gener de 2011 amb un aparell Perkin Elmer® EA2400 s3rie II CHNS / O Analyzer.

Massa (mg)	N (mg)	C (mg)	S (mg)	H (mg)
3,850	0,000	1,310	0,011	0,180
3,952	0,000	1,350	0,008	0,190
% de N	% de C	% de S	% de H	% de O
0,009	34,180	0,289	4,678	60,844
0,005	34,110	0,202	4,786	60,897
<b>0,007</b>	<b>34,150</b>	<b>0,250</b>	<b>4,730</b>	<b>60,871</b>

Taula 6: Dades de l'an3lisi elemental. Els percentatges (en vermell) han estat calculats per a aquest treball.

A partir de la proporci3 centesimal en massa, i considerant els percentatges de sulfur i de nitrogen com a zero per la seva baixa concentraci3, podem arribar a la proporci3 de mols:

$$n = \frac{\text{massa}}{\text{massa molecular}}$$

$$n(C) : n(H) : n(O) = \frac{34,150}{12} : \frac{4,730}{1} : \frac{60,871}{16} = 3 : 5 : 4$$

Per tant, l'3cid c3itric t3 la f3rmula emp3rica  $(C_3H_5O_4)_n$ .

### B.3. Test de grups funcionals

Hi ha diversos tests que permeten identificar la pres3ncia d'un determinat grup funcional. S'han realitzat quatre tests diferents per tal de detectar la pres3ncia de grups carboxil, hidroxil, carbonil i 3ster, a m3s d'una prova per detectar insaturacions.

#### Test de BTB

El blau de bromotimol 3s un bon indicador del pH a la dissoluci3. Com que 3s un 3cid feble, la seva conformaci3 canvia en funci3 del medi. En un medi amb un pH inferior a 6 adopta un color groguenc, i el seu color 3s blau en un pH igual o superior a 7,6. Aquest fet permet con3ixer la pres3ncia de grups carbox3lics en una dissoluci3, sempre que no hi hagi un 3cid inorg3nic.

### Test d'hidròlisi de Rojahn

El principi del test d'hidròlisi és simple: si en la nostra dissolució hi ha un èster i l'escalfem, podem provocar la seva hidròlisi per obtenir un àcid carboxílic. Podem saber si s'ha format o no un grup carboxílic si hem afegit prèviament un indicador com la fenolftaleïna.

Després de posar en un tub d'assaig 1 mL de la substància estudiada, cal afegir 3 gotes d'una dissolució de fenolftaleïna i 1 mL d'etanol, que servirà per fer més espontània la reacció. Es va afegint gota a gota una dissolució 3 M de NaOH fins que observem un color rosaci a la dissolució. A continuació, es fa un bany Maria a uns 40°C. Si observem la desaparició del color a la dissolució, podem considerar que s'han format grups àcids.

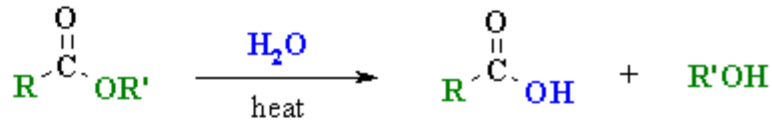


Fig. 25: Esquema de la reacció del test de la hidròlisi de Rojahn amb grups èster [32].

### Test DNPH

La 2,4-dinitrofenilhidracina és un compost que té una reacció de condensació amb molècules que inclouen grups carbonils. En aquesta reacció es formen una molècula d'aigua i una altra molècula més, la naturalesa depèn del reactiu o la substància estudiada. Aquesta molècula precipitarà i tindrà un color groguenc o taronja clar.

Després de posar dues gotes de la substància estudiada en un tub d'assaig juntament amb 1 mL d'DNPH, s'agita la dissolució. S'observa si es forma un precipitat o no.

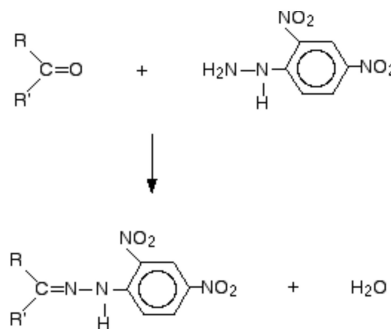


Fig. 26: Esquema de la reacció del test de DNPH amb grups carbonils [33].

### Test de nitrat d'amoni i ceri

Aquest test permet detectar grups hidroxil o alcohol. El nitrat d'amoni i ceri  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$  en la seva forma i3nica reacciona amb els grups hidroxil de tal manera que es formar3 un producte vermell.

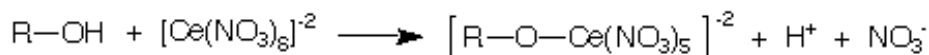


Fig. 27: Esquema de la reacci3 del test de nitrat d'amoni i ceri amb grups hidroxil [32].

