

**ESTUDI TEÒRIC DE
L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA
DE L'ANHIDRASA
CARBÒNICA**

MEMÒRIA PRESENTADA PER EN MIQUEL SOLÀ I PUIG PER OPTAR
AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES QUÍMIQUES

Abril de 1991

**ESTUDI TEÒRIC DE
L'ACTIVITAT ENZIMÀTICA
DE L'ANHIDRASA
CARBÒNICA**

MEMÒRIA PRESENTADA PER EN MIQUEL SOLÀ I PUIG PER OPTAR
AL GRAU DE DOCTOR EN CIÈNCIES QUÍMIQUES

Abril de 1991



K. 200604

2

JUAN BERTRAN RUSCA I AGUSTI LLEDOS FALCO,
PROFESSORS CATEDRÀTIC I TITULAR DEL DEPARTAMENT DE QUÍMICA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA.

CERTIFIQUEM:

Que en Miquel Solà i Puig, llicenciat en Ciències, secció Químiques, ha realitzat sota la nostra direcció, en el Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball titulat "Estudi teòric de l'activitat enzimàtica de l'anhidrasa carbònica", que es troba recollit en aquesta memòria, per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques.

I perquè consti a efectes legals, firmem aquest certificat a Bellaterra a 6 de març de 1991.



J. Bertrán



A. Lledós

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

A la meva estimada mare

La gestació d'aquesta Tesi es va produir molt probablement un dia d'octubre o novembre de l'any 1986. La idea inicial de tractar sistemes bioquímics que contenen zinc va sorgir dels meus directors de Tesi Agustí Lledós i Juan Bertrán. A tots dos els hi haig de donar les gràcies per haver-me permès treballar al seu costat en un tema tan interessant, i per la seva direcció i paciència demostrades durant aquests quatre anys.

També voldria agrair a tots els membres de la Unitat de Química-Física l'amistat i l'ajuda que he rebut d'ells al llarg d'aquest temps. Menció especial per:

En Miquel Duran pels savis consells i idees que m'ha proporcionat constantment, per haver-me introduït en el món VB, per les correccions ortogràfiques d'aquesta memòria i per innumerables coses més.

A la tota la gent del tercer pis amb els que ha estat un plaer treballar i conviure tantes hores. Voldria destacar a en Feliu, per les ajudes de tipus tècnic i pels missatges electrònics que tant em varen ajudar quan estava a Detroit i a Erlangen; a en Josep Lluís amb el que ens uneix l'afició comuna als Pistons; a l'Enric, amb el que estic molt proper entre altres coses per raons de parentesc; a en Ramon i en Jordi, companys de despatx i d'alguna que altra farra; a en Miquel i en Vicenç, per les valuoses indicacions i cops de mà; i a la Mariona i l'Angels perquè sempre han tingut un moment per escoltar i oferir-me la seva ajuda.

També a les dues Maries, en Pepe, i en Paco, habitants del segon pis, font inescrutible de tertulies i acudits, la companyia dels quals me l'aprecio molt sincerament.

No voldria oblidar-me de la gent que m'ha acollit tan bé quan he estat fóra de casa. A Detroit, el treball i bon fer del Prof. H.B. Schlegel em varen servir de constant font d'inspiració. Sens dubte, però, el millor va ésser l'amistat que em varen oferir des de bon començament en Carlos González i la seva dona Tati. A tots dos els hi estic molt agraït. També a en Joe McDouall i a la seva dona Jackie, amb els que vaig compartir estones inoblidables. Per la seva banda, a Erlangen vaig gaudir del consell expert del Prof. P.v.R. Schleyer, de l'interès i simpatia de Tim Clark, i de l'impressionant qualitat humana de J. Chandrasekhar (Chandru).

Des de l'octubre de l'any 1984 he estat visquent durant la setmana en pisos d'estudiants. Aquesta convivència de tants anys m'ha permès conèixer molta gent. He tingut la gran sort de trobar sempre grans companys i millors amics, i per això, crec que és de llei agrair totes les bones estones passades i els bons sopars compartits. El primer i segon any vaig conuiuere amb en Francesc, en Lluís, l'Eugeni, i en Julià. Després alguns d'ells han anat marxant, i altres s'han anat incorporant, com els germans Pep i David, o els gironins Jordi i David. Finalment en aquests dos darrers anys he gaudit de la companyia d'en Bernat, en Txema i en Pep. Conscientment m'he deixat a l'Adrià per al final, donat que si no recordo malament ha estat amb ell amb el que més temps he compartit sostre i inclús en dos cursos també habitació. D'ell haig de destacar la seva comprensió i tolerància, així com el profund sentit de l'amistat que professa. També des d'aquí un record per a tots els companys que durant sis anys han desfilat per l'equip de fútbol-sala 'Els tractoristes de la U.A.B.'.

D'importància vital per a mi ha estat l'estímul constant rebut per part de la meua mare a la que dedico la present memòria. Des del primer moment em va recolzar perquè fes la Tesi, i sempre s'ha interessat intensament per tot el que m'ha anat succeint. També la meua germana ha mostrat sempre una gran preocupació pel que hem passava, i m'ha ajudat sempre en tot el que li ha estat possible i més.

Per acabar, vull agrair a la Carme la infinita paciència que ha tingut amb mi. L'única cosa que lamento de la realització d'aquest treball és no haver pogut fruir més temps de la seva tendresa. La seva il·lusió i estima han estat per a mi una font de coratge permanent. També una menció per a la seva família que des del primer moment m'han acollit com a un més.

A tots, moltes gràcies.

30 **Zinc** Zn Del terme alemany *zink*, que significa d'origen fosc.

Aún cuando todos los expertos coincidan, pueden muy bien estar equivocados

Bertrand Russell

Index

1	INTRODUCCIO	21
1.1	EL Zn^{+2} EN ELS ENZIMS	25
1.2	ESTUDIS EXPERIMENTALS	30
1.2.1	ESTUDIS ESTRUCTURALS	30
1.2.2	ESTUDIS DEL MECANISME D'ACCIO CATALITICA	38
1.2.2.1	Estudis termodinàmics	38
1.2.2.2	Estudis cinètics	40
1.2.3	SUMARI DE RESULTATS EXPERIMENTALS	50
1.3	ESTUDIS TEORICS	55
1.3.1	POTENCIALS ELECTROSTATICIS	56
1.3.2	MECANICA MOLECULAR	58
1.3.3	CALCULS SEMIEMPIRICS	60
1.3.4	CALCULS <i>AB INITIO</i>	65
1.3.5	CALCULS DE DINAMICA MOLECULAR	72
1.3.6	SUMARI DE RESULTATS TEORICS	74
1.4	OBJECTIUS	78
2	METODE DE CALCUL	85
2.1	CALCUL DE L'ENERGIA I FUNCIO D'ONA	90
2.1.1	FONAMENTS	90

2.1.1.1	Aproximació de Born-Oppenheimer	90
2.1.1.2	Mètode SCF Hartree-Fock	92
2.1.1.2.1	Mètode Restricted Hartree-Fock (RHF)	94
2.1.1.2.2	Mètode Unrestricted Hartree-Fock (UHF)	98
2.1.1.2.3	Energia de Correlació	100
2.1.1.2.3.1	Mètode variacional	101
2.1.1.2.3.2	Mètode pertorbacional	102
2.1.1.2.4	Derivades de l'energia	105
2.1.1.3	Mètode de l'enllaç de valència (VB)	106
2.1.1.3.1	Estructures de Rumer	107
2.1.1.3.2	Càlcul de l'energia en el mètode de l'enllaç de valència	109
2.1.1.3.3	Projecció d'una funció MO sobre una VB	110
2.1.1.3.4	Comparació VB/MO	112
2.1.2	EFFECTE DE PERTORBACIONS EXTERNES	114
2.1.2.1	Camps elèctrics	114
2.1.2.2	Camp de reacció creat per un solvent	115
2.1.3	IMPLEMENTACIONS METODOLOGIQUES	118
2.1.3.1	Mètodes semiempírics en la teoria MO	118
2.1.3.2	Mètodes <i>ab initio</i> en la teoria MO	120
2.1.3.2.1	Càlculs "all electron"	121
2.1.3.2.2	Càlculs amb només electrons de valència. Pseudopotencials.	123
2.1.3.3	Càlculs amb la teoria d'enllaç de valència	125
2.2	SUPERFÍCIES DE POTENCIAL	127
2.2.1	LOCALITZACIÓ DE PUNTS D'INTERÉS QUÍMIC EN LA SUPERFÍCIE DE POTENCIAL	128

2.2.1.1	Optimització sense constriccions en funcions multi- variable. Localització de mínims	130
2.2.1.1.1	Algorismes d'optimització que precisen del càlcul de l'energia i gradient	131
2.2.1.2	Optimització constrenyida en funcions multivariable. Localització d'estats de transició	134
2.3	PROGRAMES	136
3	RESULTATS I DISCUSSIO	139
3.1	GENERACIO DE L'ESPECIE CATALITICAMENT ACTIVA	143
3.1.1	TRANSFERENCIA PROTONICA EN EL DIMER D' AIGUA CATALITZADA PER CATIONS DIVALENTS (Zn^{+2} , Be^{+2} i Mg^{+2})	144
3.1.1.1	Transferència protònica en el sistema $M^{+2}(H_2O)_2$	147
3.1.1.1.1	Intermedis en la transferència protònica	147
3.1.1.1.2	Estats de transició en la transferència protònica	150
3.1.1.1.3	Perfils de reacció en la transferència protònica	152
3.1.1.1.4	Paper catalític del catió	155
3.1.1.1.5	Consideracions metodològiques	164
3.1.1.1.6	Discussió	167
3.1.2	ESTUDI DE LA TRANSFERENCIA PROTONICA $L_3Zn(H_2O)^{+2}$ $+ B \rightarrow L_3Zn(OH)^+ + BH^+$; ($L=NH_3$ i ImH , $B=H_2O$ i ImH)	168
3.1.2.1	Transferència protònica en el sistema $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2}$ $+ H_2O$	169
3.1.2.2	Transferència protònica en el sistema $(ImH)_3Zn(H_2O)^{+2}$ $+ B$ ($B = H_2O/ImH$)	176
3.1.2.3	Transferència protònica en el sistema $Zn(H_2O)_2^+$	181

3.1.2.4	Efecte de l'entorn en la transferència protònica en el sistema $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$	183
3.1.2.5	Discussió	186
3.2	ESTUDI DE LA REACCIO D'HIDRATACIO DEL CO_2	192
3.2.1	ESTUDI DE LA HIDRATACIO DEL CO_2 AïLLAT	193
3.2.1.1	Influència de pertorbacions externes en la molècula de CO_2	194
3.2.1.2	Estudi de la reaccio $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$	197
3.2.2	ESTUDI DE LA REACCIO D'HIDRATACIO DEL CO_2 EN L'ANHIDRASA CARBONICA	201
3.2.2.1	Mecanisme de Lipscomb	203
3.2.2.1.1	Modelació del centre actiu de l'enzim amb $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$	203
3.2.2.1.1.1	Enllaç del CO_2 al centre actiu	204
3.2.2.1.1.2	Formació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	210
3.2.2.1.1.3	Resultats 3-21G	216
3.2.2.1.2	Incorporació d'una molècula d'aigua addicional a la descripció del centre actiu	221
3.2.2.1.2.1	Enllaç del CO_2 al centre actiu	222
3.2.2.1.2.2	Formació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	224
3.2.2.1.3	Incorporació de l'efecte del camp creat per l'entorn	228
3.2.2.1.3.1	Modelació del centre actiu amb $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$	230
3.2.2.1.3.2	Incorporació d'una aigua addicional a la descripció del centre actiu	233
3.2.2.2	Mecanisme de Lindskog	237
3.2.2.2.1	Formació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	238

3.2.2.2	Incorporació de l'efecte del camp creat per l'entorn	241
3.2.2.3	Discussió	247
3.3	MODELACIO DE LA INHIBICIO ANIONICA EN LA CA	249
3.3.1	ENLLAÇ D'ANIONS I PENTACOORDINACIO EN ELS COMPLEXOS DE Zn^{+2}	249
3.3.2	RESULTATS PER ALS SISTEMES AÏLLATS	253
3.3.2.1	Geometries optimitzades	254
3.3.2.2	Comparació de les energies	264
3.3.2.3	Comparació de les càrregues	268
3.3.3	RESULTATS PER ALS SISTEMES EN DISSOLUCIO	270
3.3.4	DISCUSSIO	273
3.4	ESTUDI DEL BESCANVI DE HCO_3^- PER H_2O EN LA CA	276
3.4.1	ESPECIES DEL TIPUS $(NH_3)_3Zn^{II}(HCO_3^-)(H_2O)$	278
3.4.1.1	Geometries optimitzades	278
3.4.1.2	Energètica	283
3.4.2	ESPECIES DEL TIPUS $(NH_3)_3Zn^{II}(HCO_3^-)(OH^-)$	287
3.4.2.1	Geometries optimitzades	288
3.4.2.2	Energètica	289
3.4.3	DISCUSSIÓ	293
3.5	DISCUSSIO GLOBAL DEL MECANISME DE LA CA	295
4	CONCLUSIONS	303
	Llista de figures	309
	Llista de taules	313
5	BIBLIOGRAFIA	321

CAPITOL 1

INTRODUCCIO



Entre tots els elements inorgànics indispensables per al normal desenvolupament dels éssers vius, [1-3] el zinc ocupa una posició privilegiada. Es, després del ferro, el segon en importància quantitativa, i el que segueix, que és el coure, es troba ja molt allunyat. [4,5] Així per exemple, en un humà adult de 70 kg de pes s'hi troben aproximadament uns 4 g de ferro, 3 g de zinc i només 0.2 g de coure. [6] El consum mig humà de zinc es situa entre els 10-15 mg diaris. Ha estat demostrat que aquest metall és vital per al creixement i que la seva manca pot provocar des d'enanisme fins a atrofia testicular, dermatitis, diarrea o pertorbacions emocionals que poden desembocar en demència. [6] Si bé no hi ha un teixit que l'acumuli en preferència, els ulls, la pròstata i l'esperma en contenen quantitats importants, [7] sempre en forma de dicatió Zn^{+2} en cofactors essencials per a l'activació d'un gran número d'enzims. En una publicació de 1982, [8] queda perfectament palesa la gran importància bioquímica del zinc, ja que s'hi llisten 202 enzims en els quals la presència d'aquest catió és fonamental. En aquest sentit, cal afegir que la recerca de nous enzims que contenen zinc continua interessant a la comunitat científica. [9,10] També és molt remarcable el fet que el

zinc és l'únic metall que presenta enzims en cadascuna de les sis classes contemplades per la Unió Internacional de Bioquímica: oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerasas i ligases. [6]

Precisament, l'estudi teòric del mecanisme d'acció catalítica d'un dels enzims que contenen zinc, l'anhidrasa carbònica, serà l'objectiu fonamental d'aquesta Tesi.

En un primer apartat de la introducció parlarem, molt breument, d'alguns dels enzims en els que intervé el zinc. Ens centrarem després, ja en concret, en l'anhidrasa carbònica. Primer comentarem els resultats experimentals lligats a les diferents tècniques utilitzades per al seu estudi. Tot seguit presentarem els resultats teòrics apareguts fins ara relacionats amb el tema. En un darrer apartat establirem els objectius que pretenem assolir amb el nostre treball.

1.1 EL Zn^{+2} EN ELS ENZIMS

Com acabem de comentar el zinc és un dels metalls que més participen en enzims. S'han donat diferents arguments per explicar aquest fet. Per exemple, Williams [11] en un article molt interessant dona una sèrie de raons per les quals el zinc està present en un nombre tan important d'enzims. Així l'autor diu que en primer lloc és un metall que forma complexos amb facilitat, encara que no tant com el coure. En segon lloc, assenyala que no té grans preferències per a un determinat camp de lligands, sinó que gràcies a la seva capa *d* plena té moltes possibilitats estereoquímiques. En tercer lloc, fa referència a la possibilitat que té el Zn^{+2} d'intercanviar lligands amb rapidesa, i per tant d'alliberar els productes de la reacció un cop obtinguts. Per acabar, es veu que no pren part en reaccions redox. Si afegim a més a totes aquestes propietats el fet que el Zn^{+2} és soluble a pH neutre tindrem un catió que és preferible a pràcticament qual-sevol altre per treballar en reaccions d'hidratació i hidròlisi en solució i a pH neutres. Ochiai, [5] per la seva part, ha sumat a aquests factors el de la gran abundància de zinc en l'escorça terrestre. S'ha vist en diferents processos bioquímics que el Co^{+2} té una activitat semblant a la del Zn^{+2} . No obstant això, el Co^{+2} és un metall molt escàs en comparació amb el Zn^{+2} , fet que explicaria perquè es coneixen molts pocs enzims de Co^{+2} i en canvi tants de Zn^{+2} . Altres cations divalents com el Cu^{+2} o el Ni^{+2} no són vàlids perquè donen lloc a reaccions redox, o perquè tenen una gran preferència per formar complexos octaèdrics. Altres com el Cd^{+2} o el Be^{+2} no poden ésser utilitzats degut a la seva gran toxicitat. [12] En definitiva, el metall que compleix un nombre màxim de requisits necessaris és el Zn^{+2} . La suma de tots els factors que hem comentat justifiquen la gran abundància d'enzims que contenen Zn^{+2} .

De tots els enzims coneguts en els que intervé d'alguna manera el zinc, els més estudiats fins ara han estat l'alcohol deshidrogenasa (ADH), la carboxipeptidasa (CPA), la termolisina (TL), i l'anhidrasa carbònica (CA).

