

TITULO PROVISIONAL:

Determinación de la concentración de Zn libre en medios biológicos con la técnica AGNES (*Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping*).

DOCTORANDO: Carmen Lucía López Solís

DIRECTORES: Josep Galceran Nogués – Encarna Companys Ferran

PROGRAMA: Electroquímica, Ciencia y Tecnología

1. INTRODUCCIÓN

El reconocimiento y cuantificación de iones metálicos ha ganado relevancia, ya que es clave para comprender e identificar su potencial toxicidad y, para proponer posibles herramientas de remediación [1]. En este sentido, los métodos electroanalíticos son de gran importancia en el análisis debido a sus notables ventajas, como alta velocidad de identificación, bajos límites de cuantificación, bajo coste, posibilidad de miniaturización para medidas *in-situ* y baja generación de residuos tóxicos [2]. Dentro de las técnicas electroanalíticas, la técnica AGNES (*Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping*) es de interés, ya que permite la cuantificación directa de la concentración del ion libre. Esta técnica ofrece un marco interpretativo menos complejo que las técnicas tradicionales [3]. También requiere una mínima manipulación de la muestra, y no se ve afectada por la adsorción de especies interferentes en la superficie del electrodo, lo que permite la determinación directa de concentraciones de iones libres [4].

El proyecto de investigación se centra en la medición de zinc en estado libre, en sistemas biológicos, mediante la técnica electroanalítica AGNES. Esto es muy significativo porque gran cantidad de los iones biológicamente importantes, incluido el zinc, que participa como cofactor en muchos procesos enzimáticos, deben estar en cantidades adecuadas, ya que tanto un exceso como una deficiencia pueden provocar desequilibrios funcionales en un sistema. Cabe mencionar que los efectos tóxicos o la capacidad nutricional de un oligoelemento no están determinados por la concentración total en el medio, sino por su fracción libre [5]. Por ello, la técnica analítica pionera en la cuantificación de iones libres, AGNES, es de gran importancia para resolver el efecto que puede tener el zinc libre en medios biológicos, ya que se sabe que participa en el intercambio de información celular [6].

La mayoría de los iones con importancia biológica se encuentran presentes en pequeñas cantidades o asociados a una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, lo que ha generado ciertas dificultades en su cuantificación. Por lo tanto uno de los desafíos de la investigación es mejorar los límites de cuantificación y detección de las técnicas en los medios biológicos que se caracterizan por una elevada complejidad.

2. DESCRIPCIÓN DE LOS OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Cuantificar la concentración de Zn libre en medios biológicos con la técnica AGNES (*Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping*).

2.2 Objetivos específicos:

2.2.1. Establecer las condiciones en la técnica electroanalítica AGNES y sus variantes, como AGNES-I, AGNES-Q y AGNES-SCP para cuantificar la fracción libre de Zn en un sistema biológico tipo Zn + Albúmina.

2.2.2. Evaluar diferentes electrodos para la cuantificación de la fracción libre del Zn en el sistema biológico, como el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), el electrodo de disco rotatorio con película de mercurio (RDE-TMF) y sus variantes en su recubrimiento, por ejemplo con Nafion (como barrera mecánica para impedir la adsorción de compuestos hidrófobos sobre la superficie del electrodo que pudieran llegar a bloquearlo).

2.2.3. Una vez establecidas las condiciones de medida en los sistemas sencillos (tipo Zn + albúmina), se pretende ir abordando sistemas cada vez más complejos y con más relevancia biológica (por ejemplo, estudiando el Zn libre en suero fetal bovino, plasma sanguíneo o en orina).

2.2.4. Un reto de este proyecto será llegar a los niveles intracelulares de Zn libre del orden picomolar.

2.2.5. Se evaluará críticamente la capacidad de colorantes (como la Zinquín, TSQ o TFL) – usados rutinariamente hasta la fecha para cuantificar la concentración de Zn en medios biológicos- para indicar adecuadamente las concentraciones de Zn en preparaciones.

3. MATERIAL Y MÉTODO DE ESTUDIO

3.1 Materiales

Todos los reactivos usados serán grado analítico, con el fin de reducir en gran parte las posibles interferencias de metales, teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica electroanalítica AGNES y que en este trabajo se pretende cuantificar en cantidades del orden nanomolar y de ser posible picomolar. Además todos los reactivos, productos y residuos químicos generados en la ejecución de este trabajo serán tratados y/o separados conforme a los protocolos de seguridad y manejo de sustancias químicas.

3.2 Metodología

3.2.1. Establecer todas las condiciones necesarias para obtener un valor de la fracción libre de Zn en el medio biológico de interés, a través de la técnica AGNES y sus posibles variaciones, como tiempo de medida, ganancias aplicadas, temperatura, concentración de analito, valor de pH, adición de regulador de pH (sea disuelto o por mezcla gaseosa N_2/CO_2), tipo de electrodo, etc. La técnica AGNES se basa en la acumulación de la forma reducida del analito (Zn^0) en la amalgama hasta que se cumple el equilibrio de Nernst en la superficie del electrodo. Entonces se procede a la cuantificación de la cantidad acumulada, que resulta proporcional a la concentración libre de analito en la muestra. En cuanto al tipo de electrodo, se estudiará la medida con los diferentes electrodos (HMDE, RDE-TMF) y las posibles variaciones de estos, como lo es recubrir el electrodo de disco rotatorio con sustancias poliméricas, como el Nafion y el efecto de la concentración de éste en la medida.