Es posa 1 ml del nitrat d'amoni i ceri en un tub d'aigua juntament amb 5 gotes de la dissoluci3 estudiada i 2 mL d'aigua desionitzada. Es barreja la dissoluci3 i s'observa si hi apareix un canvi de color de groc a vermell.

### Test per als dobles enllaços

S'ha realitzat la prova del brom. Aquesta prova consisteix a fer reaccionar aquest element amb la mostra estudiada. Si el color taronja desapareix, aix3 vol dir que el brom ha reaccionat amb el compost. Com m3s gran 3s la insaturaci3 de la mol3cula, m3s f3cil 3s que reaccioni.

S'han omplert tres tubs d'assaig amb una dissoluci3 de  $\text{Br}_2$  2,8% en massa, i s'han posat respectivament unes gotes de dissolucions d'3cid c3tric, hexeno i hex3.

Tant la dissoluci3 d'3cid c3tric com la de hex3 van tenir un color ataronjat, contrastant amb la dissoluci3 transparent de hexeno. Podem concloure que no existeixen insaturacions a l'3cid c3tric.

	BTB	Hidròlisi	DNP	Nitrat d'amoni i ceri
Etanol	Blau	Rosa pàl·lid	Sense precipitat	<b>Vermell</b>
Acetona	Blau	Rosa pàl·lid	Precipitat	Transparent
Àcid acètic	<b>Groc</b>	Rosa pàl·lid	Sense precipitat	Transparent
Etil acetat	Blau	Transparent	Sense precipitat	Transparent
Substància aïllada	<b>Taronja-groguenc</b>	Rosa pàl·lid	Sense precipitat	<b>Vermell pàl·lid</b>
Àcid cítric (comercial)	<b>Groc</b>	Rosa pàl·lid	Sense precipitat	<b>Vermell</b>

Taula 7: Vista dels resultats dels tests per conèixer els grups funcionals. Els resultats positius són escrits en negreta.

Podem concloure que l'àcid cítric és un compost que té almenys un grup carboxílic i un alcohol.

#### B.4. Titració àcid-base

La titració àcid-base ha permès formular una hipòtesi sobre el nombre de grups carboxílics de l'àcid cítric. Dues titracions s'han realitzat: una primera amb la fenolftaleïna com a indicador i una segona amb un pH-metre.

S'han fet servir els següents materials:

- Dos gots de precipitats de 250 mL
- Tamís
- Gasa de cotó
- Espremedora de llimona
- Embut
- Proveta de 100 mL
- Matràs Erlenmeyer de 250 mL
- Bureta amb regulació

Els reactius ha estat aigua desionitzada, 10 mL d'una dissolució de 2,00 g d'àcid cítric a 100 ml d'aigua, dissolució de NaOH (0,1 M) i dissolució de fenolftaleïna ( $C_{20}H_{14}O_4$ ).



Fig. 28: Vista de la titració àcid-base una vegada la dissolució d'àcid cítric ha adquirit el to rosaci de la fenolftaleïna en medi bàsic. Realització pròpia.

El procediment ha estat el següent:

- S'ha omplert la proveta amb 10 mL de la dissolució i s'hi ha afegit aigua desionitzada. S'hi han afegit quatre gotes de la dissolució de fenolftaleïna.

- S'ha omplert la bureta amb la dissolució de NaOH, i s'ha decantat gota a gota a la dissolució del suc de llimona, a la vegada que s'agitava, fins que ha aparegut un to rosaci. S'ha anotat el volum de la dissolució de NaOH necessari per neutralitzar l'àcid cítric del suc i s'ha repetit el procés.



Fig. 29: Vista de la titració àcid-base amb el pH-metre. Realització pròpia.