L'ADH [2,13-16] ha estat àmpliament estudiada des d'un punt de vista estructural, [14] cinètic, [17,18] i de propietats físico-químiques. [19-22] L'ADH és un enzim de tipus oxidoreductasa que actua catalitzant el procés d'oxidació :



S'ha vist que per cada molècula d'enzim intervenen dos àtoms de zinc; un situat en el centre actiu i l'altre en funcions estructurals. El dicatió Zn^{+2} situat en el centre actiu es troba unit a tres lligands, Cys-46, His-67, i Cys-174, mentre que una molècula d'aigua [13] ocupa la darrera coordinació d'un tetraedre distorsionat. Darrerament, alguns autors, [14,23] han suggerit que la coordinació al voltant del zinc es modifica al llarg del procés de catàlisi per formació, en determinats moments de la reacció, d'un complex pentacoordinat que té una estructura de piràmide de base quadrada.

Es especialment en les reaccions d'hidròlisi on l'ió Zn^{+2} actua més eficientment com a catalitzador. Així, en sistemes no bioquímics, s'han descrit reaccions d'hidròlisi d'esters, [24-32] amides, [33-39] fosfats, [40-44] aldehyds, [45,46] i anhídrids d'àcid [43,47] catalitzades per aquest catió.

En sistemes bioquímics, la carboxipeptidasa i la termolisina (entre d'altres) actuen també en reaccions d'hidròlisi. La CPA [48-52] va ésser el primer metalloenzim del qual se'n va poder determinar la seqüència i l'estructura, [49,53] en part gràcies al seu moderat pes molecular (34472 ua) i també a la relativa facilitat d'obtenció de cristalls purs. Es sap que conté un àtom de zinc per molècula d'enzim, unit directament a quatre lligands, un inorgànic com és la molècula d'aigua i tres proteínics com són els

residus aminoàcids Glu-72, His-196 i His-69, en una coordinació tetraèdrica distorsionada (encara que si es compta els dos oxígens del Glu-72 com a dos lligands, llavors el metall es troba pentacoordinat). En conjunt, la cadena polipeptídica de l'enzim la formen 307 aminoàcids dels quals els residus més importants per a la catàlisi en són els Glu-270, Arg-71, Arg-127, Asn-144, Arg-145 i Tyr-248. La CPA catalitza la hidròlisi d'esters [27,29,34] i amides, [33,34] i fisiològicament la seva funció és alliberar aminoàcids de les proteïnes digerides, és a dir, hidrolitzar enllaços peptídics. [54] S'han proposat dos mecanismes diferents d'actuació de la CPA, un anomenat camí de l'aigua promocionada, on en primer lloc la molècula d'aigua perd un protó i origina el grup $ZnOH^+$, el qual posteriorment actua com a nucleòfil atacant el grup carbonil del pèptid, i l'altre anomenat camí nucleofílic, on és el grup Glu-270 el que actua com a nucleòfil i on el paper del zinc consisteix en interaccionar amb l'oxigen del grup carbonil de forma que augmenta el caràcter electrofílic del seu carboni, i per tant facilita l'atac nucleofílic del glutamat. [48] El primer mecanisme suggerit sembla actualment el més probable, si bé hi ha dades experimentals a favor de tots dos i fins i tot s'ha suggerit que existeixen diferències notables en el mecanisme de catàlisi de la CPA quan actua en reaccions d'hidròlisi d'esters o quan ho fa en hidròlisi d'amides, de manera que els dos mecanismes podrien ésser vàlids i l'aplicació de l'un o de l'altre estaria en funció del substracte a hidrolitzar. [55] La inhibició de la CPA [56-58] per anions [59-61] o cations [3] així com els mecanismes implicats en el procés d'alteració de l'activitat enzimàtica han estat àmpliament estudiats. Aquests treballs són especialment interessants de cara al disseny i elaboració de nous fàrmacs.

Per la seva banda, la TL presenta una gran similitud amb la CPA tant pel que fa a la configuració del centre actiu com al tipus de catàlisi, mecanismes que segueixen, [62-64] o als agents inhibidors que actuen bloquejant la seva activitat. [65-69] De fet, es creu que inicialment es tractava d'un mateix enzim que ha evolucionat donant lloc

a dues entitats diferents. [62]

Per acabar la relació dels enzims de Zn^{+2} més estudiats, hem de parlar de l'anhidrasa carbònica, [70-74] que serà l'objecte principal d'estudi de la present Tesi. Aquest és un metalloenzim de Zn^{+2} que es troba tant en animals com en plantes. En el cas dels mamífers s'han trobat fins a sis isoenzims diferents d'aquest enzim que poden catalitzar hidròlisis de tot tipus d'amides i esters, i hidratació d'aldehids, si bé cal dir que l'única funció fisiològica que desenvolupen és la catàlisi de la hidratació del CO_2 per donar HCO_3^- . En presència de l'enzim la velocitat d'hidratació del CO_2 creix en un factor de 10^7 respecte a la velocitat que presenta aquesta reacció en solució aquosa. Aquest enzim és, doncs, d'importància capital per a la respiració i per al manteniment de l'equilibri intracel·lular CO_2/HCO_3^- . [72]



Avui en dia, es sap que l'espècie catalíticament activa necessària perquè tingui lloc el procés és la $EZn^{II}(OH^-)$.¹ Els passos generals de la reacció catalitzada per la CA són també coneguts. Aquests són:

1. Interacció del CO_2 amb el centre actiu.
2. Atac nucleofílic del $EZn^{II}(OH^-)$ al CO_2 .
3. Formació del HCO_3^- .
4. Entrada de l' H_2O i sortida del HCO_3^- .
5. Desprotonació de l' H_2O per recuperar l'espècie activa $EZn^{II}(OH^-)$.

Malgrat el coneixement d'aquests passos generals, són encara molts els punts que resten foscos respecte als mecanismes d'actuació i d'inhibició de l'anhidrasa carbònica. Amb el nostre treball pretenem aportar nous coneixements a l'estudi de la seva

¹Aquí i al llarg de tot el treball E representarà tota la cadena proteínica de l'enzim.

activitat catalítica i dels mecanismes utilitzats pels sistemes que actuen bloquejant la seva capacitat enzimàtica.

Tot seguit comentarem els resultats experimentals que es tenen per a la CA ordenats segons les tècniques utilitzades per al seu estudi. Després, presentarem els resultats teòrics existents relacionats amb el tema.

1.2 ESTUDIS EXPERIMENTALS

L'anhidrasa carbònica va ésser descoberta l'any 1940. [75] Des d'aleshores han estat molts els estudis experimentals portats a terme per tal d'esbrinar l'estructura i el mecanisme d'actuació d'aquest enzim. Dividirem l'exposició dels treballs experimentals en dos grans blocs: el primer dels quals es dedica als estudis estructurals i l'altre ho fa als mecanístics. Així, en el primer apartat discutirem els estudis espectroscòpics portats a terme per tal de determinar l'estructura de l'enzim i estudiar algunes característiques importants del mecanisme catalític, per seguidament en el segon apartat passar a comentar els treballs d'índole cinètica i termodinàmica que s'han fet en un intent d'elucidar el mecanisme catalític de la CA. Com es veurà, els dos apartats estan molt interrelacionats, i de fet els estudis estructurals són sovint utilitzats per recolzar alguna determinada proposta sobre el mecanisme d'actuació de l'enzim.

1.2.1 ESTUDIS ESTRUCTURALS

En l'estudi de l'estructura de l'enzim s'han utilitzat radiacions d'una àmplia regió de l'espectre electromagnètic. Les longituds d'ona emprades han variat des de valors pròxims a 1 Å per tal d'obtenir els espectres de difracció de Raigs-X fins a valors propers a 1 m en els estudis de ressonància magnètica nuclear (NMR). En els següents paràgrafs presentarem aquests estudis espectroscòpics comentant els resultats obtinguts amb les diferents tècniques emprades, que hem ordenat en el sentit de longitud d'ona creixent.

La difracció de Raigs-X s'ha dut a terme per a l'estudi de l'estructura dels isoenzims B i C de l'anhidrasa carbònica humana (HCAB [76,77] i HCAC [78,79]). En

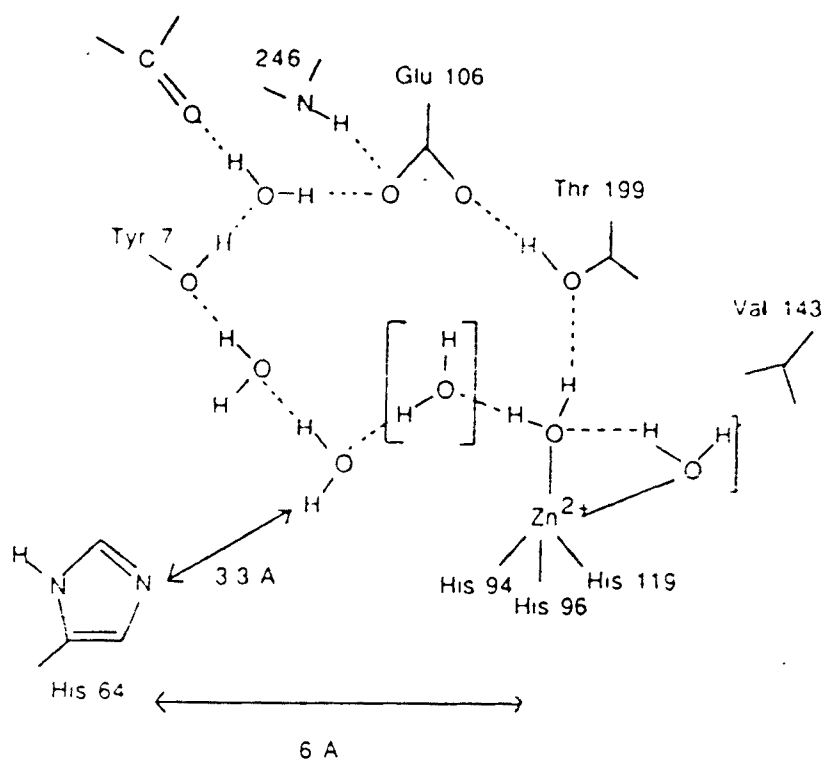


Figura 1: Esquema del centre actiu de la CA. [80]

ambdós casos s'ha vist que el zinc es troba directament unit a tres lligands imidazol dels grups histidínics His-94, His-96 i His-119, i a una molècula d'aigua en una estructura tetraèdrica un xic distorsionada. Un dels protons d'aquesta aigua interacciona per enllaç d'hidrogen amb el grup Thr-199 que alhora forma un enllaç d'hidrogen amb el grup Glu-106. L'altre protó interacciona a través d'una cadena de molècules d'aigua amb el grup His-64. Un esquema simplificat del centre actiu es presenta en la figura 1.

Tant el grup Glu-106 com el grup His-64 han estat proposats com possibles promotors de la desprotonació de l'aigua directament unida al Zn^{2+} per donar un grup

Taula I: Geometria de la coordinació del zinc en la HCAC.

X	Distàncies (Å)		Angles (°)	
	Zn-X	X-Zn-94	X-Zn-96	X-Zn-119
OH	2.12	106.8	108.5	112.3
N His-94	2.06	-	112.1	111.4
N His-96	2.06	-	-	105.9
N His-119	1.99	-	-	-

hidroxil. Les diferències en l'estructura primària dels isoenzims B i C de la CA es troben en els residus 200 (HCAB: His, HCAC: Thr), 67 (His, Asn), 69 (Asn, Glu), 91 (Phe, Ile), 121 (Ala, Val) i 131 (Leu, Phe). Els residus 200 i 67 semblen els que poden afectar més l'activitat de l'enzim i per tant se'ls considera els responsables de la diferència d'activitat catalítica observada entre els dos isoenzims. [81] Concretament a 25 °C la HCAB té una velocitat de catàlisi de 1×10^4 , mentre que per a la HCAC la velocitat és de 1×10^6 . Les dades geomètriques de la coordinació del zinc en la HCAC, que és l'isoenzim catalíticament més eficient, es presenten en la Taula I. Els valors que es donen en la Taula s'han extret del treball d'Eriksson *et al.* [79]

S'ha determinat que la HCAC està composta de 260 aminoàcids que es disposen a l'espai ocupant un elipsoide de dimensions $41 \times 41 \times 47 \text{ Å}^3$. El centre actiu es troba situat gairebé en el centre geomètric de l'enzim i consisteix en una cavitat cònica de 15 Å d'amplada per 16 Å de profunditat. Aquest centre actiu es pot dividir en dues subunitats, una hidrofílica i una altre hidrofòbica. La part hidrofílica conté l'aigua directament unida al Zn^{+2} i els residus His-64, Thr-199, Glu-106 i Tyr-7, a més d'unes vuit molècules d'aigua. La part hidrofòbica inclueix els residus Val-143, Trp-209, Val-121, Phe-131 i Leu-141 que proporcionen un canal d'entrada per al CO_2 . També s'hi troba una aigua a uns 3.2 Å de l'àtom de zinc que es creu que és desplaçada pel CO_2 quan aquest es posa en contacte amb el centre actiu.

Treballant amb difracció de Raigs-X s'ha estudiat també l'enllaç d'inhibidors com ara l'acetat, HCO_3^- , NO_3^- , Cl^- , CN^- , OCN^- o SCN^- . [82] S'ha vist que aquests inhibidors es situen a una distància promig de 2.01 Å del Zn^{+2} i que es manté, en alguns casos, la tetracoordinació d'aquest metall. La substitució del Zn^{+2} per Co^{+2} en el centre actiu dóna lloc a que inhibidors més bàsics, com l'acetat o el bicarbonat, formin estructures pentacoordinades.

S'ha constatat [83-85] que la inhibició aniònica de la CA es realitza moltes vegades a través de l'enllaç de l'anió inhibidor en una cinquena coordinació del metall, que dificulta així la generació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ que és la catalíticament activa en aquest procés. [79,86]

Eriksson *et al.* [79] han demostrat, amb la tècnica dels Raigs-X, que un inhibidor catiònic com el Hg^{+2} actua d'una manera diferent. S'uneix a l'His-64 i impedeix que aquesta rebi el protó que resulta de la desprotonació de l'aigua unida al zinc, de manera que no permet la generació de la forma catalíticament activa de l'enzim.

L'espectroscòpia electrònica ha estat també emprada en l'estudi de l'estructura de la CA, si bé hi ha menys estudis amb aquesta tècnica que amb l'anteriorment presentada d'espectroscòpia de Raigs-X. Cal assenyalar que el Zn^{+2} és un metall transparent a la radiació utilitzada en els estudis d'espectroscòpia electrònica. Per això cal substituir el zinc per altres metalls que sí donen coloració, com poden ésser el Co^{+2} , el Mn^{+2} o el Cu^{+2} . S'ha comprovat que en molts casos la substitució del zinc per alguns d'aquests metalls no altera excessivament l'estructura i reactivitat de l'enzim, [87,88] si bé cal tenir present que els resultats obtinguts en una CA substituïda no sempre són extrapolables a la CA real. Així i tot, en un recent estudi teòric de mecànica molecular, s'ha demostrat que la CA nativa i la substituïda amb Co^{+2} no presenten diferències estructurals notables. [81] Experimentalment s'ha trobat també

que la velocitat de reacció de l'enzim substituït amb Co^{+2} és de $7 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$, davant dels $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ que s'obtenen per a l'enzim natiu. Les diferències són, doncs, inferiors a un ordre de magnitud. [89]

Un dels aspectes més interessants que ens ofereix l'espectroscòpia electrònica és la possibilitat de diferenciar entre espècies penta- i tetracoordinades. [86,90] Una absorbància molar poc intensa en la zona dels $12000\text{-}14000 \text{ cm}^{-1}$ és indicativa de pentacoordinació. Per la seva banda, una intensa absorbància molar (aproximadament $300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en la regió visible és indicativa de tetracoordinació. Si s'observen els dos fenòmens alhora cal pensar en l'existència d'un equilibri entre formes tetra- i pentacoordinades. En aquest darrer cas l'espectre és clarament dependent de la temperatura, que actua desplaçant l'equilibri cap a un costat o l'altre. Amb aquestes dades a la mà, s'ha determinat que un gran nombre d'inhibidors aniònics (NCS^- , acetat, $\text{Au}(\text{CN})_2^-$, etc.) donen lloc a espècies pentacoordinades. [74,84] Altres inhibidors actuen de diferent manera. Així, el HCO_3^- és inhibidor de la CA perquè forma un cicle que bloqueja el grup nucleofílic OH^- . [84] També l'imidazol inhibeix la CA sense unir-se directament al metall donat que ocupa el lloc on en condicions normals es situa el CO_2 . [84]

S'ha observat una gran dependència de l'espectre electrònic de la Co(II)-CA (anhidrasa carbònica substituïda amb Co(II)) en funció del pH, [84] i s'ha demostrat que hi ha dos possibles grups que sofreixen ionització de pK_a 's de 6 i 7.5. Un d'ells n'és l'aigua coordinada al Zn^{+2} , la desprotonació de la qual porta a la generació de l'espècie catalíticament activa. Per acabar la part d'espectroscòpia electrònica, cal dir que s'ha indicat que els canvis en l'espectre visible de la Co(II)-CA en excès de CO_2 són deguts a l'acumulació de l'estructura $\text{Co(II)-H}_2\text{O}$ durant el procés. [91,92]

Pel que fa a la tècnica d'espectroscòpia d'infraroig (IR) Riepe i Wang [93] han

demostrat que la interacció del CO_2 amb el centre actiu de l'enzim és considerablement feble. Així, la banda de tensió asimètrica del CO_2 quan està dissolt en H_2O presenta un valor de 2343.5 cm^{-1} , i aquest canvia en només $2.5 \pm 0.5 \text{ cm}^{-1}$ quan el CO_2 es troba interaccionant amb la CA, de forma que passa a tenir un valor final de 2341 cm^{-1} . Això demostra que la distorsió que pateix aquest CO_2 quan està interaccionant amb la CA és relativament petita i que probablement el CO_2 no es troba directament unit al metall en aquesta primera fase d'interacció amb l'enzim. Aquest és un punt important en el mecanisme de la CA i a ell ens hi referirem més endavant. S'ha observat també, en aquest mateix estudi, una important variació de l'espectre IR amb el pH, de manera que en augmentar el pH disminueixen les bandes típiques que corresponen al CO_2 i augmenten les que corresponen al HCO_3^- .