3.2.2. Una vez encontradas las condiciones de medida, se procederá a obtener un valor lo más exacto posible de fracción libre de Zn. Se fijará una concentración de Zn y se variará la concentración de proteína (albúmina) o viceversa, con el fin de obtener una descripción específica de la complejación Zn-proteína. Además se harán medidas con cantidades fijas

tanto de Zn como de proteína, pero añadiendo y cambiando de concentración ácidos grasos libres (FFA), ya que de diferentes fuentes bibliográficas, se sabe que el Zn y los FFA presentan afinidad por el sitio específico de unión en la proteína [7], por lo tanto se esperaría que al adicionar los FFA se libere el Zn.

3.2.3. Se diseñarán experimentos con los colorantes que habitualmente se usan (como el Zinquin, TSQ o TFL) en la detección de Zn en medios biológicos, con el fin de comprender mejor su funcionamiento y limitaciones, así como comparar y observar las ventajas o desventajas de todos los métodos considerados.

4. PLAN DE TRABAJO

4.1 Actividades

4.1.1 Revisión bibliográfica

4.1.2 Entrenamiento básico sobre la técnica AGNES, manejo del equipo voltamperométrico y el programa NOVA.

4.1.3 Calibración y cuantificación de Zn^{2+} con ligandos como el NTA y el oxalato de potasio, con el fin de verificar la validez de la técnica AGNES al comparar los datos obtenidos con los predichos por el programa VisualMINTEQ.

4.1.4 Evaluación del comportamiento del blanco sintético con AGNES-I y AGNES-Q, este blanco incluye el electrolito soporte (KNO_3), el buffer (MOPS) y el medio biológico (Albúmina).

4.1.5 Medir $[Zn^{2+}]$ libre en el sistema de $20\ \mu M\ Zn^{2+}$, $KNO_3\ 0.15\ M$, MOPS $0.045\ M$ y BSA $600\ \mu M$ ajustando el pH a 7 con AGNES-1P y AGNES-2P, lo que incluye evaluar condiciones de tiempos y ganancias hasta conseguir el equilibrio con el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE).

4.1.6 Entrenamiento básico en la técnica AGNES-SCP y el programa GPES.

4.1.7 Medir $[Zn^{2+}]$ libre en el sistema de $20\ \mu M\ Zn^{2+}$, $KNO_3\ 0.15\ M$, MOPS $0.045\ M$ y BSA $600\ \mu M$ ajustando el pH a 7 con AGNES-SCP, con el electrodo de disco rotatorio (RDE-TMF).

4.1.8 Modificación de la superficie del electrodo RDE-TMF con Nafion para evaluar su comportamiento voltamperométrico para medir Zn^{2+} y el efecto sobre la respuesta de cuantificación al variar la concentración de dicho polímero en el sistema de $20\ \mu M\ Zn^{2+}$, $KNO_3\ 0.15\ M$, MOPS $0.045\ M$ y BSA $600\ \mu M$ ajustando el pH a 7.

4.1.9 Hacer medidas con diferentes fuentes de albúmina, como la albumina de suero bovino y la albumina de suero bovino fetal, manteniendo las demás variables constantes. Preparación de un manuscrito para enviar a una revista de primer cuartil.

4.1.10 Medir $[Zn^{2+}]$ libre en el sistema de $20\ \mu M\ Zn^{2+}$, $KNO_3\ 0.15\ M$, MOPS $0.045\ M$ y BSA $600\ \mu M$ ajustando el pH a 7, pero además adicionando ácidos grasos libres (FFA) y observar el comportamiento de la señal y como varía la fracción libre de Zn en presencia de estos FFA. Preparación de otro artículo.

4.1.11 Diseñar experimentos con los colorantes que habitualmente se usan como el Zinquin, TSQ o TFL en la detección de Zn en medios biológicos y comparar los datos con los datos obtenidos con la técnica electroanalítica AGNES. Preparación de otro artículo.

4.1.12 Elaboración del documento de tesis

4.2 Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	AÑO																																				
	1												2												3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
4.1.1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4.1.2	X	X																																			
4.1.3		X																																			
4.1.4			X	X																																	
4.1.5					X	X	X	X																													
4.1.6								X																													
4.1.7								X	X																												
4.1.8										X	X																										
4.1.9											X	X	X																								
4.1.10													X	X	X	X	X	X	X																		
4.1.11																		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
4.1.12																															X	X	X	X	X		

Bibliografía

- [1] Vardhan, K., Kumar, P., Panda, R. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*. 290, 111-137.
- [2] Allen, J.B., Faulkner, L.R. (2001). *Electrochemical methods: Fundamentals and Applications*. New York: Wiley, 2nd Ed.
- [3] Galceran, J., Companys, E., Puy, J., Cecilia, J., Garces, J. (2004). AGNES: anew electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. *Journal of electroanalytical chemistry*. 566, 95-109.
- [4] Galceran, J., Lao, M., David, C., Companys, E., Castro-Rey, C., Salvador, J., Puy, J. (2014). The impact of electrodic adsorption on Zn, Cd and Pb speciation measurements with AGNES. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 722-723, 110-118.
- [5] Prasad, A.S. (2014). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *Journal of trace Elements in Medicine and Biology*. 28, 357-363.
- [6] Krezel, A., Maret, W. (2016). The biological inorganic chemistry of zinc ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 611, 3-19.
- [7] Coverdale, J., Khazaipoul, S., Arya, S., Stewart, A., Blindauer, C. (2019). Crosstalk between zinc and free fatty acids in plasma. *BBA-Molecular and cell Biology of lipids*. 1864, 532-542.