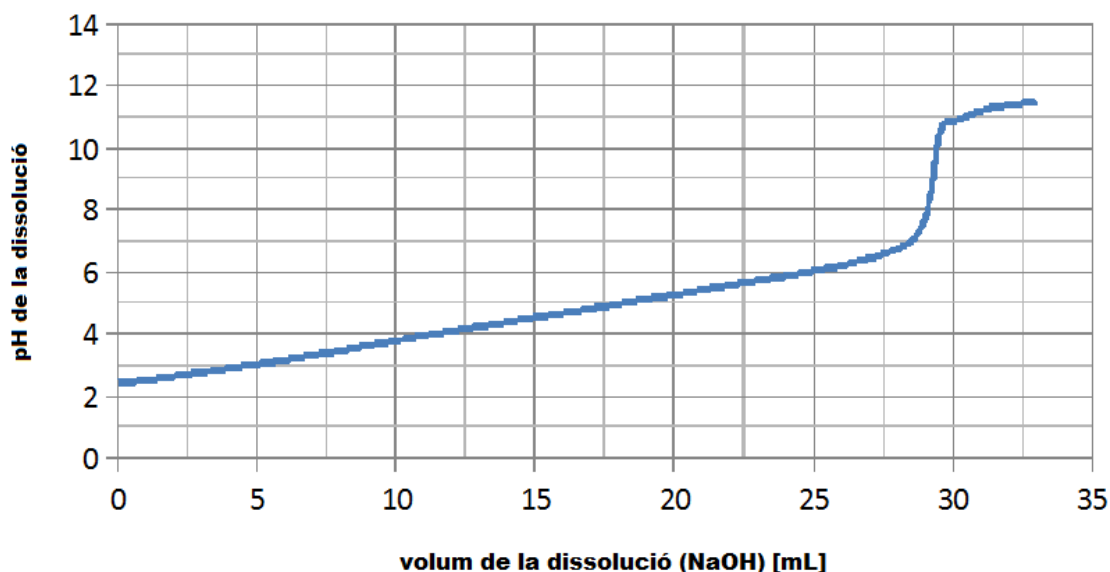
L'explicació de l'ús de fenolftaleïna ( $C_{20}H_{14}O_4$ ) com a indicador de pH és que es tracta d'una substància que és incolora en medi àcid, però el seu ió negatiu ( $C_{20}H_{12}O_4^{2-}$ ) és d'un to rosaci.

Així, quan la dissolució té aquest color, podem veure que s'han neutralitzat els àcids i el medi està passant a ser bàsic (pH entre 8 i 10).



En el cas de la titració amb pH-metre, no s'hi ha afegit la dissolució de fenolftaleïna. Els valors anotats procedents d'aquesta titració poden consultar-se al Gràfic 4.

El fet que només hi hagi un punt d'inflexió al Gràfic 4 és molt significatiu. Significa que només s'han després protons d'una energia de despreniment similar, descartant



Gràf. 4: Valor del pH de la dissolució en funció de l'addició de la dissolució de NaOH. Les dades s'han recollit amb el pH-metre. Realització pròpia.

la possibilitat que s'hagin trencat els grups hidroxil. A més, nega la possibilitat que hi hagi dos grups carboxil units al mateix carboni, ja que, si així fos, una vegada un protó s'hagués després d'un dels dos grups, l'altre hagués necessitat un entorn molt més bàsic per desprendre's. La raó d'això és que un carboni unit a dos grups carregats negativament és força inestable, i cal forçar aquesta situació.

A la primera titració s'han fet servir 28,5 mL de la dissolució per aconseguir el pH neutre. A la segona, 29 ml. El valor considerat ha estat la mitjana, que és de 28,75 ml. Aquest volum ha estat usat a la dissolució 0,1 M per neutralitzar la desena part d'una dissolució de 2 g d'àcid cítric. Per tant, per neutralitzar l'àcid cítric sencer hauríem usat  $2,88 \cdot 10^{-2}$  mols de NaOH. Seguint la fórmula del nombre de mols, si el compost fos monopròtic tindria aproximadament una massa molecular de 70 u (69,6). En el cas que fos dipròtic tindria una massa molecular de 140 u, i així successivament.

Segons la Taula 8, tant la titració com l'anàlisi elemental comparteixen el 210 i tots els seus múltiples com un possible valor de massa molecular. Per tant, de la titració d'àcid-base es desprèn que l'àcid cítric té almenys tres grups carboxílics.

Possible massa molecular segons la titració àcid-base (u)	Possible massa molecular segons l'anàlisi de C, H,N i S (u)
70 (1 grup carboxílic)	105
140 (2 grups carboxílics)	<b>210</b>
<b>210 (3 grups carboxílics)</b>	315
280 (4 grups carboxílics)	420
350 (5 grups carboxílics)	525

Taula 8: Comparació entre les hipotètiques masses moleculars de l'àcid cítric segons l'anàlisi elemental i segons els resultats de la titració àcid-base. En negreta, el primer valor compartit entre ambdós experiments, corresponent a les 210 unitats de massa molecular.