No s'han fet estudis Raman de l'estructura de la CA. El que sí que s'ha estudiat mitjançant aquesta tècnica relacionat amb la coordinació del Zn^{+2} , ha estat la hidratació d'aquest catió. [94] S'ha determinat que el zinc en solució aquosa es troba coordinat a sis molècules d'aigua en una disposició octaèdrica, amb una distància promig $\text{Zn} - \text{O}_{\text{aigua}}$ de 2.08 \AA . En aquest treball s'ha extret la conclusió que la hidratació de metalls divalents és interpretable en termes d'interaccions electrostàtiques ió-moment dipolar.

Tampoc han estat massa nombrosos els estudis que s'han dut a terme amb la tècnica de ressonància de spin electrònica (ESR). En aquests estudis també cal substituir el Zn^{+2} per altres cations divalents com el Co^{+2} o el Cu^{+2} que donguin lloc a la formació de complexos paramagnètics. A l'igual que en el cas de l'espectroscòpia electrònica, els espectres ESR permeten diferenciar els complexos tetra- dels penta-coordinats. [95] S'ha comprovat per a la Co(II)-CA mitjançant aquest tipus d'estudis espectroscòpics [85] l'existència d'un complex pentacoordinat que facilita l'intercanvi de lligands entre el bicarbonat que ha de sortir i l'aigua que ha de reemplaçar-lo, a

través d'un mecanisme que podria recordar el de les típiques S_N2 .

L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (NMR) ha estat àmpliament utilitzada per estudiar l'estructura de la CA. [96] Els més nombrosos són els estudis de NMR de carboni 13, si bé també han aparegut estudis de NMR de protó, nitrogen i fluor. En els estudis de NMR ^{13}C es sol substituir el Zn^{+2} per Cu^{+2} o Co^{+2} degut a que la CA substituïda té una activitat catalítica menor i com a conseqüència, dona lloc a temps de vida més llargs per als intermedis que apareixen en el procés. En aquest cas és possible diferenciar l'intermedi que conté CO_2 del que té HCO_3^- , ja que s'obtenen dues línies diferents ($\delta_{CO_2}=125$ ppm i $\delta_{HCO_3^-}=162$ ppm), d'intensitats i d'amplades diferenciades (el HCO_3^- dona una línia més gruixuda). [97] Si no es fa la substitució del zinc per un altre metall i s'utilitza CA nativa s'observa una sola línia que representa un promig entre la senyal de CO_2 i la de HCO_3^- . [98] Mitjançant aquesta tècnica s'ha detectat que la distància promig entre el carboni del CO_2 i el Cu^{+2} de la CA substituïda és de 3.2 Å. [97] Quan el metall que substitueix el Zn^{+2} és el Co^{+2} s'ha determinat que aquesta distància és de 3.6 ± 0.2 Å. [99] Aquests valors són compatibles amb l'existència d'un anió bicarbonat directament unit al metall i d'un CO_2 que es trobaria dissolt en la cavitat de l'enzim a una distància prou propera per poder rebre l'atac nucleofílic del grup OH^- directament coordinat al Zn^{+2} i formar el HCO_3^- . Aquest CO_2 podria estar o no directament coordinat al metall. Aquests resultats indiquen que la interconversió $CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^-$ té lloc a través d'un mecanisme d'esfera interna, i semblen descartar un possible mecanisme en el que una molècula d'aigua fent de pont entre el grup hidroxílic i el CO_2 sigui l'agent nucleofílic. [97,99-102] L'estudi NMR ^{13}C ha permès també determinar que molts inhibidors monoanionics s'uneixen al metall en una cinquena coordinació [97] tal com ja havíem prèviament comentat. Finalment ens cal esmentar un estudi de NMR ^{13}C [103] sobre l'efecte de la concentració del buffer en la velocitat d'interconversió entre

el CO_2 i el HCO_3^- , que va portar a Lindskog a considerar que la interconversió del CO_2 a HCO_3^- es fa sense cap tipus de transferència protònica. Aquest és el anomenat mecanisme de Lindskog [104] en contraposició amb el conegut mecanisme de Lipscomb on la interconversió $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$ es realitza a través d'una transferència protònica. Tractarem amb detall aquests dos mecanismes més endavant.

Els estudis que s'han fet de NMR ^1H [105,106] han permès apreciar diferències notables en l'espectre de la CA quan conté Zn^{+2} o quan aquest s'ha substituït per Co^{+2} , el que fa pensar que no sempre els resultats obtinguts en CA substituïdes poden ésser directament extrapolables a la CA nativa. En aquests estudis s'han constatat canvis importants en l'espectre en presència d'inhibidors com azides, sulfonamides o acetazolamides. Per altre costat, mitjançant NMR ^{15}N s'ha assenyalat la capacitat que tenen els compostos nitrogenats d'inhibir la CA en coordinar-se al centre actiu de l'enzim. [107] S'ha treballat també amb NMR de fluor-19 en estudis d'inhibició de la CA per sulfonamides fluorosubstituïdes, [108] observant-se que, en aquest cas, la relació estequiomètrica inhibidor-enzim és de 2:1. Les sulfonamides es situen en el centre actiu sense necessitat de distorsionar-lo massa i donant lloc a una estructura de bipiràmide trigonal al voltant del zinc.

Tots aquests estudis espectroscòpics han permès determinar l'estructura de l'enzim i d'alguns dels intermedis que es formen en el procés de catàlisi. Els estudis cinètics i termodinàmics que comentarem en la propera secció tot sovint permeten aventurar més d'un possible mecanisme de catàlisi. Alguns d'aquests mecanismes es podran descartar en base als resultats que hem presentat en aquest apartat.

1.2.2 ESTUDIS DEL MECANISME D'ACCIO CATALITICA

Presentarem aquí els estudis realitzats per tal de determinar el mecanisme d'acció de la CA en la hidratació del CO_2 . Els separarem en dos grans grups: el primer d'ells contindrà els estudis termodinàmics encaminats a obtenir valors de constants d'acidesa i entalpies de reacció, mentre que l'altre grup estarà format pels treballs cinètics i més concretament per aquells que determinen constants de velocitat a partir de la mesura de la variació al llarg del temps de propietats físiques o químiques del sistema. Tractarem també en aquest segon apartat dels estudis d'inhibició de l'enzim, de la influència dels buffers, dels efectes d'isòtop, de substitucions de diferents fragments de la CA, i del comportament de models artificials d'anhidrasa carbònica que s'han utilitzat per verificar algun aspecte puntual del mecanisme de reacció.

1.2.2.1 Estudis termodinàmics

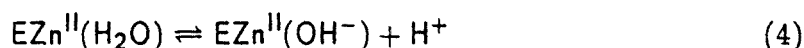
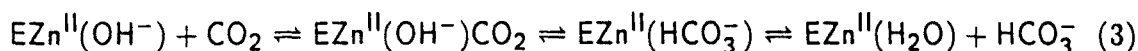
Els estudis termodinàmics han portat a determinar un valor del $\text{p}K_a$ per a l'anhidrasa carbònica de 7.5, [109,110] que correspon a la pèrdua d'un protó de l'aigua directament unida al Zn^{+2} . Per la seva banda, Rowlett i Silverman troben que el $\text{p}K_a$ del grup que s'ionitza en l'enzim és de 7.6 ± 0.6 , [111] mentre que Kaiser i Lo [112] donen un valor de 7.3 per al mateix cas. Perrin [113] ha determinat un valor de 8.96 per al $\text{p}K_a$ a 25 °C de la reacció d'hidròlisi $\text{Zn}_{\text{aq}}^{+2} \rightarrow \text{ZnOH}^+ + \text{H}^+$. Així mateix ha mostrat que el ΔH° per aquesta reacció és de 13.4 kcal/mol i que ΔS° és pràcticament nul. Comparant el $\text{p}K_a$ de l'aigua unida al Zn^{+2} quan aquest està solvatat per sis molècules d'aigua, amb el de l'aigua unida al Zn^{+2} en la CA, s'observa com en l'enzim la desprotonació d'aquesta aigua està molt més afavorida. Ja hem esmentat

que aquesta desprotonació en la CA és necessària per obtenir l'espècie catalíticament activa.

Aquest valor experimental del pK_a de la CA es fa servir per jutjar la validesa de models de CA sintetitzats artificialment. Per a un model molt aproximat de CA amb cinc lligands coordinats, Woolley [72] troba uns valors de $pK_a = 8.69$ i $\Delta H^\circ = 7.1 \pm 1$. Chin i Zou [114] presenten un model de CA amb un pK_a de 8.6 molt semblant al del model de Woolley. Un model molt recent de CA més proper a l'enzim real [115] dóna 7.3 com a valor del pK_a a 25 °C i 0.1 de força iònica (NaClO_4). Per la seva banda, Harrowfield [110] presenta un model de CA substituïda amb Co^{+2} que té un valor de pK_a de 6.4 a 25 °C i força iònica d'1.0. Més interessant és el treball de Coates *et al.* [116] on mostra que per al seu model de CA el pK_a canvia de 10.3 a 9.0 a 25 °C quan augmenta la presència de grups hidròfobs al voltant del Zn^{+2} . Segons els autors, aquests grups provoquen que hi hagi menys molècules d'aigua al voltant del metall i en conseqüència que disminueixi la densitat electrònica sobre el Zn^{+2} . Això facilita la desprotonació de l'aigua, de manera que s'obté un pK_a més petit per a la seva dissociació. Així segons els autors, la presència de grups hidròfobs propers al centre actiu explicaria el baix pK_a que es troba per a la CA nativa. Finalment, comentarem un estudi molt interessant de Kimura *et al.* [117] on es demostra experimentalment en un model de CA que el pK_a de l'aigua unida al Zn^{+2} canvia de 7.5 a 10.7 quan un cinquè lligand aniònic s'uneix a l'esfera de coordinació de l'àtom metàl·lic. Això permet explicar l'efecte inhibidor de molts anions que actuen augmentant la densitat electrònica sobre el Zn^{+2} i per tant bloquejant la ionització de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ per donar l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$.

1.2.2.2 Estudis cinètics

Passem a presentar ara els treballs més rellevants publicats que fan referència a la cinètica de l'anhidrasa carbònica. En la figura 2 es presenten les diferents etapes acceptades universalment per a la reacció d'hidratació del CO_2 catalitzada per la CA, i que es poden esquematitzar per les equacions: [71]



Aquest conjunt de reaccions impliquen un atac nucleofílic del $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ al CO_2 per donar el HCO_3^- i la desprotonació de l'aigua per recuperar l'espècie catalíticament activa. La interconversió del CO_2 a HCO_3^- es troba separada de la recuperació de l'espècie catalíticament activa $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$. A aquest mecanisme separat en dues semireaccions, com són la hidratació i la desprotonació, es diu que segueix una cinètica ping-pong, donat que sempre té lloc un procés després de l'altre, i mai els dos alhora. Aquest tipus de cinètica és acceptada com a vàlida i defensada per la major part dels investigadors que treballen en aquest camp.

Malgrat l'acord general en l'esquema de la figura 2, hi ha diferents hipòtesis sobre com es desenvolupa cadascuna de les etapes. On hi ha una controvèrsia més gran és en el mecanisme de l'etapa tercera, la formació del bicarbonat. Es sap que el HCO_3^- coordinat al Zn^{+2} acaba tenint el seu protó enllaçat a un oxigen que no està coordinat al Zn^{+2} , tot i que aquest protó és el que formava part inicialment de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$. S'han proposat dos mecanismes per explicar aquest fet, que es troben esquematitzats en la figura 3. En ambdós mecanismes primer es produeix l'atac nucleofílic del grup $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ al CO_2 . En el mecanisme proposat per Lipscomb, [118] després d'aquest atac, té lloc la transferència intramolecular del protó entre

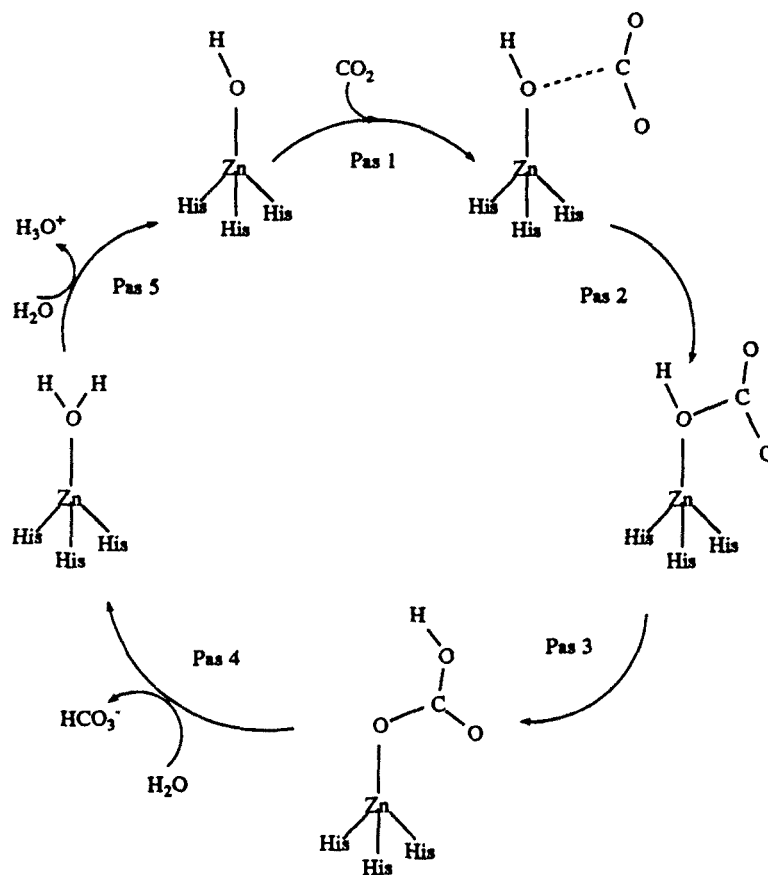


Figura 2: Esquema dels passos generals de reacció en la CA.

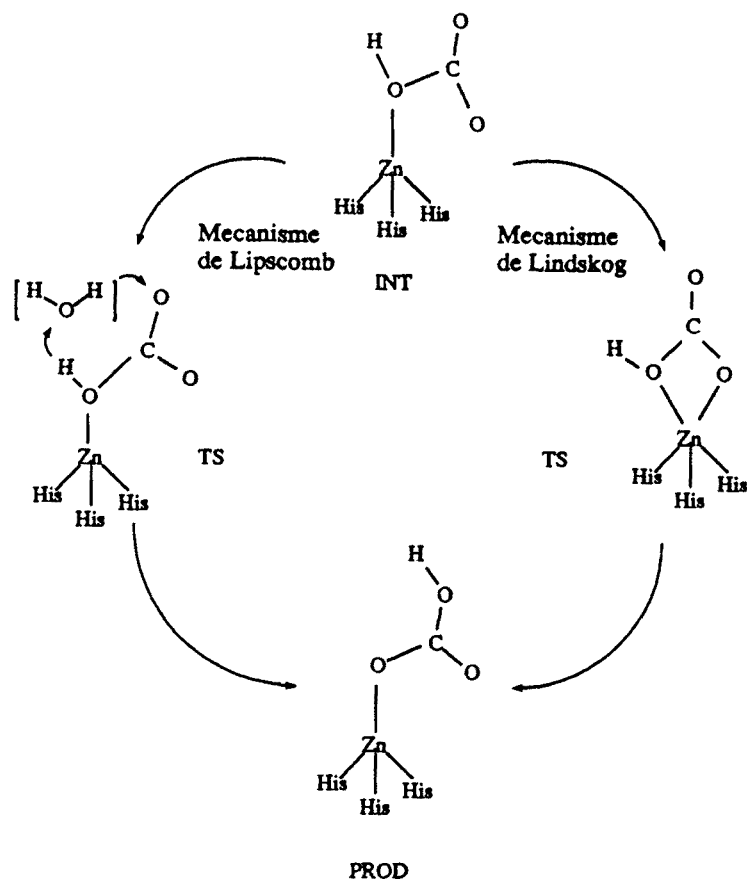


Figura 3: Mecanismes de Lindskog i Lipscomb per a la formació de HCO_3^- .

dos oxígens. Per contra, en el mecanisme de Lindskog [104] no hi ha transferència protònica, sinó un canvi en l'oxigen coordinat al Zn^{+2} .

Una tècnica experimental emprada per determinar el mecanisme d'acció catalítica de la CA ha estat substituir algun grup químic per tal de desvelar la importància de la seva participació en el mecanisme d'hidratació del CO_2 . Començarem comentant dos articles de gran transcendència per determinar el mecanisme de reacció de la CA on es presenten resultats lligats a aquesta tècnica.

En el primer, [119] s'estudia el procés de deshidratació del HCO_3^- en presència

de la CA quan el protó del bicarbonat s'ha substituït per algun grup alquílic (des de metil a n-pentil). S'observa que la constant de velocitat del procés de deshidratació del HCO_3^- que és de $3.9 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ passa a ésser de $1.4 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ per a espècies del tipus ROCO_2^- , és a dir, que la catàlisi de la descomposició dels carbonats d'alquil en presència de CA és d'uns cinc ordres de magnitud menys eficient que la catàlisi de la deshidratació del HCO_3^- sota condicions comparables. Això permet deduir que el protó del HCO_3^- realitza una funció crítica en el procés de catàlisi. Aquest fet sembla afavorir el mecanisme de Lipscomb, on hi ha una transferència protònica intramolecular, enfront del mecanisme proposat per Lindskog (veure figura 3).

Tot i que està plenament acceptat que la recuperació de l'espècie activa es fa mitjançant la desprotonació de l'aigua coordinada al Zn^{+2} , hi ha controvèrsia sobre quin és el receptor d'aquest protó, ja que hi ha més d'un candidat per rebre'l. En l'altre article que volíem comentar Tu *et al.* [120] estudien la hipòtesi que la transferència protònica es faci a la His-64. El que fan és substituir aquesta histidina per una al·lina, que no pot participar en la transferència protònica. Observen que en absència de solució esmorteïdora la velocitat de la reacció de la CA amb Ala-64 disminueix en un factor de 20 respecte a la nativa. En presència de buffer, el canvi no és tan notable, donat que la transferència es produeix per un camí alternatiu des del centre actiu al buffer a través d'una cadena de molècules d'aigua. L'eficiència d'aquest camí alternatiu no és tan gran, i depèn de la naturalesa química del buffer utilitzat. La principal conclusió a la que arriben és que la His-64 en la CA nativa funciona com a acceptora de protons, proporcionant un eficient camí de reacció per a la transferència protònica entre el centre actiu i el buffer. Per un altre costat, mostren com l'enzim modificat amb Ala-64 no s'inhibeix en presència de Cu^{+2} , el que està perfectament d'acord amb el fet que aquest metall divalent inhibeix la CA nativa per interacció amb la His-64, tal com havien demostrat Eriksson *et al.* [79] amb la tècnica de Raigs-X

i també Tu, Wynns i Silverman [92,121] mitjançant la tècnica de marcatge isotòpic. Cal dir que el principal resultat d'aquest darrer treball es contradiu amb el que havien obtingut amb anterioritat Forsman *et al.* [122] mitjançant la substitució de la His-64 per glutamina, àcid glutàmic, lisina i alanina. Aquests autors havien trobat que la velocitat de reacció en aquests casos es modificava en un factor de només 1.5-3.5 respecte a l'enzim natiu, i que per tant, no semblava que la His-64 tingués un paper essencial en l'activitat de la CA. Tanmateix cal fer notar que la diferència de tamany entre la histidina i l'alanina és prou important com per pensar que el canvi d'una per l'altra facilitarà l'entrada de molècules de buffer externes al centre actiu, i en conseqüència augmentarà la importància relativa de la transferència protònica intermolecular. D'aquí que una bona mesura de l'efecte de la modificació s'ha de fer en absència de buffer extern, tal i com fan Tu *et al.* [120] en comparar la CA nativa amb la mutant.

Altres autors han utilitzat la combinació d'indicadors i espectrofotòmetres per seguir la cinètica de la reacció d'hidratació del CO_2 catalitzada per la CA i estudiar el comportament de l'enzim sota diferents condicions. Així, Rowlett i Silverman [111] estudien la interacció del buffer extern amb la CA a 25 °C i 0.2 de força iònica (Na_2SO_4), per a un ampli rang de pH. Utilitzen també diferents buffers i observen que per a concentracions de buffer inferiors a 12 mM l'etapa limitant de la catàlisi és la transferència protònica intermolecular de la CA al buffer, la velocitat de la qual depèn de la diferència de pK_a entre l'espècie donadora i l'acceptora, de manera idèntica al que passa en les transferències protòniques entre molècules petites. Pel cim de concentracions de buffer 12 mM la velocitat de reacció no es veu afectada per la concentració de buffer, tal com ja havien posat de manifest Silverman i Tu [73] en un estudi preliminar. Cal dir que la transferència intermolecular directament al solvent, sense passar per un buffer extern, no es considera probable donat que no

permet explicar la gran velocitat de catàlisi que mostra aquest enzim. En un article de 1987, [123] Pocker i Miao subratllen la importància de mantenir la força iònica constant quan es treballa amb la CA, degut als importants canvis que es produeixen en les constants de velocitat en variar les concentracions de sal. Això està d'acord amb el fet que la major part de reaccions químiques en solució on intervenen dues espècies carregades es veuen afectades de forma considerable per la força iònica del medi.

Com ja s'ha anat veient, estudis de Raigs-X, cinètics, substitucions, i altres, suggereixen fortament que la His-64 juga un paper primordial com a transmissor de protons des del centre actiu al buffer extern. De fet, Tu i Silverman [89] han demostrat que la transferència protònica des del centre actiu a la His-64 és el pas limitant de la reacció a concentracions de buffer suficientment altes. Un cop establert el paper de la His-64 hi ha un altre aspecte a aclarir. Tal com es pot veure en l'esquema del centre actiu de la CA en la figura 1, la histidina es troba bastant allunyada de l'aigua que li ha de transferir el protó. Això ha fet pensar que aquesta transferència es fa mitjançant una cadena de molècules d'aigua. Pocker i Janjić en un article recent [124] determinen que l'equació de velocitat del procés depèn de la concentració d'aigua elevada al quadrat, i per tant dedueixen que són dues les molècules d'aigua que actuen com a pont entre l'aigua directament unida al Zn^{+2} i la His-64 (veure figura 4).

Un aspecte bàsic de l'estudi d'un mecanisme de reacció és la determinació de l'etapa limitant del procés. La mesura d'efectes d'isòtop mitjançant l'ús de deuteri, de la constant de velocitat de la hidratació del CO_2 catalitzada per la CA, a concentracions de buffer altes, indica que la transferència protònica per generar l'espècie activa és el pas limitant d'aquest procés. Steiner, Jonsson i Lindskog [125] van ésser els primers en observar aquest efecte. Dos anys més tard, Pocker i Bjorkquist [126] varen confirmar aquest resultat obtenint una relació entre les constants d'hidratació

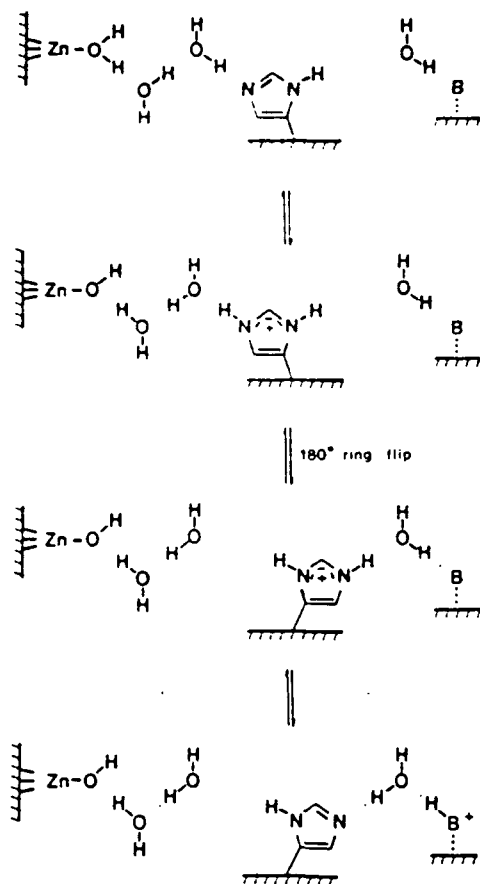


Figura 4: Mecanisme de protonació i desprotonació en el centre actiu de la CA, proposat per Pocker i Janjić. [124]

en solució d'H₂O o D₂O de 3.3 per al procés de deshidratació del HCO₃⁻ i de 4.3 per al del DCO₃⁻. Més ençà, [127] s'ha comprovat que l'efecte d'isòtop primari ha d'ésser degut a la transferència de més d'un hidrogen en l'estat de transició, i en conseqüència, aquests autors han suggerit que la transferència protònica limitant del procés s'ha de produir a través d'una cadena de dues o tres molècules d'aigua, tal com han proposat altres autors a partir d'altres tècniques en treballs ja comentats.

Des de sempre ha interessat molt el tema de la inhibició de la CA i la seva relació amb el mecanisme catalític. Un dels primers treballs sobre el tema és el de l'any 1959 de Davis [128] on estudia la inhibició de la CA per la sulfonamida i el sulfur de sodi. L'autor suggereix que l'inhibidor podria unir-se directament al metall, si bé no ho demostra. Aquest és un treball important donat que és el primer cop que es proposa la formació de l'espècie activa EZn^{II}(OH⁻) com a pas del procés de catàlisi (l'anomenat mecanisme de l'hidròxid de zinc). Així mateix de les seves experiències amb inhibidors, dedueix que el CO₂ no s'uneix directament al metall. Aquest punt s'ha posat més endavant de manifest amb les tècniques de NMR i IR tal com ja hem apuntat amb anterioritat. Al llarg d'aquests darrers anys s'ha anat estudiant l'efecte de diferents inhibidors a diferents pH's, com ara l'acetat, el cianat, les azides, el bicarbonat, el iodur i tota una sèrie de sulfonamides. [70,129] D'entre ells, s'ha vist que l'acetazolamida és un dels inhibidors més potents que s'han trobat per a aquest enzim, i s'utilitza actualment per al tractament de la glaucoma. Els articles més interessants sobre la inhibició de la CA han estat els publicats per Pocker i Deits. [130,131] En els seus treballs proposen un mecanisme d'inhibició aniònica a pH baixos diferent del que té lloc a pH alts. Així a pH baixos, l'anió inhibidor s'uneix al EZn^{II}(H₂O) en una cinquena coordinació, i impedeix la desprotonació de l'aigua per donar l'espècie activa EZn^{II}(OH⁻). A pH bàsics, tenim l'espècie EZn^{II}(OH⁻) ja formada, i el mecanisme d'inhibició ha d'ésser diferent. Els autors consideren que el Zn⁺² com a molt

pot acomodar un lligand amb càrrega negativa en la seva esfera de coordinació, i per tant en aquestes condicions l'inhibidor aniònic no pot coordinar-s'hi. Segons els autors aquest fet explicaria el perquè no existeixen inhibidors dianiònics. En l'espècie $EZn^{II}(OH^-)$ l'elevada densitat electrònica al voltant del Zn^{+2} impedeix que altres anions es puguin acomodar a la seva esfera de coordinació. Ara bé, l'aproximació del CO_2 al centre actiu i l'atac nucleofílic del $EZn^{II}(OH^-)$ a aquest centre disminueix la densitat de càrrega sobre l'àtom metàl·lic, i permet la coordinació d'una molècula d'inhibidor aniònic, que en un subseqüent pas del mecanisme de reacció impedirà la transferència protònica per generar l'espècie activa, i així es bloquejarà el procés de catàlisi.

Sovint, treballar directament amb l'enzim per resoldre segons quin tipus de problemes mecanístics pot ésser massa complicat degut a la suma de factors que hi intervenen, i que poden arribar a amagar o emmascarar el factor decisiu. Per això, en alguns casos, s'ha intentat treballar a nivell experimental amb models d'enzim, que siguin sistemes d'estructura senzilla, fàcils de manipular i estudiar, i que simulin el millor possible el màxim número de propietats de l'enzim. Aquests models són utilitzats per comprovar certes hipòtesis difícils de verificar en l'enzim mateix. En cas que l'experiència feta amb el model resulti exitosa, no podrem assegurar que l'enzim actui d'aquella mateixa manera, però sí que la possibilitat que així sigui es veurà reforçada. Precisament, el disseny i la síntesi en el laboratori de molècules anomenades enzims químics, que presenten les propietats catalítiques dels enzims naturals, és en l'actualitat un camp de gran interès.

S'han estudiat diferents models de CA. Els metalls més emprats han estat el Co^{+3} i el Zn^{+2} . Referent als models de Co^{+3} cal comentar el de Harrowfield *et al.* [110] utilitzat per comparar les hipòtesis del mecanisme de l'hidròxid de zinc i la de l'imidazolot de zinc en una hidròlisi d'un acetat. En el primer mecanisme es postula que és el grup

CoOH^{+2} (i en general qualsevol MOH^{+}) el que actua de nucleòfil atacant a l'acetat, mentre que en el segon es postula que el nucleòfil és el grup CoIm^{+2} . Els autors troben que ambdós complexos catalitzen el procés, si bé el primer es pot tenir en concentracions importants a un pH superior a 6.4, mentre que el segon necessita un pH de 10.0, molt més bàsic, fet que suggereix que el mecanisme de l'hidròxid de zinc és el més probable en les condicions d'actuació habituals de l'anhidrasa carbònica nativa. Reforçant aquest resultat, Groves i Baron [132] troben a partir d'un model de Co^{+3} que la hidròlisi intramolecular d'amides és només explicable a través del mecanisme de l'hidròxid de zinc.

Més interessants semblen els models on el metall és el propi Zn^{+2} . Un dels primers en utilitzar models de Zn^{+2} per simular el comportament de la CA, va ésser Woolley en diferents treballs on va estudiar la capacitat del seu model per hidratar aldehids. [45,46,133] En un article de revisió de l'any 1975, [72] el propi autor mostra la validesa del mecanisme de l'hidròxid de zinc per explicar els resultats cinètics obtinguts amb el seu model, i demostra que el complex $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^{-})$ és un nucleòfil prou potent com per catalitzar la hidratació d'aldehids i del CO_2 . Aquest model ha estat utilitzat posteriorment per Gellman *et al.* [42] en l'estudi del mecanisme d'hidròlisi d'un fosfat. En aquest cas, la gran efectivitat cinètica assolida indica la probable actuació d'un mecanisme bifuncional on el grup ZnOH^{+} actuaria com a nucleòfil, mentre que el zinc actuaria a la vegada com a catalitzador electrofílic. El principal inconvenient d'aquest model és que no s'ajusta massa bé als valors termodinàmics i cinètics de la CA, degut a que en ell el Zn^{+2} es troba pentacoordinat per una aigua i quatre lligands nitrogenats, a diferència del que passa en la CA on el Zn^{+2} està tetracoordinat. Molt recentment, Kimura *et al.* [115] han presentat un model de CA, millorant-ne un d'anterior dels mateixos autors, [117] que presenta valors cinètics i termodinàmics molt semblants als de la CA nativa. Amb aquest model han estudiat la hidratació de l'acetaldehid i la

hidròlisi de l'acetat de metil, i també han realitzat investigacions sobre la conducta del seu model davant els inhibidors aniònics típics de la CA, i han arribat a la conclusió que el seu és un model que s'ajusta molt a les propietats estructurals i cinètiques de la CA nativa, i que per tant, és vàlid per ésser utilitzat en futurs treballs sobre el tema.

1.2.3 SUMARI DE RESULTATS EXPERIMENTALS

En l'apartat anterior hem comentat els treballs experimentals més rellevants que s'han dut a terme amb la CA, juntament amb les conseqüències que se n'han pogut extreure pel que fa al seu mecanisme d'acció catalítica, agrupant els treballs presentats segons la tècnica de treball utilitzada. Volem ara recollir totes aquestes dades que hem anat donant en un resum que ens permeti assenyalar els aspectes més ben coneguts del mecanisme de reacció de la CA i els que resten encara per determinar.

L'estructura tetracoordinada del centre actiu de la CA ha estat obtinguda a partir d'estudis de Raigs-X, i no sembla que hi hagi cap dubte que el zinc del centre actiu es troba coordinat a tres grups imidazol de les His-94, His-96 i His-119, i a una molècula d'aigua. Per la seva banda, el mecanisme de l'hidròxid de zinc, [134] proposat per primer cop per Davis a partir d'uns estudis d'inhibició de l'enzim, està també àmpliament recolzat per una sèrie de treballs termodinàmics i cinètics, entre els que cal destacar els estudis que s'han dut a terme utilitzant models de CA i que ja hem exposat anteriorment. En aquest mecanisme es postula que és un grup hidroxil unit directament al zinc el que actua com a nucleòfil en la reacció d'hidratació del CO_2 , i que, per tant, és el $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ l'espècie activa.

En general, s'ha de dir que les diferents etapes de la reacció d'hidratació del

CO_2 catalitzada per la CA que s'han presentat en la figura 2 es troben acceptades per quasi tota la comunitat científica que treballa en el tema, si bé queden aspectes del mecanisme per aclarir. En aquest punt, dividirem les etapes de la figura 2 en quatre parts, i passarem a comentar posteriorment els resultats més importants que es tenen de cadascuna d'elles. La subdivisió que anem a proposar és la següent: (a) apropament del CO_2 al centre actiu (pas 1, figura 2); (b) atac nucleofílic del grup $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ al CO_2 per donar HCO_3^- (passos 2 i 3, figura 2); (c) entrada de l'aigua i sortida del bicarbonat (pas 4, figura 2); i (d) desprotonació de l'aigua per regenerar l'espècie catalíticament activa (pas 5, figura 2).