### B.5. Espectrometria de masses

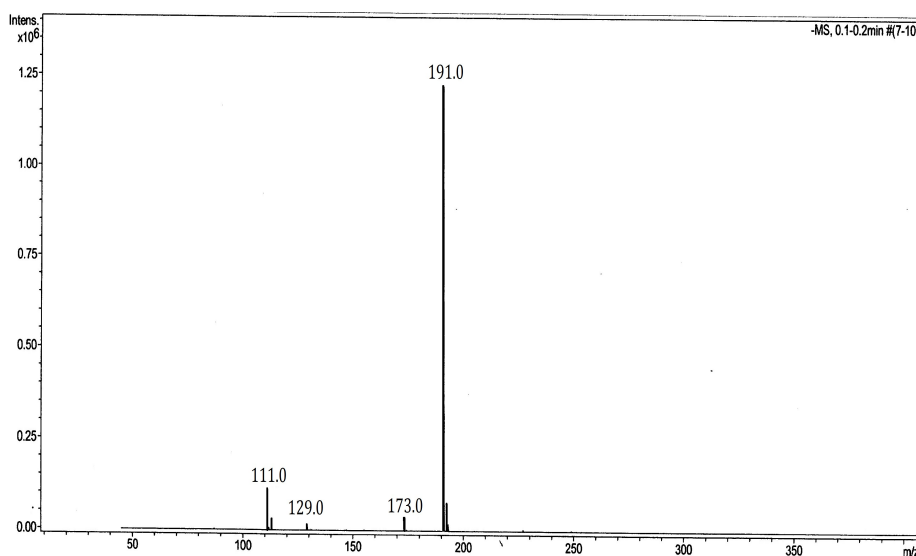
La tècnica de l'espectrometria de masses (MS) permet determinar la massa molecular d'ions. El seu principi consisteix a ionitzar la mostra estudiada, accelerar els ions amb un camp electrònic i separar-los en funció del seu pes molecular segons el seu desplaçament en un camp magnètic. Un analitzador de masses detectarà els diferents ions.

La ionització generalment s'aconsegueix mitjançant el bombardeig de la mostra amb electrons. No obstant això, com que difícilment l'àcid cítric passarà a l'estat gasós, caldrà utilitzar una tècnica diferent. Aquesta tècnica serà la ionització per



electrosprai (ESI), consistent a ficar una dissoluci3 de la subst3ncia en un petit capil·lar i sotmetre'l a una gran difer3ncia de potencial. La repulsi3 entre les part3cules carregades contr3riament fa que es formin gotes de la dissoluci3, i aix3 successivament. Un cop les gotes contenen nom3s un i3 molecular, el dissolvent s'evapora f3cilment, deixant a punt l'i3 molecular per ser accelerat amb el corrent el3ctric.

L'espectrometria de masses es va realitzar amb un model Bruker® microTOF-Q II en una aula habilitada del Departament de Qu3mica de la Universitat de G3ttingen. L'operari d'aquesta an3lisi va ser el Dr. Raphael K3rbel.



Gr3f. 5: Resultats de l'an3lisi de l'espectrometria de masses. Els pics en valor menors a 191 u tenen correspond3ncia amb fragments de l'3cid c3tric estudiat, com per exemple, la p3rdua de mol3cules d'aigua. Realitzaci3 pr3pia.

El Gr3fic 5 mostra els resultats de l'an3lisi. La intensitat de senyal m3s alta correspon amb un i3 de 191 o de pes molecular. Per tant, afegint el prot3 que s'ha despr3s del compost, el pes molecular de l'3cid c3tric 3s de 192 u.

Aquest fet pot contrastar amb l'an3lisi elemental del punt B.2., que indicava que el nostre compost t3 la forma de  $(C_3H_5O_4)_n$ , que 3s un m3ltiple de 105. Aquest fet s'explica perquè el compost estudiat en l'an3lisi elemental havia estat a3llat experimentalment, i, en canvi, la mostra comercial aqu3 estudiada, no. De fet, el compost a3llat 3s 3cid c3tric monohidratat (el compost  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$  t3 una massa molecular



Fig. 30: Vista de l'espectr3metre de masses ESI-TOF que va ser utilitzat per a l'an3lisi de l'3cid c3tric. Realitzaci3 pr3pia.

de 210 u, que és un múltiple de 105) perquè la cristal·lització s'ha realitzat a temperatura ambient.

A més, si bé en el punt anterior s'ha acceptat que l'àcid cítric té uns tres grups carboxílics, a partir de la nova fórmula molecular s'arriba a la conclusió que tindrà, com a molt, un grup hidroxil.

### B.6. Oxidació de l'àcid cítric

El producte d'una oxidació de l'àcid cítric donarà informació sobre la posició del grup hidroxil. Tal i com es veu a la Figura 31, els productes depenen de si el compost oxidat té un alcohol secundari o primari.

El material usat ha estat el següent:

- Agitador magnètic
- Matràs de 250 mL i un altre de 50 mL
- Adaptador de Claisen
- Campana de calefacció
- Condensador de Liebig
- Embut de goteig
- Termòmetre
- Tub de PVC
- Vas de precipitats
- Cilindre graduat de 50 mL
- Pipeta de Pasteur
- Vas de precipitats de 250 mL
- Ampolla de vidre

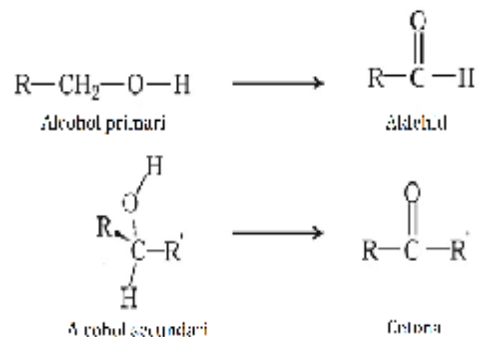


Fig. 31: Oxidació d'un alcohol primari i d'un de secundari. Realització pròpia.