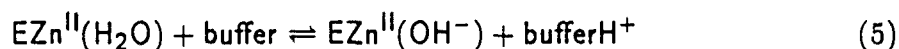
Pel que fa a l'apropament del CO_2 al centre actiu de l'enzim, s'ha d'assenyalar que continua sense resoldre's la problemàtica de si, en aquesta primera etapa del mecanisme proposat, el CO_2 s'uneix directament al Zn^{+2} en una cinquena coordinació, o si per contra únicament es situa prou proper al grup hidroxil per rebre el seu atac, però sense coordinar-se directament al metall. En el seu treball pioner sobre inhibició aniónica, [128] Davis suggereix que el CO_2 s'uneix directament al metall. Posteriorment, estudis d'IR [93] han indicat que el CO_2 pràcticament no es troba deformat en aquest estadi inicial de la interacció amb l'enzim, el que semblaria recolzar la no interacció directa del CO_2 amb el metall. Per la seva part, estudis de NMR ^{13}C en una CA substituïda amb Cu^{+2} [97] donen una distància Cu-C de 3.2 Å i en una CA substituïda amb Co^{+2} [133] s'obté una distància Co-C de 3.6 ± 0.2 Å. Ambdós valors estan d'acord amb la hipòtesi d'un bicarbonat unit al metall, i un CO_2 dissolt en la cavitat de l'enzim coordinat o no al metall. La coordinació del CO_2 al metall és, doncs, un punt que resta per clarificar.

Quant a l'atac nucleofílic del grup $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ al CO_2 s'han proposat dos mecanismes que són els anomenats mecanisme de Lindskog i mecanisme de Lipscomb (veure figura 3). En el primer no hi ha transferència protònica intramolecular i com

ja s'ha dit va ésser proposat per Lindskog a partir d'uns estudis de NMR ^{13}C . [103] Per la seva part, en el mecanisme de Lipscomb sí que hi ha transferència protònica a més de l'atac nucleofílic inicial, el que permet explicar els resultats de les experiències de substitució del protó del bicarbonat per algun grup alquil, [119] que indiquen que la velocitat de deshidratació del grup ROCO_2^- és per terme mig cinc ordres de magnitud més petita que la del HCO_3^- , el que demostra la importància del protó en aquest procés. La controvèrsia sobre aquest punt no està encara tancada.

El tercer pas que és l'entrada de l'aigua i sortida del bicarbonat ha estat el menys estudiat fins ara. Només coneixem la publicació d'un article sobre el tema, [85] realitzat a partir de la tècnica de ressonància de spin electrònica, on es comprova la formació d'un complex pentacoordinat durant aquesta etapa. Per la seva banda, la publicació de nombrosos estudis de Raigs-X i espectroscòpia electrònica que fan referència a l'existència de complexos de zinc pentacoordinats reforça aquesta hipòtesi. Continua resultant fosc com pot intercanviar-se un lligand aniònic com l' HCO_3^- fortament enllaçat al Zn^{+2} , per un de neutre com és l' H_2O .

El quart pas, que correspon a la desprotonació de l'aigua per regenerar l'espècie catalíticament activa, ha estat potser el més estudiat. Ha estat plenament demostrat a partir d'efectes d'isòtop [125] i altres treballs cinètics que aquest és el pas limitant del procés. Sembla clar que la reacció global en aquest pas és la (5):



si bé, abans que el protó es transfereixi al buffer, hi ha una transferència intramolecular de l'aigua a la His-64 que actua com a transportadora d'aquests protons. La importància de la His-64 en el mecanisme catalític ha quedat perfectament palesa a partir d'estudis de substitució de la His-64 per altres grups, [120] estudis d'inhibidors catiònics com el Cu^{+2} o el Hg^{+2} , [79] estudis de marcatge isotòpic, [92,121] i també

d'espectroscòpia electrònica. [84] Estudis cinètics i d'efectes d'isòtop [124,127] han demostrat que la transferència protònica intramolecular de l'aigua unida al Zn^{+2} a la His-64 es fa a través d'una cadena de dues molècules d'aigua. Finalment, cal ressaltar que a concentracions de buffer suficientment altes, l'etapa limitant del procés és la transferència intramolecular a la His-64, encara que per a concentracions de buffer inferiors a 12 mM l'etapa limitant és la transferència protònica intermolecular a les molècules de buffer extern. [111]

Destacarem també la gran quantitat d'experiments que s'han portat a terme en el camp dels inhibidors de la CA. S'ha treballat amb Raigs-X, [79,82] espectroscòpia electrònica, [74,84] NMR de diferents isòtops [97,108] i també a nivell cinètic, i s'ha determinat que la major part d'inhibidors monoaniònics s'uneixen en una cinquena coordinació al Zn^{+2} impeding la regeneració de l'espècie activa $EZn^{II}(OH^-)$, o bé desplaçant l'aigua unida directament al zinc, i mantenint la tetracoordinació al voltant del metall. En casos particulars, com l'imidazol o el bicarbonat, s'ha trobat que la seva inhibició segueix altres mecanismes. S'ha assenyalat també l'existència d'inhibidors catiònics com el Hg^{+2} o el Cu^{+2} que interaccionen amb la His-64 impeding la transferència protònica intramolecular.

Finalment, ens cal parlar d'un dels aspectes més sorprenents i més complicats de la química enzimàtica, com és la gran especificitat tant de substrate com de metall que tenen els enzims. Ens fixarem més en l'especificitat del metall que és la més pròpiament relacionada amb l'enzim. A partir de la mera observació dels mecanismes de catàlisi és difícilment explicable l'especificitat enzimàtica. No s'entén com l'efecte que provoca un determinat metall en una reacció catalítica, no pot ésser produït per molts altres metalls en condicions similars. En general, s'ha de tenir en compte que l'especificitat no prové d'un sol factor, sinó que és la suma de molts factors el que pot fer que un determinat metall sigui insubstituïble. En el cas de l'anhidrasa carbònica

s'ha vist que el Zn^{+2} és el més eficient, i que l'únic metall, apart del Zn^{+2} , capaç de conferir-li una activitat biològica apreciable és el Co^{+2} . [72] En el nostre estudi no pretenem tractar l'especificitat de la CA per al Zn^{+2} , donat que és un problema en el que intervenen un número massa alt de factors per poder-los tenir en compte tots alhora des d'un punt de vista teòric. El que pretenem és estudiar el mecanisme d'actuació catalítica de la CA quan conté Zn^{+2} .

1.3 ESTUDIS TEORICS

L'important desenvolupament de les possibilitats informàtiques en els laboratoris de química teòrica d'arreu del món ha permès l'aparició d'un creixent nombre d'articles teòrics tractant el tema de l'anhidrasa carbònica.

Per trobar el primer article al respecte ens hem de remontar a l'any 1977 quan Pullman *et al.* [135] publicaren en el *J. Am. Chem. Soc.* un article pioner on feien un estudi teòric comparatiu de la dissociació de l'aigua i dels lligands imidazol en l'anhidrasa carbònica. Cal considerar aquest estudi com el precursor de molts altres que han seguit al llarg d'aquests tretze anys. És interessant constatar que des de l'any 1977 fins l'any 1990 s'han publicat un total de trenta articles teòrics sobre el tema. Concretament, quatre van aparèixer l'any 1981; un menys el 1979; durant els anys 1978, 1984, 1986, i 1988 van sortir dos articles teòrics per any; els anys 1977, 1982, i 1987 per altre costat varen donar fruit a un únic article per any; mentre que els anys 1980, 1983, i 1985 no va haver-hi cap publicació referent a la CA. Sorprenentment, l'any 1989 es van publicar fins a vuit articles teòrics sobre el tema i durant l'any 1990 ja n'han aparegut quatre. Hi ha doncs, un interès renovat, com una mena de 'boom' del tema, i més si tenim en compte la qualitat dels científics que estan treballant ara mateix en diferents projectes dins el camp de la química teòrica relacionats amb la CA. Per citar-ne alguns, podríem esmentar W.N. Lipscomb (Premi Nobel de Química 1976) que es troba treballant actualment a la Universitat de Harvard, R. Hoffmann (Premi Nobel de Química 1981) que ho fa a la Universitat de Cornell, o bé O. Tapia a la Universitat d'Uppsala.

Aquest interès es deu en part a què la reacció d'hidratació reversible del CO_2 per donar HCO_3^- és una de les més senzilles de tractar a nivell teòric degut al petit

número d'àtoms que intervenen en el procés. Aquesta no és, però, l'única motivació que mou als científics a interessar-se pel tema. Ja hem assenyalat en apartats anteriors la gran importància del zinc en molts de processos bioquímics. El coneixement del mecanisme d'actuació i inhibició de la CA pot ésser de gran ajuda des d'un punt de vista mèdic i farmacològic. Així, només a títol d'exemple ens podem referir a malalties conegudes com la glaucoma, causant d'un nombre importantíssim de cegueres en el tercer món, o l'epilèpsia. Actualment, s'utilitzen per al seu tractament inhibidors de la CA com l'acetazolamida, la metazolamida, i altres sulfonamides. Es d'esperar que el descobriment de nous inhibidors de la CA, preferentment irreversibles, permetin un més gran control d'aquestes enfermetats. Creiem que en aquest sentit els estudis teòrics com el present poden ésser de gran ajut.

Anem a presentar tot seguit els estudis teòrics publicats fins ara que tracten el tema del mecanisme de reacció en la CA. Ho farem dividint l'exposició en cinc apartats que corresponen a les diferents metodologies emprades per abordar la qüestió. Acabarem amb un ampli resum sobre l'estat actual dels coneixements de l'enzim des d'un punt de vista teòric.

1.3.1 POTENCIALS ELECTROSTATICIS

El mètode dels potencials electrostàtics moleculars permet correlacionar l'estructura amb l'activitat de les biomolècules. Per definició, el potencial en un punt de l'espai proper a una molècula és el treball necessari per portar la unitat de càrrega positiva des de l'infinit fins a aquell punt, assumint que aquesta càrrega no perturba el sistema que estem estudiant. Els mapes de potencial electrostàtic s'utilitzen bàsicament per determinar els punts d'atac nucleofílic o electrofílic més probables, per veure la formació d'enllaços d'hidrogen, per determinar possibles llocs de protonació

o per fer comparacions entre sistemes que presentin una estructura similar. Com a principal punt feble d'aquest mètode podem assenyalar la impossibilitat de determinar estats de transició, el que impedeix fer una discussió dels possibles mecanismes de catàlisi.

Habitualment, es parteix de l'estructura coneguda de la molècula a estudiar, prèviament determinada per Raigs-X o per algun mètode teòric. Tot seguit es procedeix a calcular les càrregues dels diferents àtoms a partir d'una anàlisi de poblacions de Mulliken obtinguts a partir d'algun dels mètodes teòrics, o bé es poden també extreure les càrregues d'alguns dels bancs de dades existents, com ara el Brookhaven Protein Data Bank (BPDB) o el Cambridge Structural Database. Si els sistemes no són molt grans també es suma al potencial el valor de la integral sobre la densitat electrònica. Finalment es computen els contorns d'isopotencial electrostàtic i es dibuixen els mapes dels llocs que més ens poden interessar, com ara els centres actius dels enzims.

L'estudi de la CA amb aquest mètode ha permès racionalitzar les diferències experimentals que existeixen entre els isoenzims HCAB i HCAC. Aquests dos isoenzims de la CA tenen una estructura semblant, si bé presenten diferents capacitats de catàlisi. Així, la HCAC és unes vint vegades més efectiva en la reacció d'hidratació reversible del CO_2 , mentre que la HCAB és més efectiva en algunes reaccions d'hidròlisi d'esters. Allen *et al.* [136,137] han comprovat que el centre actiu de la HCAB té un potencial electrostàtic més positiu que el de la HCAC, el que permetria explicar les diferències observades entre els dos isoenzims. Això també explicaria perquè la HCAB està més fortament inhibida per anions com el HCO_3^- , el Cl^- , o el I^- , mentre que la HCAC és més sensible a l'inhibició per sulfonamides o altres espècies neutres. [92]

1.3.2 MECANICA MOLECULAR

Els càlculs fets a partir de la mecànica molecular són extremadament ràpids i vàlids per estudiar sistemes tan grans com pot ésser un enzim. [138-143] En alguns casos (ex. hidrocarburs o silans) s'obtenen resultats de barreres de rotació tan acurats com els que es poden obtenir per aplicació dels millors mètodes *ab initio*. [144] Cal dir però que els mètodes basats en la mecànica molecular no representen bé les estructures en les que hi ha trencament-formació d'enllaços, donat que només estan parametritzats per als sistemes en geometries d'equilibri, i per tant no són massa vàlids per estudis de reactivitat perquè no simulen bé les propietats dels estats de transició; tampoc serveixen per estudiar espècies en estats excitats. En els treballs de mecànica molecular, a l'igual que en els de potencials electrostàtics, es parteix de la geometria experimental de l'enzim i es fa un càlcul previ per determinar les càrregues sobre els diferents àtoms. Posteriorment, es considera que la interacció entre els diferents àtoms de l'enzim ve donada per un determinat potencial en el que s'intenta recollir totes les interaccions més importants com ara les de tipus electrostàtic, forces de van der Waals o enllaços d'hidrogen, mitjançant fórmules senzilles i ràpides de computar. El següent pas consisteix en optimitzar la geometria del sistema per tal de refinar-la a partir dels potencials considerats, i arribar com a resultat final a una estructura de mínima energia que ens dóna informació sobre la geometria de la molècula en l'estat fonamental.

Per mitjà de la mecànica molecular s'ha estudiat la inhibició de la CA per sulfonamides, [145] i s'ha observat la formació de complexos pentacoordinats com a resultat de la interacció de la CA amb aquests inhibidors. L'estructura que sembla més favorable en aquests complexos és la de bipiràmide trigonal. Concretament, de les quinze estructures obtingudes per Vedani *et al.* com a resultat de la interacció de

diferents sulfonamides amb la CA, es troba que set d'elles presenten una estructura de bipiràmide trigonal, tres de piràmide de base quadrada, i per a la resta la diferència energètica entre aquestes dues possibles estructures és inferior a 1 kcal/mol.

Vedani ha presentat un nou programa de mecànica molecular [146] anomenat YE-TI que permet bones descripcions dels enllaços d'hidrogen gràcies a una expressió del potencial que recull bé la direccionalitat d'aquest enllaç. Aquest nou potencial l'ha aplicat a l'estudi de la CA i ha obtingut que l'aigua directament unida al Zn^{+2} forma un enllaç d'hidrogen amb el residu Thr-199, que a la vegada interacciona per enllaç d'hidrogen amb un oxigen carboxílic del Glu-106. L'altre oxigen forma un enllaç d'hidrogen amb la Tyr-7 i finalment una altra molècula d'aigua uneix la Tyr-7 i la His-64. Aquesta His-64 es troba a l'entrada de la cavitat del centre actiu i per tant en contacte directe amb les molècules de solvent dels voltants. La distància promig O-H que s'obté per a aquests enllaços d'hidrogen esmentats és de 1.82(1) Å, amb un angle \widehat{OHO} de 164(5)°.

També mitjançant aquest mètode s'ha estudiat la solvatació de la CA. [147] En particular, s'han considerat fins a 503 molècules d'aigua per representar l'estructura del solvent. S'ha determinat que aquestes molècules d'aigua presenten totes com a mínim un enllaç d'hidrogen, encara que la mitjana és de 2.2 enllaços d'hidrogen per cada molècula d'aigua. Cada enllaç d'hidrogen suposa una energia promig d'estabilització de 7.6 kcal/mol. Es troba que divuit d'aquestes molècules són internes, és a dir, interaccionen directament amb el centre actiu, mentre que el reste són superficials. Aquest estudi permet veure també que entre la molècula d'aigua unida directament al zinc i la His-64, s'hi troben un conjunt de molècules d'aigua que facilitarien la transferència protònica (pas 5, figura 2). Així mateix, obtenen una distància entre el zinc i el carboni del bicarbonat de 3.247 Å, en bona relació amb el valor que s'ha trobat per a la distància metall-carboni amb la tècnica de NMR ^{13}C que és de 3.20

Å com ja hem comentat anteriorment.

Per acabar, comentarem un article aparegut molt recentment [81] en el que els autors proposen un nou camp de força per modelar metalloproteïnes. Aquest nou potencial l'apliquen a l'estudi de la CA amb 501 molècules d'aigua que representen el solvent. Troben que la CA està tetracoordinada a tres histidines i una molècula d'aigua i que existeix també una altra molècula d'aigua situada a 2.918 Å en el que podria ésser una cinquena coordinació distant. Per una altra part, estudien l'enzim substituït amb Co^{+2} i troben que no hi ha diferències remarcables en l'estructura de l'enzim si el metall és Zn^{+2} o Co^{+2} . Concretament, en el cas del Co^{+2} donen una distància Co-C, quan s'ha produït la hidratació del CO_2 i ja hi ha HCO_3^- , de 3.156 Å valor molt proper a l'obtingut experimentalment amb NMR ^{13}C .

1.3.3 CALCULS SEMIEMPIRICS

Pel que fa a l'anhidrasa carbònica s'han fet càlculs semiempírics sobre el tema a partir de tres mètodes diferents. El més emprat ha estat el mètode PRDDO (partial retention of differential overlap) desenvolupat per Lipscomb i col·laboradors. [148,149] Aquest mètode reté únicament les integrals bielectròniques d'un, dos i tres centres de la forma $\langle X_{ia}X_{jb} | X_{kc}^2 \rangle$ a on X_{ia} és un orbital atòmic ortogonalitzat i centrat en l'àtom a. També reté les integrals d'intercanvi per a un i dos centres que tinguin la forma $\langle X_{ia}X_{ja} | X_{ia}X_{ja} \rangle$ i $\langle X_{ia}X_{ja} | X_{ia}X_{jb} \rangle$. S'ha demostrat que aquest mètode simula eficientment els resultats *ab initio* amb base mínima. Tal com asseguren els propis autors, el mètode PRDDO prediu barreres de reacció que no són massa acurades, encara que normalment dona l'ordre qualitatiu correcte. A més el mètode és especialment útil com a punt de partida per a l'estudi de la superfície de potencial a nivells de càlcul més sofisticats. També s'han utilitzat dos mètodes de l'escola de

Dewar, un l'anomenat AM1 [150,151] s'ha emprat per a un estudi molt complet de tot el cicle catalític de l'anhidrasa carbònica, i l'altre l'MNDO [152] que s'ha utilitzat per fer alguns càlculs de molècules que guarden certa relació amb estructures que apareixen al llarg del cicle catalític de la CA. En particular, els paràmetres per al zinc per a aquests dos mètodes es van publicar l'any 1986 per a l'MNDO [153] i l'any 1988 per a l'AM1. [154] Passarem a comentar els resultats més importants obtinguts per aplicació d'aquests mètodes semiempírics.