Els reactius han estat la mostra comercial d'àcid cítric, una dissolució 1 M de  $H_2SO_4$ , aigua destil·lada, una dissolució 0,1 M de  $KMnO_4$  i una dissolució saturada de  $Ca(OH)_2$  (1,5 g/L). Per als tests s'han usat propanona, propionaldehid i el reactiu de Schiff.

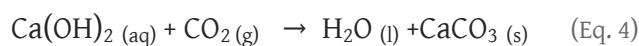
El procediment experimental ha estat el següent:

- S'han posat 10 g d'àcid cítric i 20 mL d'aigua desionitzada al matràs de 250 ml. Lentament, s'hi han afegit 10 mL de la dissolució de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. S'ha omplert l'embut de degoteig amb 40 mL de la dissolució de KMnO<sub>4</sub>, i s'ha posat la dissolució saturada de Ca(OH)<sub>2</sub> a l'ampolla de vidre.
- S'ha escalfat, amb la manta de calefacció, el matràs fins que el termòmetre arribés als 80°C. Llavors, s'ha dipositat la dissolució de KMnO<sub>4</sub>, vigilant que la temperatura no arribés als 95°C per evitar arribar al punt de vaporització de l'aigua.
- S'ha aturat la reacció un cop s'han obtingut uns 5 mL de destil·lat al matràs de 50 mL.



Fig. 32: Vista del muntatge experimental. Realització pròpia.

La reacció ha produït un líquid volàtil, un compost el punt d'ebullició del qual és baix. A més, observem que la dissolució de Ca(OH)<sub>2</sub> s'ha tot blanquinosa. Sabent que aquest color blanc té relació amb la insolubilitat del CaCO<sub>3</sub> a l'aigua, podem detectar la presència de CO<sub>2</sub> seguint la següent reacció:



Després de fer el test de DNPH, de BTB i de nitrat d'amoni i ceri (resultats positiu, negatiu i negatiu respectivament), els resultats ens indiquen la presència d'un grup carbonil i l'absència de grups carboxílic i hidroxil.

S'ha fet un test per poder saber si el producte de la reacció tenia un grup cetona o aldehyd. S'ha posat 1 ml del producte en un tub d'assaig juntament amb deu gotes del reactiu de Schiff, i s'ha repetit l'experiment usant acetona i propionaldehyd.

El test de Schiff és usat per detectar aldehyds. El reactiu, que és pararosanilina tractada amb àcid sulfurós, reacciona amb aldehyds per donar un producte brillant i vermell.

La dissolució de propionaldehyd, tal com era d'esperar, va canviar el seu color cap a un d'un to vermellós. En canvi, les dissolucions del producte de l'oxidació de l'àcid cítric com de l'acetona han seguit sent transparents. Per tant, el producte té almenys un grup cetona, i és molt probable que es tracti d'acetona en ser un líquid volàtil amb característiques semblants.

Conseqüentment, només hi ha una estructura possible en la qual l'alcohol sigui secundari. Les dades obtingudes fins al moment mitjançant l'experimentació són els següents:

- Té una massa molecular de 192 u.
- Té tres grups carboxílic i un hidroxil.
- El seu alcohol és secundari.
- No hi ha dos grups carboxil units al mateix carboni segons la corba de la titració.

Hi ha una única estructura que combini les dades anteriorment exposades.

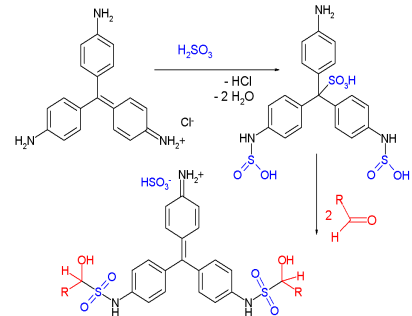


Fig. 33: Vista de la reacció entre el reactiu de Schiff i un aldehyd. [34]