Els estudis del mecanisme de reacció de la CA emprant el mètode PRDDO els han portat a terme Liang i Lipscomb durant els anys 1986-1989. [80,118,155,156] En el primer article que varen treure sobre el tema [155] estudien el camí de reacció per a la hidratació del CO_2 amb H_2O i OH^- . En aquest treball es determina que la reacció del CO_2 amb l' OH^- té lloc en fase gasosa sense barrera energètica i que la barrera de 33 kcal/mol obtinguda per a la reacció del CO_2 amb l' H_2O prové principalment de les energies de deformació dels reactants. En el segon article, [118] fan un estudi de la reacció de transferència protònica interna en la CA (pas 3, figura 2). En aquest treball el centre actiu de l'enzim es simula amb la molècula $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$. Troben que els amoníacs transfereixen uns 0.8 electrons cap al zinc el que dificulta la transferència protònica en el HCO_3^- , necessària en el mecanisme de Lipscomb. La barrera per a la transferència protònica que a partir del complex inicial entre el CO_2 i el $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ dona lloc a la formació del $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$, és de 37.6 kcal/mol per a la reacció directa i 56.6 kcal/mol per a la reacció inversa. Es d'esperar que aquesta barrera disminueixi en presència de molècules de solvent que intervenen directament en el procés de transferència protònica. Concretament, els autors mostren com la barrera de 35.6 kcal/mol per a la transferència protònica en el HCO_3^- en fase gas, baixa a 3.5 kcal/mol quan hi intervé una molècula d'aigua en el procés i a 1.4 kcal/mol quan són dues les molècules d'aigua que hi intervenen. Encara que

no ho demostrin directament, els autors consideren que aquest resultat obtingut en el bicarbonat lliure és transferible al seu model d'enzim, i per això defensen el mecanisme de transferència protònica davant l'abans esmentat mecanisme de Lindskog (veure figura 3), donat que el primer es dona pràcticament sense barrera, i el segon implica una barrera del voltant de les 35 kcal/mol. Aquest darrer resultat l'obtenen a partir d'una simulació del centre actiu de l'enzim mitjançant el dicatió Be^{+2} , el que segons els autors és un bon modelador per a les barreres energètiques que s'obtenen en aquests processos. Com veurem en el capítol de resultats nosaltres no estem massa d'acord amb aquesta darrera afirmació.

En el tercer article de la sèrie, [156] es fa un estudi de la transferència protònica intramolecular entre l'aigua coordinada al Zn^{+2} i la His-64 (pas 5, figura 2). Altre cop, el centre actiu de l'enzim es simula amb la molècula $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$, mentre que la His-64 està modelada amb un grup amoníac. Troben que l'efecte estabilitzador més important per a la reacció de transferència protònica és el catió Zn^{+2} que disminueix el pK_a de l' H_2O i electrostàticament rebutja el protó i ajuda a la seva transferència. L'efecte dels lligands és contrari al del catió, donat que disminueixen la càrrega positiva del metall en uns 0.9 electrons, el que provoca una disminució notable dels efectes catalítics del metall. La barrera per a aquest procés és de 34 kcal/mol quan el zinc està tetracoordinat i de 54 kcal/mol quan el catió es troba pentacoordinat. Segons els autors el nombre de molècules d'aigua que hi hagi entre l' H_2O que sofreix la ionització i la His-64 no canvia massa els valors de la barrera energètica per a aquesta transferència protònica. Concretament, fan proves variant el nombre de molècules d'aigua des de zero fins a tres i troben que les diferències no són mai més grans de 5 kcal/mol. Finalment els autors consideren que amb bases més grans, energia de correlació i tractaments de tipus dinàmic, aconseguirien reduir la barrera per sota de les 10 kcal/mol que és el valor màxim acceptable des d'un punt de vista experimental.

Per acabar, en el darrer treball presentat fins ara per aquests autors, [80] es fa un recull de tots els resultats més importants obtinguts en els tres estudis anteriors. També s'apunta la geometria que hauria de tenir el CO_2 en l'intermedi que es forma en el pas 1 del procés de catàlisi per tal de poder-se reproduir el resultat d'IR de Riepe i Wang abans esmentat, [93] i que fa referència al petit canvi que s'observa en l'espectre IR quan el CO_2 es troba en contacte amb l'enzim en una primera fase d'interacció.

El treball presentat per Merz *et al.* l'any 1989 [157] és el més complet de tots els que s'han publicat fins ara utilitzant mètodes semiempírics per estudiar el mecanisme de reacció de la CA. Concretament, en aquest article es repasen tots els passos del cicle catalític emprant el mètode semiempíric AM1 i amb un model de CA força realista. En concret, substitueixen els grups histidínics per imidazols enlloc d'amoniacs com s'havia fet fins ara, donat que segons ells això condueix a resultats considerablement diferents. En l'article presenten estudis del procés d'hidratació del CO_2 , de l'entrada de l' H_2O i pèrdua de l'anió bicarbonat, i del pas de desprotonació de l' H_2O .

Respecte a la hidratació del CO_2 , els autors no són capaços de trobar un estat de transició corresponent al mecanisme de Lipscomb, però sí que presenten l'estat de transició AM1 del mecanisme de Lindskog, que es troba 13.1 kcal/mol pel cim dels reactius. Aquest valor és considerablement diferent al determinat per Lipscomb amb el mètode PRDDO i amb un model molt simplificat, que era de 35 kcal/mol. En l'estadi inicial de la interacció entre el $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ i el CO_2 (pas 1, figura 2) troben un intermedi en que el CO_2 està situat a més de 4.5 Å de l'àtom metàl·lic, que és difícilment justificable experimentalment, perquè com ja hem exposat, les dades de NMR ^{13}C indiquen una distància carboni-metall d'uns 3.2 Å. Mencionarem com

a punt interessant que observen que el mecanisme de Lindskog, a diferència del de Lipscomb, es troba inhibit per la presència de molècules d'aigua en el centre actiu, que experimentalment s'ha comprovat que hi estan presents en un número proper a deu. En particular, quan consideren la presència d'una molècula d'aigua troben un augment de 2 kcal/mol per a la barrera energètica de la reacció segons el mecanisme de Lindskog, respecte a la mateixa reacció sense aquesta molècula d'aigua addicional.

Analitzen també la formació del complex $EZn^{II}(HCO_3^-)(H_2O)$, resultat de l'entrada de l' H_2O en una cinquena coordinació del complex $EZn^{II}(HCO_3^-)$. Obtenen un complex pentacoordinat d'estructura de bipiràmide de base triangular. Per al procés de separació del bicarbonat no poden determinar cap estat de transició donat que la superfície de potencial és molt plana i per tant de difícil localització dels seus punts estacionaris. Sí que en canvi mostren com la presència de molècules d'aigua facilita enormement la pèrdua de l'anió bicarbonat.

Per acabar, discuteixen el mecanisme de desprotonació de l'aigua per donar l'espècie catalíticament activa $EZn^{II}(OH^-)$. Analitzen quatre possibilitats: la primera, és la transferència del protó de l'aigua unida al Zn^{+2} a una altra molècula d'aigua que es trobi situada en el centre actiu; la segona, és la donació d'aquest protó al grup Glu-106; la tercera, és la transferència a la His-64 a través d'una cadena de molècules d'aigua; i la darrera, és la possibilitat de desprotonació de l'aigua per transferència intramolecular del protó des d'aquesta fins al bicarbonat en el complex pentacoordinat. Troben que la primera possibilitat presenta una barrera apreciable que no canvia ostensiblement variant el nombre de molècules d'aigua que intervenen en el procés. Els resultats que obtenen per a la segona i tercera possibilitats no els permeten distingir quina de les dues possibilitats és la més favorable. Val a dir que els autors no van poder determinar l'estat de transició que correspon a la transferència del protó

des de l'aigua a la His-64, per la complexitat que això suposa donat que són moltes les variables que canvien simultàneament en l'estat de transició. Els autors, però, donen una barrera d'unes 18 kcal/mol per a aquesta transferència protònica a partir del que és el punt de més elevada energia en el perfil de reacció que construeixen i que hauria de correspondre a un punt proper a l'estat de transició. Per acabar, proposen com a darrera possibilitat la transferència del protó de l'aigua al bicarbonat en el complex pentacoordinat i la pèrdua posterior de l'àcid carbònic. Troben que aquest és el camí de mínima energia de tots els estudiats, però per contra aquest mecanisme falla en intentar explicar la cinètica ping-pong observada experimentalment, donat que el producte final no seria el bicarbonat sinó l'àcid carbònic. Justifiquen aquest mecanisme considerant que l'àcid carbònic alliberat pot ràpidament transferir el protó a la His-64, el que explicaria la presència experimental del bicarbonat. En qualsevol cas, cal tenir en compte que experimentalment no s'ha determinat mai àcid carbònic en el centre actiu de l'enzim i que per tant no sembla un mecanisme massa justificable.

El darrer càlcul semiempíric que hem de comentar és el portat a terme per Giessner i Jacob [67] amb el mètode MNDO. En aquest treball analitzen models teòrics de la termolisina. El més interessant pel que fa al nostre estudi, és la constatació que el complex pentacoordinat de Zn^{+2} amb cinc molècules d'aigua és més estable en una estructura de bipiràmide de base triangular que en una de piràmide de base quadrada. En qualsevol cas, la diferència energètica entre els dos és només de 3 kcal/mol. Posteriorment han reafirmat aquest resultat a nivell *ab initio*. [158]

1.3.4 CALCULS *AB INITIO*

S'han fet tota una gama de càlculs *ab initio* que fan referència a l'anhidrasa carbònica, tant a nivell all electron com usant pseudopotencials per tractar les capes internes del zinc. Alguns d'ells tracten únicament la reacció d'hidratació del CO_2 amb H_2O o OH^- sense tenir en compte per a res l'enzim i serà d'aquests dels que en parlarem en primer lloc. Comentarem després els estudis amb pseudopotencials portats a terme per Pullman *et al.* i estudis on es modela l'enzim amb càrregues electrostàtiques convenientment situades. Acabarem amb els estudis més recents d'un nivell de càlcul més sofisticat apareguts en els dos darrers anys.

Un dels primers articles que tracta la hidratació del CO_2 és el de Jönsson *et al.* [159] on s'estudia la reacció entre el CO_2 i l' OH^- per donar bicarbonat. Aquesta reacció té una barrera experimental de 43 kcal/mol. Tanmateix, teòricament i en fase gasosa surt que la reacció no té barrera i que espontàniament el CO_2 i l' OH^- reaccionen per donar HCO_3^- . Els autors argumenten que la diferència és deguda als efectes de solvatació, que són els que fan aparèixer la barrera en solució aquosa. El problema és que la desolvatació d'un grup com l'hidroxil, necessària perquè es dongui la reacció, és molt costosa des d'un punt de vista energètic. Aquests resultats els utilitzen per discutir el mecanisme d'actuació del Zn^{+2} en la CA. Segons els autors, l'enzim actuaria separant l'hidroxil de la seva esfera de solvatació, mantenint però el grup OH^- amb una nucleofilicitat prou gran com perquè el posterior atac del CO_2 es faci sense barrera.

Per la seva banda Jean *et al.* estudien en dos articles [160,161] la influència catalítica de cations positius en la reacció d'hidratació del CO_2 per donar àcid carbònic. Fent ús d'una base mínima troben que l'energia d'activació de la reacció en fase gas passa de 53 kcal/mol a 38.8 kcal/mol quan un catió NH_4^+ interacciona amb el CO_2

durant el transcurs de la reacció, i a 20.8 kcal/mol quan són dos els cations NH_4^+ que interaccionen amb el CO_2 . L'explicació del fenomen de la catàlisi per cations és que el grup NH_4^+ en interaccionar amb un oxigen del CO_2 deixa un carboni més positiu i per tant més fàcilment atacable pel nucleòfil que en aquesta reacció és l'aigua.

En una línia similar es troba un article de Nguyen i Ha. [162] En primer lloc, determinen que la barrera energètica de la reacció entre el CO_2 i l' H_2O per donar H_2CO_3 amb la base 3-21G és de 49.2 kcal/mol. Aquesta barrera passa a ésser de 15.5 kcal/mol quan intervé una altra molècula d'aigua en el procés d'hidratació del CO_2 , degut a la formació d'un anell de sis àtoms en l'estat de transició que presenta una tensió molt inferior a la de l'anell de quatre que es forma en l'estat de transició sense aquesta aigua addicional. El valor obtingut de 15.5 kcal/mol és molt proper al valor experimental de 17.7 kcal/mol. Cal assenyalar aquest estudi teòric com un dels primers a nivell *ab initio* en que s'observa una catàlisi bifuncional per part d'una molècula de dissolvent.

Els treballs de Pullman *et al.* [135,163-165] van ésser els primers en incorporar el dicatió Zn^{+2} en l'estudi de la hidratació del CO_2 . Cal ressaltar la gran importància d'aquests treballs, tant des del punt de vista de les conseqüències que s'extreuen sobre el mecanisme de reacció de la CA, com des d'una òptica històrica, doncs es tracta d'uns treballs pioners sobre l'estudi teòric a nivell *ab initio* de sistemes bioquímics.

En els dos primers estudis que van presentar [135,163] demostren que el Zn^{+2} facilita la reacció de dissociació tant de l'aigua com de l'imidazol i constaten que, a diferència del que passa quan aquestes molècules estan lliures, quan es troben unides al Zn^{+2} és menys costós energèticament dissociar l'aigua que l'imidazol (85.5 kcal/mol enfront a 163.4 kcal/mol, respectivament). Això els permet concloure que el grup enllaçat al Zn^{+2} que s'ionitza a un pK_a proper a 7, és més probable que sigui l'aigua

que un grup imidazol (les dues propostes d'ionització havien estat experimentalment apuntades amb anterioritat a aquest treball). També mostren com la força de l'enllaç entre el Zn^{+2} i els lligands considerats augmenta en l'ordre $CO_2 < H_2O < ImH < Im^- < OH^-$, en el mateix sentit que ho fa el terme coulòmbic de l'energia d'enllaç. Així mateix, troben que la transferència de càrrega dels lligands cap al metall va a espategar als orbitals $4s$ i $4p$ buits del zinc, i que la població electrònica dels orbitals d resta invariable, de forma que aquests orbitals d poden ésser considerats orbitals interns o de core. Finalment, els autors fan unes proves amb els pseudopotencials de Melius, Goddard i Kahn per representar la regió de core del Zn^{+2} , i arriben a la conclusió que els resultats quantitius i qualitius obtinguts amb pseudopotencials no difereixen en massa respecte als resultats all electron, i que per tant els pseudopotencials són aplicables en l'estudi del mecanisme de la CA.

En els seus dos estudis següents, [164,165] que són els més interessants al nostre entendre, apliquen aquests pseudopotencials per estudiar un model de centre actiu de la CA com és el sistema $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)$. En el capítol de resultats, en primer lloc, justifiquen l'ús de lligands amoníac enlloc d'imidazol per raons d'economia computacional i demostren que la quantitat de càrrega transferida al zinc pels dos diferents lligands és similar. En aquests estudis observen com, en augmentar el número de lligands coordinats al Zn^{+2} , s'incrementa el pK_a de l' H_2O i augmenta també la càrrega negativa en el grup hidroxil que resulta de la ionització de l' H_2O . Es a dir, en augmentar el número de lligands es fa més difícil ionitzar l'aigua, però per contra, un cop s'ha dissociat la nucleofilicitat del grup hidroxil resultant és més elevada. Sembla, per tant, que cal arribar a un equilibri entre ambdós factors per activar l'enzim i que aquest equilibri s'aconsegueix per a la CA amb un número de coordinació de quatre al voltant del zinc. Comenten també que per determinar la càrrega sobre el zinc, és més important el número de lligands units al metall que la seva naturalesa,

sempre i quan els lligands considerats siguin neutres. Per altre costat, donen un valor de l'afinitat protònica de l'espècie $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$, de 158.1 kcal/mol. Finalment, estudien el centre actiu de l'enzim mitjançant un model electrostàtic en el que les densitats electròniques del CO_2 i de l'enzim són reproduïdes en termes de multipols centrats en els diferents àtoms. Amb aquesta aproximació, observen que el CO_2 interacciona favorablement amb el centre actiu de l'enzim situant-se com a cinquè lligand un xic llunyà, més concretament a una distància d'uns 3.4 Å. A més mencionen que l'efecte del Zn^{+2} sobre el CO_2 és polaritzar el seu núvol electrònic cap a l'oxigen unit al Zn^{+2} deixant un carboni més positiu, i per tant, més preparat per rebre l'atac nucleofilic de l'hidroxil.

Sokalski [166,167] en els seus treballs utilitza conjuntament les tècniques *ab initio* i de potencials electrostàtics. Concretament, modela l'enzim amb un potencial electrostàtic per mitjà d'una expansió en multipols centrats en els diferents àtoms. Prova diferents orientacions per al potencial electrostàtic i determina una configuració òptima de càrregues per a la qual es produeix una màxima activitat catalítica de la reacció d'hidratació del CO_2 . Amb aquest potencial i l'ús d'una base mínima obté una barrera energètica per a la conversió de CO_2 a HCO_3^- de 9.1 kcal/mol.

Per la seva part Allen i col.laboradors [168] fan també una modelació no massa acurada de l'enzim. En particular, simulen el Zn^{+2} amb un àtom de Be^{+2} i els lligands imidazol amb un parell d'electrons situats en un orbital STO-3G 1s. Troben una afinitat protònica per al sistema $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ de 126.8 kcal/mol, la qual consideren que és consistent amb el mecanisme de desprotonació de l'aigua per donar hidròxid abans de l'atac nucleofilic al CO_2 (mecanisme de l'hidròxid de zinc). A més, constaten que el metall pot acomodar un cinquè lligand com podria ésser una molècula d'aigua, la qual es troba feblement unida al Zn^{+2} quan hi ha un grup hidroxil en l'esfera de coordinació. Per últim, mostren com la inversa de la distància del metall al lligand

es correlaciona amb l'energia d'enllaç el que indica la forta component coulòmbica de la interacció entre el Zn^{+2} i els lligands de la seva esfera de coordinació.

Cinc anys més tard, el mateix autor en la mateixa revista presenta un treball [169] similar, però a un nivell de càlcul més acurat, sobre espècies rellevants en el mecanisme de la CA. Els càlculs els fa utilitzant pseudopotencials per representar les capes internes de l'àtom de zinc. Assaja dos tipus de pseudopotencials i troba que tant els pseudopotencials de Hay i Wadt com els de Stephens, Basch, i Krauss són adequats per representar les capes internes del zinc. Un punt interessant a ressaltar és que mostra que la correcció corresponent a la correlació electrònica per als complexos $d^{10}s^0$ que es dissocien en espècies a capa tancada, només representa un 2% de l'energia de dissociació, i que per tant, aquests complexos poden ésser tractats satisfactoriament a nivell SCF. Els càlculs que presenta per als sistemes $(NH_3)_3Zn^{II}$, $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$ i $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)$ permeten obtenir els valors de l'energia d'enllaç de l'aigua i l'hidroxil al fragment $(NH_3)_3Zn^{II}$ que són de 43 i 284 kcal/mol, respectivament, i l'afinitat protònica de l'espècie $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$ que és de 167 kcal/mol. Finalment, l'autor subratlla la importància de representar bé amb la base utilitzada l'orbital $4s$ del zinc, sobre el que es produeix la major part de transferència de càrrega que prové dels lligands.

En un recent article [170] Liang i Lipscomb abandonen el mètode semiempíric PRDDO que havien fet servir fins ara per passar a analitzar a nivell *ab initio* les conformacions que pren el centre actiu de la CA quan està unida a inhibidors de la seva activitat com ara la sulfonamida o l'acetamida, així com les seves respectives formes desprotonades. En aquest estudi, el centre actiu el modelen substituint el Zn^{+2} per Be^{+2} i les histidines per grups amoníac. Troben que la sulfonamida desplaça l'aigua i s'uneix a l'enzim com a quart lligand, tant en la seva forma neutra com en la forma desprotonada. El mateix comportament presenta l'acetamida desprotonada, si

bé l'acetamida neutra no desplaça l'aigua i s'uneix a la CA com a cinquè lligand. En aquest mateix treball, es proposa un mecanisme d'actuació en el procés d'inhibició de la CA per amides que consisteix en tres passos consecutius: (a) enllaç inicial de l'amida al centre actiu com a cinquè lligand; (b) transferència d'un protó del nitrogen de l'amida al grup Zn-OH; i (c) pèrdua de l'aigua resultant, i com a conseqüència pèrdua de l'activitat catalítica de l'enzim.

Per la seva banda, Benedetti *et al.* [171] fan una anàlisi conformacional a diferents nivells de càlcul d'inhibidors de la CA de tipus sulfonamídic. Conclouen que quant més ric en electrons és el nitrogen i l'oxigen del grup SO_2NH_2 de la sulfonamida més important és la inhibició de l'enzim.

Un article molt interessant és el de Bertini *et al.* [172] aparegut molt recentment, en el que es fa un estudi d'una sèrie de complexos de zinc que presenten una molècula d'aigua coordinada, per tal de veure els factors que governen el pK_a d'aquest lligand i la nucleofilicitat del grup hidroxil que resulta de la ionització de l'aigua. Els càlculs es fan en sistemes grans, si bé cal fer notar que no fan optimitzacions geomètriques dels complexos, sinó que prenen geometries experimentals. Per al complex tetracoordinat $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ troben una afinitat protònica de 172.1 kcal/mol, molt propera a la determinada prèviament per Allen *et al.* [169] Com ja havia apuntat Pullman, [164] observen que en disminuir el número de coordinació del complex disminueix el pK_a de l' H_2O coordinada, encara que sense alterar en excès la nucleofilicitat del sistema Zn-OH resultant. Aquesta nucleofilicitat sí que varia considerablement amb la càrrega total del complex, augmentant en disminuir la càrrega total positiva. Així mateix, assenyalen que la càrrega sobre l'àtom de zinc no sofreix importants variacions en el procés de desprotonació de l'aigua per donar el corresponent complex amb un grup hidroxil coordinat.

Per acabar la sèrie d'articles *ab initio* mencionarem el de Jacob, Cardenas i Tapia [173] aparegut aquests darrers mesos. El treball està dividit bàsicament en dues parts. En la primera part, prenen com a model per estudiar la hidratació del CO_2 en la CA els sistemes ZnOHCO_2^+ i l'equivalent d'aquest solvatat, el $\text{ZnOHCO}_2^+ \cdot \text{H}_2\text{O}$. Les conclusions més importants al nostre entendre que han extret d'aquest primer model és que la introducció d'energia de correlació al nivell MP2, no afecta qualitativament el perfil de reacció, i que en qualsevol cas, són molt més importants els efectes derivats de la solvatació que no pas els de correlació electrònica. Més interessant resulta la segona part de l'estudi en la que el sistema $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CO}_2)$ és el que prenen com a model. La presència dels tres amoníacs redueix la transferència de càrrega del grup hidroxil al zinc en el complex $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ de 0.50 a 0.13, i provoca que l'ordre d'enllaç entre el Zn i l'O de l'hidroxil es faci tres cops més petit. Amb aquest model obtenen que la barrera energètica corresponent al mecanisme de Lindskog és de només 2.7 kcal/mol, aproximadament 50 kcal/mol més baixa a nivell SCF que la corresponent al mecanisme de Lipscomb, i per tant, proposen que en la interconversió entre el CO_2 i el HCO_3^- no s'hi produeix cap transferència protònica intramolecular. Comenten que amb introducció de l'energia de correlació aquesta diferència es faria 20 kcal/mol més petita. A diferència del que havia determinat Lipscomb troben que en el complex inicial entre el $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ i el CO_2 no es produeix l'atac nucleofílic de l'hidroxil al CO_2 . Per acabar, destaquen la gran importància que creuen que han de tenir els efectes de solvatació, si bé no presenten cap resultat en el cas del sistema $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CO}_2)$.

1.3.5 CALCULS DE DINAMICA MOLECULAR

Recentment han aparegut dos estudis de dinàmica molecular relacionats amb l'anhidrasa carbònica.

En el primer, [174] s'ha estudiat les diferències d'energia lliure d'enllaç a la CA entre la sulfonamida i la p-clorosulfonamida, que són dos coneguts inhibidors de la CA utilitzats per al tractament de la glaucoma. Aquest estudi s'ha dut a terme aplicant el mètode de pertorbacions de l'energia lliure com a tractament de dinàmica molecular. Les coordenades de l'enzim s'han extret d'un banc de dades. S'ha considerat la presència de 411 molècules d'aigua en aquest estudi, la disposició de les quals s'ha determinat a partir d'una simulació tipus Monte Carlo, utilitzant els coneguts potencials de Jorgensen TIP3P.

Els autors determinen que la diferència en energia lliure en la unió d'aquests dos inhibidors a la CA és de 3.2 kJ/mol, el que suposa només 2.5 kJ/mol de diferència amb el valor determinat experimentalment.

En el segon article, [175] es fa una simulació mitjançant dinàmica Browniana de la reacció del CO_2 i del HCO_3^- amb la CA, per determinar la velocitat de difusió d'aquests dos substractes. Les coordenades inicials les prenen d'un banc de dades. Procedeixen a un refinament de la geometria optimitzant-la amb un programa de mecànica molecular que també els permet assignar les càrregues a cada àtom per tal de generar el potencial electrostàtic de l'enzim. Els autors prenen una constant dielèctrica de 4.0 en l'interior de l'enzim i de 78.3 per al mitjà extern. Posteriorment, simulen 10^4 trajectòries tant per al CO_2 com per al HCO_3^- , i determinen que la velocitat de difusió des de l'exterior de l'enzim fins al centre actiu és de $3.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ i $2.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ per al CO_2 i el HCO_3^- , respectivament. A més troben que per al

HCO_3^- la velocitat de difusió creix en disminuir la constant dielèctrica a l'interior de l'enzim. En definitiva, aconseguixen demostrar teòricament que la reacció del CO_2 i el HCO_3^- en la CA no ve controlada per la difusió d'aquests substractes, a pesar de l'elevada velocitat de reacció que ha fet pensar a alguns autors en aquesta possibilitat.

1.3.6 SUMARI DE RESULTATS TEORICS

Anem a procurar resumir en aquest apartat les qüestions més importants que des d'un punt de vista teòric s'han pogut resoldre, i a plantejar també els punts foscos que resten per estudiar del mecanisme d'actuació de l'anhidrasa carbònica. Per fer això, i a l'igual que ja hem fet en el sumari de la part experimental dividirem l'estudi del mecanisme d'actuació de la CA en quatre parts que són: en primer lloc, l'apropament del CO_2 al centre actiu de l'enzim; en segon lloc, l'atac nucleofílic del grup $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ al CO_2 per donar HCO_3^- ; en tercer lloc, l'entrada de l'aigua i pèrdua del bicarbonat; i finalment, la desprotonació d'aquesta per regenerar l'espècie catalíticament activa.

Respecte a l'apropament del CO_2 al centre actiu de la CA (pas 1, figura 2) cal dir que d'entrada els càlculs de dinàmica molecular [175] han mostrat que la difusió del CO_2 des de l'exterior de l'enzim fins al centre actiu no és l'etapa limitant del procés. Per la seva banda, els càlculs semiempírics amb els mètodes AM1 [157] i PRDDO [118] arriben a dos resultats ben diferents. El primer troba un intermedi en el que la distància Zn-C és més gran de 4.5 Å, lluny dels valors que s'han determinat experimentalment per a aquesta distància a partir de NMR ^{13}C , el que demostra que el mètode AM1 no és massa apropiat per estudiar aquesta primera interacció entre el CO_2 i l'enzim. Per altre costat, el mètode PRDDO dona l'atac nucleofílic ja acabat en aquest primer intermedi, amb una distància Zn-C inferior a 2.9 Å i per tant més

petita que els valors experimentals que se'n disposa. Obtenen un intermedi en el que el CO_2 es troba força distorsionat en contra del que es dedueix de les observacions de Riepe i Wang ja comentades. [93] En aquest sentit, el mètode que dóna un resultat més comparable amb l'experimental és el model electrostàtic que fa servir Pullman [164] que li permet determinar que en aquest primer intermedi el CO_2 es troba situat com a cinquè lligand llunyà a una distància Zn-C de 3.4 Å. S'ha de dir que aquest model utilitzat per Pullman és molt simplificat i que és evident la manca de càlculs que a un nivell més alt de teoria cal fer per tal d'esbrinar quines són les interaccions entre el centre actiu de l'enzim i el CO_2 en aquest primer pas del procés catalític. Per acabar, indiquem que Jacob *et al.* [173] troben que en aquest primer intermedi no es produeix l'atac nucleofílic de l'hidroxil unit al zinc sobre el CO_2 . Així doncs, hi ha una polèmica clara sobre si en aquest primer estadi de la interacció s'ha iniciat o no l'atac nucleofílic de l'hidroxil sobre el CO_2 .

El segon pas que és l'atac nucleofílic al CO_2 i formació del bicarbonat (passos 2 i 3, figura 2) tampoc ha estat definitivament resolt. Hem vist que l'AM1 només permet determinar l'estat de transició que correspon al mecanisme de Lindskog (figura 3) amb una barrera de 13.1 kcal/mol, la qual s'incrementa si en el càlcul es té en compte la presència de molècules d'aigua addicional. Per la seva banda, amb el mètode PRDDO s'ha establert l'estat de transició dels dos mecanismes. Liang i Lipscomb han demostrat que el mecanisme de Lindskog és poc probable i han trobat una barrera per a la transferència protònica contemplada en el mecanisme de Lipscomb de 37.6 kcal/mol. A més han suggerit que en presència de molècules d'aigua aquesta barrera baixa per sota de les 10 kcal/mol, que és el valor màxim permès des d'un punt de vista experimental. En qualsevol cas, aquest darrer punt no ha estat demostrat per a la transferència protònica intramolecular en l'enzim, encara que sí que ho ha estat per a la transferència en la molècula de bicarbonat lliure. Queda també per confirmar-se

si la presència de molècules d'aigua en el centre actiu de l'enzim permet reduir la barrera fins a valors inferiors a les 10 kcal/mol. Finalment, direm que el estudi *ab initio* de Jacob *et al.* [173] mostra que la barrera del mecanisme de Lindskog és 50 kcal/mol més baixa que la del mecanisme de Lipscomb. Encara que la introducció d'energia de correlació disminueix aquest valor, el seu resultat sembla indicar que el mecanisme de Lindskog és més favorable que el de Lipscomb.

El pas 4 de la figura 2, que correspon a l'entrada d'una molècula d'aigua i sortida de l'anió bicarbonat, és molt probablement el que menys s'ha estudiat des del punt de vista teòric. Experimentalment s'ha proposat que en primer lloc es dona l'entrada d'una aigua en l'esfera de coordinació del metall per formar el complex pentacoordinat $EZn^{II}(H_2O)(HCO_3^-)$, i posteriorment es produeix la sortida del bicarbonat. Amb el mètode AM1 [157] s'ha determinat un complex de les característiques abans esmentades, que presenta una estructura de bipiràmide trigonal amb el bicarbonat ocupant una de les posicions axials, i l'aigua en posició equatorial. En aquest mateix estudi s'ha proposat la transferència d'un protó des de l'aigua al grup bicarbonat i posterior sortida d'una molècula d'àcid carbònic, la qual cosa però, no està massa d'acord amb les dades experimentals de què es disposa. En conseqüència, fa falta realitzar més càlculs en aquest punt del mecanisme, que probablement és el més fosc de tots tant a nivell experimental com teòric.

La generació de l'espècie activa (pas 5, figura 2) ha estat el pas més estudiat des d'un punt de vista teòric. A nivell semiempíric i utilitzant el mètode PRDDO [156] s'ha estudiat la transferència protònica al grup His-64 i ha resultat que la barrera energètica per a aquest procés és de 34 kcal/mol, quasi independentment del número de molècules d'aigua que actuen de pont entre el protó a transferir i la His-64. Segons Liang i Lipscomb, càlculs amb bases més esteses han de rebaixar considerablement la barrera. Amb el mètode AM1 s'ha estudiat la possibilitat de transferència protònica

a una aigua del centre actiu, a la His-64, al grup Glu-106 i al bicarbonat generat en el procés de catàlisi, i com ja hem comentat troben com a més favorable la transferència al bicarbonat, encara que des del punt de vista experimental sembla que no hi ha dubte que la transferència es fa sobre la His-64. A nivell *ab initio* s'ha determinat amb diferents bases l'afinitat protònica de l'espècie catalíticament activa $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ que resulta de la transferència protònica a la His-64. Els valors que s'han donat han estat de 158.1 kcal/mol per Pullman, [164] 126.8 i 167 kcal/mol per Allen en dos treballs diferents, [168,169] i 172.1 per Bertini. [172] Els dos darrers valors s'han aconseguit treballant amb bases prou esteses com per considerar que són els que més s'han d'acostar al valor experimental, que per altra banda tampoc és conegut. En qualsevol cas, a nivell *ab initio* és evident la necessitat d'un estudi més aprofundit de com es fa la transferència protònica, quin paper juga el Zn^{+2} en la mateixa, i a quines barreres dóna lloc aquest procés.

Finalment, pel que fa als mecanisme d'inhibició s'han presentat fins al moment treballs de mecànica molecular, [145] de dinàmica [174] i *ab initio*. [170-172] El més complet és el recent treball de Bertini *et al.* [172] que ja hem comentat i que al nostre entendre li manca realitzar les oportunes optimitzacions de geometria de les espècies estudiades, donat que si no es porten a terme els resultats presentats són difícilment justificables. Són pocs els treballs teòrics al respecte i per tant qualsevol aportació és important per entendre un aspecte bàsic d'aquest enzim com són els seus mecanismes d'inhibició.

1.4 OBJECTIUS

El nostre treball s'enmarca en el camp de la química computacional aplicada a sistemes bioquímics. S'han donat algunes definicions del que és la química computacional totes elles vàlides i alhora subjectives, donat que hi ha una separació difusa entre ella i la química teòrica. Per exemple, Enrico Clementi [176] ha assenyalat que la química computacional és l'ús de la mecànica quàntica i l'estadística juntament amb altres aspectes de la física molecular i la química-física per tal de determinar propietats moleculars. Tim Clark [177] per la seva banda ha dit que és l'ús dels mètodes semiempírics i *ab initio* de la mecànica quàntica per determinar estructura i propietats de les molècules. Nosaltres potser ens quedariem amb la més àmplia definició de Paul von Ragué Schleyer que diu que química computacional és la part de la ciència que tracta de modelar el millor possible tots els aspectes de la química real mitjançant càlculs enlloc d'experiments.