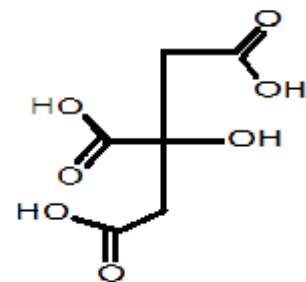


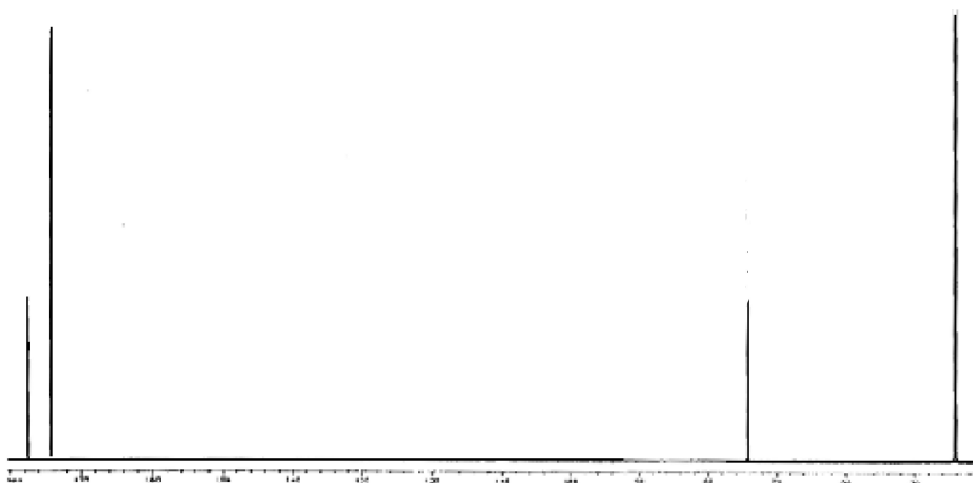
Fig. 34: Vista de l'única estructura possible de l'àcid cítric segons la nostra anàlisi experimental. Realització pròpia.

### B.7. Ressonància magnètica nuclear

Existeixen principalment dues anàlisis que permetin comprovar experimentalment l'estructura proposada: l'espectroscòpia vibracional i la ressonància magnètica nuclear. La primera permet conèixer les freqüències de les molècules i, conseqüentment, les energies dels enllaços. La segona proporciona una mesura de la densitat electrònica dels diferents àtoms mitjançant l'energia usada per canviar la seva polaritat en un camp magnètic. Quanta menor densitat electrònica, el camp

magn3tic t3 un efecte major sobre l'3tom, sent m3s energ3tic el proc3s d'invertir la seva polaritat.

Una resson3ncia magn3tica nuclear s'ha realitzat amb l'3cid c3tric al Departament de Qu3mica de la Universitat de G3ttingen amb un aparell Bruker® Ultrashield AVANCE III400. L'an3lisi va ser de  $^{13}\text{C}$ , aix3 que nom3s es van estudiar els carbonis.



Gràf. 6: Resultats de la resson3ncia magn3tica nuclear de l'3cid c3tric. En aquest gr3fic, s'hi indica la intensitat de senyal en funci3 de l'energia radiada per canviar la polaritat dels 3toms. Realitzaci3 pr3pia.

Per a una millor comprensi3 dels resultats, la Taula 9 exposa l'interval d'energia necess3ria per invertir la polaritat dels 3toms de certs grups funcionals. Veiem gr3cies a la Figura 35 que en l'3cid c3tric hi ha quatre tipus diferents d'3toms de carboni en funci3 de la seva densitat electr3nica.

Grup funcional	Desplaçament qu3mic $\delta$ [ppm]
RCH <sub>2</sub> R'	20 – 50
RCH <sub>2</sub> OR' o RCH <sub>2</sub> OH	50 – 90
RC(=O)OR'	155 – 180
RC(=O)H o RC(=O)R'	170 – 200
RCOOH	170 – 190

Taula 9: Desplaçament qu3mic en funci3 del grup funcional en una an3lisi de resson3ncia magn3tica nuclear del carboni-13. [35]

Dels sis 3toms de carboni, veiem que hi ha dues parelles que tenen el mateix entorn electr3nic entre ells. Aquests s3n els 3toms de color rosa i verd. El grup hidroxil enllaçat amb el carboni blau t3 una menor densitat electr3nica que els 3toms roses, i el mateix succeeix amb el grup carboxil vermell i els verds.

Així doncs, els dos primers pics de l'anàlisi (Gràfic 6) tenen correspondència amb grups carboxil. La intensitat del de la dreta és el doble que el de l'esquerra, ja que hi ha el doble de grups carboxil en un entorn sense grup hidroxil que amb grup hidroxil. El mateix succeeix amb els grups metil, ja que la intensitat és el doble en el bec amb una major densitat electrònica respecte a l'entorn amb una menor densitat electrònica, provocada en aquest cas pel grup hidroxil.

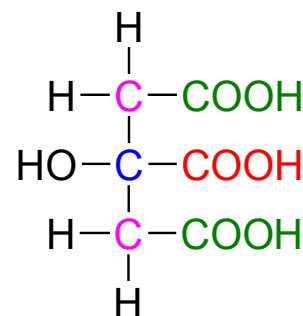


Fig. 35: Esquema dels diferents àtoms de carboni detectats per la ressonància magnètica nuclear. Realització pròpia.

Els resultats d'aquesta anàlisi confirmen en part l'estructura proposada en el punt anterior.

### B.8. Referències bibliogràfiques

- (32) S. Bienz, *General Practical Course in Chemistry*, Universitat de Zuric, 2014.
- (33) J. Clark, *Addition-elimination reactions of aldehydes and ketones*, ChemGuide, 2004. Pot consultar-se en [www.chemguide.co.uk/organicprops/carbonyls/addelim.html](http://www.chemguide.co.uk/organicprops/carbonyls/addelim.html)
- (34) R. D. Lillie, *Histochemical technique and practical histochemistry*, Blakinston, 2a Edició, 1954.
- (35) M. Hesse, 6-31G H. Meier y B. Zech, *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, Editorial Síntesis, 2a Edició, 2005.

### C. Exemple de càlcul computacional teòric

En aquest apartat s'ha posat l'exemple d'un càlcul computacional respecte a l'optimització de l'estructura de l'àcid cítric.

A. Un càlcul d'optimització prova diferents distribucions dels electrons d'una molècula per buscar la conformació més estable dels nuclis. Aquest càlcul pot trigar al voltant de tres dies en un clúster de 900 CPUs. En aquest treball s'ha usat el clúster Beta de la Universitat de Girona.

#### Exemple d'entrada:

```
module load gaussian/g09c01_pgi-10.1
g09 << eor > /users/gramirez/citric/acidcc.out
%nproc=2
# b3lyp/6-31G* opt
```

Title			
0 1			
6	-0.127912000	2.020503000	-0.306500000
6	-1.283076000	2.082648000	0.706704000
6	-2.518890000	1.363837000	0.100860000
8	-0.830995000	1.427967000	1.865029000
1	-0.831367320	2.096830654	2.575370056
6	-3.665203000	1.204284000	1.078553000
8	-4.296147011	2.101479140	1.598060518
8	-3.907619506	-0.098865284	1.341267220
1	-4.631236968	-0.116847260	1.996814784
6	1.097540000	2.773292000	0.172672000
8	2.146217794	2.266273431	0.502222894
8	0.872902351	4.105118295	0.237758828
1	1.697841778	4.503347655	0.575794698
6	-1.667663000	3.539331000	1.045449000
8	-1.798325000	3.970349000	2.163379000
8	-1.933700000	4.259314000	-0.073198000
1	-2.158573000	5.159014000	0.230604000
1	0.130616000	0.973321000	-0.482705000
1	-2.883571000	1.874802000	-0.795411000
1	-0.438412000	2.463141000	-1.259409000
1	-2.215734000	0.354100000	-0.204864000

**Fragment de sortida:**

[...]

SCF Done: E(RB3LYP) = -760.049982901 A.U. after 7 cycles

Convg = 0.5478D-08 -V/T = 2.0087

[...]

! Optimized Parameters !

! (Angstroms and Degrees) !

! Name	Definition	Value	Derivative Info.	!
! R1	R(1,2)	1.5379	-DE/DX = 0.0	!
! R2	R(1,10)	1.5159	-DE/DX = 0.0	!
! R3	R(1,18)	1.0929	-DE/DX = 0.0	!
! R4	R(1,20)	1.0956	-DE/DX = 0.0	!

#### D. Figures computacionals complementàries

En aquest apartat s'han posat les figures procedents de simulacions computacionals que s'han considerat més rellevants i no han estat incloses en els punts anteriors.

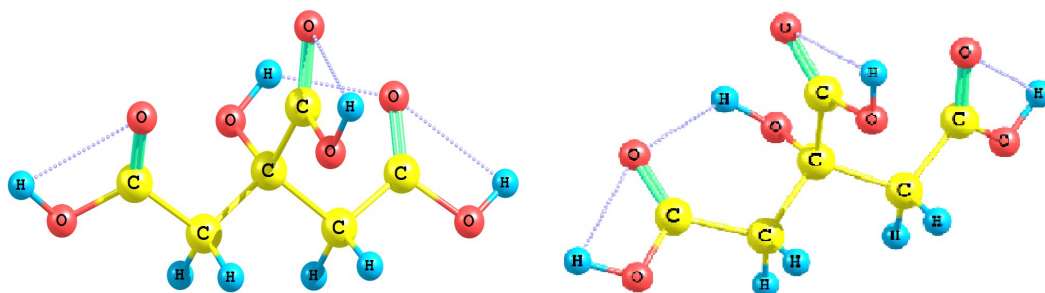


Fig. 36: A l'esquerra, l'àcid cítric teòric. A la dreta, l'àcid cítric experimental. Realització pròpia.

Complex	Energia complex (Ha)	Energia citrat (Ha)	$\Delta E$ (Ha)
$Fe^{3+}$ I	-2021,827	-757,855	-2,702
$Fe^{3+}$ II	-2021,753	-757,944	-2,540
$Mg^{2+}$ I	-958,528	-757,930	-1,370
$Mg^{2+}$ II	-958,490	-757,861	-1,402
$Na^+$ I	-920,634	-758,000	-0,553
$Na^+$ II	-920,615	-757,997	-0,537
$K^+$ I	-1358,220	-758,002	-0,493
$K^+$ II	-1358,207	-758,002	-0,480

Taula 10: Energies d'interacció dels diferents metalls amb el citrat a les dues conformacions.



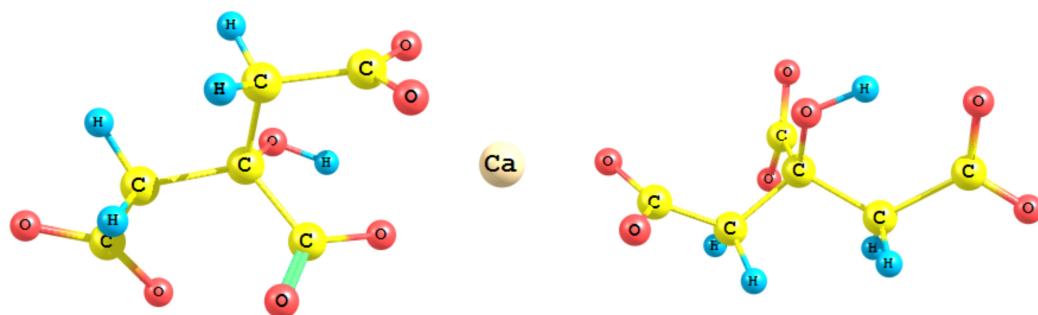


Fig. 37: Imatge del dímer de citrat càlcic. Realització pròpia.

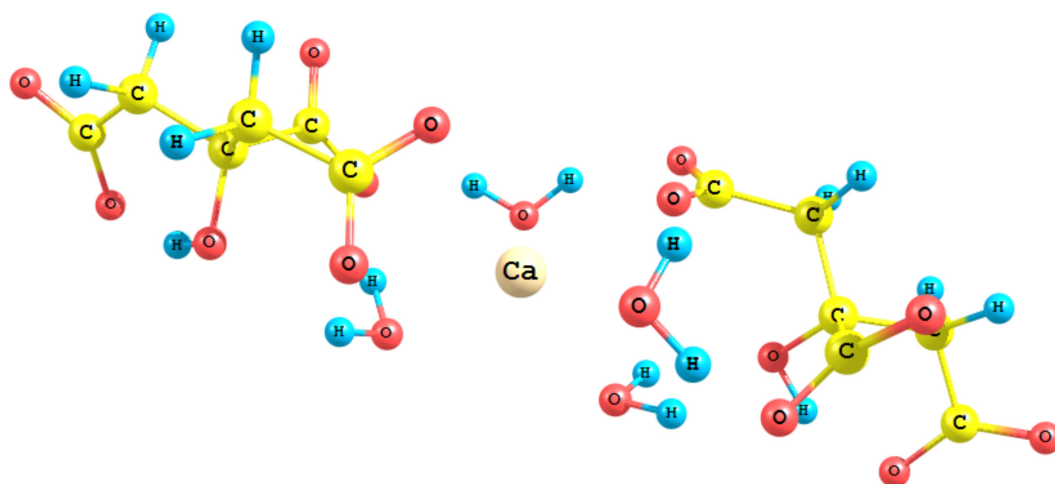


Fig. 38: Vista del dímer de citrat càlcic en un entorn aquós. Realització pròpia.

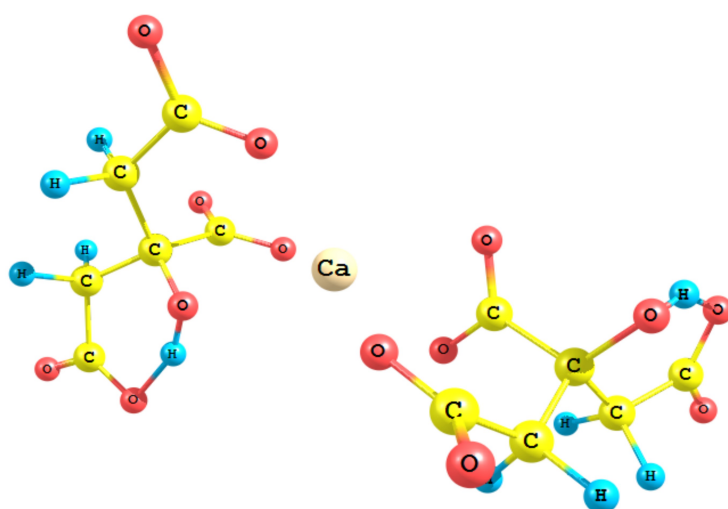


Fig. 39: Vista d'una altra estructura del dímer de citrat càlcic. Realització pròpia.