Degut al gradual desenvolupament que han sofert les tècniques computacionals en els darrers anys, tant pel que fa al software com al hardware, cada cop són més tractables des d'un punt de vista teòric les reaccions químiques que tenen lloc en els éssers vius. En qualsevol cas, la qüestió de com fer bones simulacions teòriques de sistemes bioquímics com pot ésser la CA no està del tot resolta i continua essent objecte de controvèrsia dins la comunitat de químics computacionals. Es poden elegir diferents nivells de sofisticació en el càlcul. En aquest sentit, en un extrem ens trobaríem la simulació teòrica que sense fer cap simplificació del sistema a estudiar, aplica un mètode de càlcul molt aproximat i de baix cost computacional, com podria ésser la mecànica molecular o el mètode dels potencials electrostàtics, que per altra part difícilment pot recollir totes les interaccions entre els diferents grups del

systema. Aquests mètodes, que s'han desenvolupat inicialment per tractar problemes conformacionals, han tingut un ampli ressó en el món bioquímic, pel que fa a la modelació de metalloenzims. Aquests mètodes són molt útils per determinar les posicions relatives de tots els residus i del substracte en l'enzim. En l'altre extrem s'hi troba la simulació teòrica que aplica un mètode d'alt cost computacional, que permet quantificar totes les interaccions que tenen lloc entre les diferents parts de l'enzim, però que com a contrapartida i per raons de temps i cost computacional no pot ésser aplicat al sistema global (ex. càlcul *ab initio* que inclogui energia de correlació). Això suposa la necessitat de fer una modelació del sistema per tal d'acabar tenint una estructura amb un nombre petit d'àtoms on hi sigui aplicable el mètode escollit. En aquest cas caldrà esperar que els resultats obtinguts amb el model de treball siguin extrapolables al sistema real. El gran avantatge d'aquests mètodes és que permeten estudis acurats de reactivitat, ja que amb ells es poden estudiar estats de transició, determinar barreres d'activació i caracteritzar mecanismes de reacció.

Com a característiques més apreciades d'un mètode poc sofisticat com la mecànica molecular es troben la seva simplicitat conceptual, la ràpida velocitat d'execució dels càlculs, la facilitar d'incloure els efectes de solvatació, i la capacitat de tractar grans sistemes. Per la seva part els mètodes més sofisticats ofereixen rigor teòric (fonamental per als puristes), bona determinació de les propietats electròniques del sistema, i possibilitat de tractar espècies de baixa estabilitat. Enmig d'aquests dos extrems ens trobem amb tota una gama de mètodes més propers a un extrem o altre, i que, per tant, comparteixen part dels avantatges i dels inconvenients dels abans esmentats casos extrems. [178] També són molt prometedors els mètodes mixtes que s'estan desenvolupant, en els que la part que esperem que sigui més important en el centre actiu es descriu amb mètodes *ab initio* i s'incorpora al model un número gran de residus mitjançant una descripció simplificada.

L'elecció d'un mètode o l'altre depèn molt del que pretenem resoldre. En general, en problemes de tipus bioquímic el que volem és estudiar la interacció de molècules petites (l·ligands o substractes) amb macrol·lècules (enzims o proteïnes). En aquest sentit, podríem dividir les interaccions en dos tipus bàsics: el primer el formarien aquelles interaccions en les quals el substrate queda inalterat, mentre que en el segon tindríem aquelles interaccions que modifiquen químicament el substrate. Sempre parlant en termes generals, es podria aconsellar l'ús de mètodes aproximats per a l'estudi de les interaccions que hem classificat dins del primer grup, mentre que les interaccions del segon tipus haurien d'ésser analitzades mitjançant mètodes més complexes i modelant el sistema per tal de poder-lo tractar.

Un important aspecte de la química enzimàtica és explicar perquè les reaccions enzimàtiques són tan ràpides i tan específiques. Per respondre a aquestes preguntes cal conèixer els detalls dels mecanismes de les reaccions catalitzades per enzims. Per això l'objectiu de la present Tesi serà l'estudi teòric dels passos que s'han descrit per al mecanisme d'actuació de la anhidrasa carbònica, així com dels mecanismes que intervenen en el seu procés d'inhibició. Ja s'ha justificat, en el sumari que hem presentat sobre els estudis teòrics, la necessitat de més càlculs teòrics en alguns punts del mecanisme d'acció d'aquest enzim, donat que els que hi ha fets fins ara no resolen tota la problemàtica plantejada a nivell experimental.

Com ja hem vist, en aquest procés catalític tenim un enzim que és la CA i un substrate que és el CO_2 , el qual es veu químicament alterat en el transcurs de la catàlisi per donar lloc a la formació de HCO_3^- . Com a conseqüència apareixen interaccions de les que hem classificat dins el segon grup, que com ja hem dit cal estudiar amb mètodes de més elevat cost computacional. Per això hem elegit un mètode *ab initio* que possibilita la determinació de barreres de reacció i per tant la comparació de diferents mecanismes, per tal d'estudiar aquest sistema. Aquesta

elecció ens ha obligat a modelar, per raons evidents d'economia computacional, els grups His-94, His-96, i His-119 i tota la cadena proteínica que els encadena, mitjançant tres amoníacs. Cal doncs tenir ben present, des d'ara i al llarg de tot el capítol de resultats, que les geometries, valors de barreres energètiques, càrregues i d'altres propietats moleculars que discutirem, no són explícitament els de l'enzim, sinó els d'un model de la CA, la validesa del qual no es podrà avançar sinó que caldrà justificar. Cal comentar també que per a l'estudi d'algun pas del mecanisme de la reacció hem treballat amb mètodes semiempírics. En aquest cas els grups histidínics han estat modelats per anells imidazol, el que converteix el model en quelcom més proper al que és el veritable enzim. Lògicament, com a contrapartida, els valors d'energia i propietats moleculars que s'obtenen a partir de mètodes semiempírics són sempre menys fiables que els obtinguts a partir de mètodes *ab initio*, sobretot en estudis de reactivitat i no tant quan el que es pretén és determinar estructures d'equilibri.

En els processos d'inhibició de la CA el substracte que és l'inhibidor no queda químicament alterat, sinó que només es forma un enllaç inhibidor-metall, de manera que les interaccions entre l'inhibidor i l'enzim es poden classificar dins de les del primer grup. Seria possible en aquest cas l'aplicació de mètodes de baix cost computacional sense modelar l'enzim, si bé en el nostre estudi hem continuat amb el mateix model donat que així els resultats obtinguts en els diferents apartats són més comparables. A més a més, els mètodes *ab initio* permeten explicitar certs tipus d'interaccions (com poden ésser els enllaços d'hidrogen) que es donen en els complexos estudiats i que són difícilment quantificables a partir de mètodes més simplificats.

L'objectiu global d'aquesta Tesi és l'estudi teòric, fonamentalment mitjançant mètodes *ab initio*, dels diferents passos elementals del mecanisme d'acció catalítica de la CA i del mecanisme d'inhibició aniònica d'aquest enzim. Aquest objectiu global es pot desglossar en quatre objectius més concrets.

En primer lloc, volem fer un estudi metodològic comparatiu de diferents models de centre actiu i nivells de càlcul, per elegir per al nostre estudi un model i un nivell de càlcul adequats i viables des d'un punt de vista computacional. Aquesta elecció la farem quan estudiem la transferència protònica que permet generar l'espècie activa. Aquest procés té l'avantatge que és més senzill i és del que se'n tenen més dades teòriques i experimentals. Ens interessarem per la transferència protònica a una molècula d'aigua del centre actiu, i per la transferència al grup His-64, i compararem ambdues possibilitats.

En segon lloc, procedirem a realitzar una discussió comparativa dels mecanismes de Lipscomb i de Lindskog que s'han postulat per explicar la reacció d'hidratació del CO_2 en la CA. Es tracta de veure com interacciona el CO_2 amb el centre actiu en l'intermedi inicial que es forma, i decidir a partir dels valors de les barreres de reacció quin dels dos mecanismes suggerits és el més probable.

En tercer lloc, ens centrarem en el mecanisme d'inhibició aniònica de l'anhidrasa carbònica. Volem oferir una explicació al bloqueig del mecanisme d'acció de la CA provocat per la presència d'anions prop del centre actiu. Donat que aquests anions es coordinen al Zn^{+2} com a cinquè lligand, aquest estudi ens donarà peu a analitzar complexos pentacoordinats de Zn^{+2} . Els resultats que en puguem extreure ens orientaran a l'hora d'estudiar el bescanvi de HCO_3^- per H_2O , que segons sembla també té lloc per formació d'un complex pentacoordinat.

Precisament, el darrer objectiu és estudiar la regeneració de l'espècie catalíticament activa $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ a partir del complex $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ que s'ha format. Aquest procés comporta l'eliminació del bicarbonat i la coordinació d'una molècula d'aigua que posteriorment es desprotona. Nosaltres volem examinar totes les diferents possibilitats que s'han proposat per al bescanvi de HCO_3^- per H_2O , i decidir a partir dels nostres

càlculs quina és la seqüència d'etapes més probable per a la regeneració de l'espècie catalíticament activa.

Per acabar, aquesta Tesi presenta també aportacions de tipus metodològic. Concretament, s'ha desenvolupat el software necessari per transformar una funció d'ona d'orbitals moleculars (MO) en una funció d'ona d'enllaç de valència (VB) segons el formalisme de Hiberty i Leforestier. En el capítol de metodologia explicarem en què es basa aquest mètode mentre que en el capítol de resultats en comentarem una aplicació específica. Finalment en l'apèndix A presentarem el programa FORTRAN que hem desenvolupat per tal de poder aplicar el mètode esmentat.

CAPITOL 2

METODE DE CALCUL

Les propietats químiques d'àtoms i molècules venen determinades per la seva estructura electrònica. La química computacional intenta desxifrar-la mitjançant càlculs teòrics que permeten esbrinar amb la metodologia de la Mecànica Quàntica, la Mecànica Clàssica i de la Mecànica Estadística, l'estructura (geometria, propietats espectroscòpiques) i la reactivitat de les espècies químiques. Actualment es disposa de programes i ordinadors que possibiliten el càlcul de funcions d'ona moleculars precises per a molècules de tamany mig (aproximadament fins a vint àtoms pesats).

La capacitat de càlcul a disposició dels investigadors ha sofert un increment espectacular en aquests darrers anys. Per posar un exemple, aquesta Tesi va començar el gener de 1987 quan la Unitat de Química-Física disposava d'un HP-9000/550 (0.11 Mflops) i tenia accés a dos VAX-750 (0.29 Mflops) del Centre de Càlcul d'aquesta Universitat (CCUAB). Actualment (octubre 1990) quan la Tesi ha entrat en fase d'escriptura, la nostra Unitat té un HP-9000/835 (1.5 Mflops) i un APOLLO-DN10000 (11 Mflops), i a més pot accedir a un IBM-3090 (3 Mflops) i a dos VAX-8820 (3.5

Mflops) del CCUAB, així com a un CRAY X/MP (20 Mflops) de C.A.S.A., amb la qual cosa en aquests quatre anys la potència de càlcul s'ha multiplicat (en un càlcul aproximat) per vint-i-cinc. Evidentment, això ha afectat al desenvolupament de la Tesi, i darrerament hem pogut enfrontar-nos a models amb els quals l'any 1987 no podríem ni tan sols somniari-hi.

Es d'esperar que a mesura que augmenti la potència dels ordinadors, la química computacional acabi jugant un paper decisiu en el disseny de nous fàrmacs, [179] cosmètics o catalitzadors, per posar algun dels exemples que es solen citar en aquests casos.

Així com la Universitat no és tan sols transmissora de coneixements, sinó que també en crea, en una Tesi Doctoral en Química Teòrica com aquesta no es tracta tan sols d'utilitzar la metodologia (algorismes i programes) d'altres, sinó que també es tracta de comprovar, redissenyar, millorar i crear nous algorismes i programes. En aquesta Tesi s'ha dut a terme el següent treball metodològic:

- Codificació d'algorismes.
 1. *Ab initio* SCF RHF i UHF, amb level shift i damping.
 2. Direct inversion in the iterative subspace (DIIS) codificat i implementat posteriorment en el programa MONSTERGAUSS.
 3. Generació d'un conjunt linealment independent d'estructures ressonants pel mètode del grup simètric.
 4. Resolució de l'equació de valors i vectors propis en una base d'estructures ressonants no ortogonal (enllaç de valència).
 5. Projectió d'una funció d'ona MO en una altra VB.
- Disseny i codificació d'algorismes.

1. Optimització de conjunts de base de funcions gaussianes que inclouen orbitals d . Aquest programa va estar dissenyat a la Wayne State University de Detroit i implementat en una versió del programa GAUSSIAN 90.
2. Càlcul de l'energia d'enllaç de valència a partir de les integrals extretes d'un programa semiempíric.

En tots els casos el llenguatge de programació utilitzat ha estat el FORTRAN, que és el standard internacional en aquest camp de la ciència.

Les descripcions que venen aquí de la metodologia usada en aquesta Tesi no tenen caràcter d'exhaustives i només són indicatives. Per a més informació cal anar-se'n a articles de revisió, els quals es troben citats en cada apartat. Una bona revisió ha estat realitzada fa molt poc per membres del Grup. [180]

En aquest capítol s'exposaran doncs els mètodes de càlcul utilitzats en el present estudi. Començarem per la descripció de mètodes de càlcul de l'energia, continuarem amb els mètodes de construcció i estudi de superfícies d'energia potencial, i finalment parlarem breument dels programes que hem emprat en la present Tesi.

2.1 CALCUL DE L'ENERGIA I FUNCIO D'ONA

Determinar l'energia d'un sistema químic que requereix generalment disposar de la funció d'ona electrònica, és el pas previ necessari per estudiar l'estructura i reactivitat de les molècules.

En aquest apartat tractarem de les diferents aproximacions que es realitzen per tal de determinar l'energia d'un sistema aïllat, de com s'evaluen els efectes de perturbacions externes sobre l'energia, i finalment de les implementacions computacionals de les diferents aproximacions que s'han dut a terme.

2.1.1 FONAMENTS

En aquesta secció volem comentar l'aproximació de Born-Oppenheimer prèvia a qualsevol càlcul mecano-quàntic, i els mètodes dels orbitals moleculars i d'enllaç de valència utilitzats per resoldre l'equació de Schrödinger no relativista independent del temps.

2.1.1.1 Aproximació de Born-Oppenheimer

En l'aproximació de hamiltonià independent del temps i sense tenir en compte els efectes relativístics, el valor de l'energia surt de la resolució de l'equació de Schrödinger independent del temps:

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (6)$$

on Ψ és la funció d'ona total del sistema que depèn de les coordenades electròniques \mathbf{r} i nuclears \mathbf{R} i \hat{H} és el hamiltonià no relativista:

$$\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_n + \hat{V}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \hat{T}_n + \hat{H}^{el} \quad (7)$$

Aquí \hat{T}_e és l'energia cinètica dels electrons i \hat{T}_n la dels nuclis. L'energia potencial total d'electrons i nuclis ve representada per $\hat{V}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$.

Aquesta no pot resoldre's directament degut a què les coordenades nuclears i electròniques estan acoblades. L'aproximació de Born-Oppenheimer [181,182] consisteix en separar el moviment dels nuclis del moviment dels electrons, basant-se en el fet que els electrons tenen una massa molt més petita que no pas la dels nuclis i, per tant, es mouen molt més ràpidament. Aquesta separació equival a suposar que els electrons es mouen en un camp de potencial creat pels nuclis fixos de forma que els petits desplaçaments dels nuclis no influeixen significativament en la funció d'ona electrònica. Així és possible descomposar l'equació de Schrödinger en dues altres que són:

$$\hat{H}_{el} \Psi_{el,n}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = U_n(\mathbf{R}) \Psi_{el,n}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (8)$$

$$(\hat{T}_n + U_n) \Gamma_n(\mathbf{R}) = E_t \Gamma_n(\mathbf{R}) \quad (9)$$

L'expressió (8) és l'equació de Schrödinger electrònica. $\Psi_{el,n}$ són les funcions d'ona electròniques i depenen de les coordenades nuclears només com a paràmetres. La funció $U_n(\mathbf{R})$ s'anomena superfície d'energia potencial de l'estat electrònic n i conté l'energia cinètica dels electrons i l'energia potencial de nuclis i electrons. La funció d'ona global es pot posar com a combinació lineal de les funcions d'ona electròniques, essent les funcions d'ona nuclears els coeficients que les multipliquen:

$$\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \sum_j^n \Gamma_j(\mathbf{R}) \Psi_{el,j}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (10)$$

Tal i com es pot demostrar, [183] fer aquesta aproximació equival a despreciar uns termes d'acoblament del moviment electrònic i nuclear, de manera que quan aquest

terme no sigui negligible no es podrà aplicar aquesta aproximació. Això passa quan ens trobem en una zona de configuracions nuclears on hi ha dues superfícies de potencial molt pròximes entre sí com pot ésser el cas d'una reacció prohibida.

Una vegada realitzada l'aproximació de Born-Oppenheimer, el càlcul de l'energia dels diferents punts de la superfície de potencial d'un sistema implica la resolució de l'equació (8) que és l'equació de Schrödinger electrònica. La resolució aproximada d'aquesta equació es pot fer amb el mètode de Hartree-Fock o mètode del camp autoconsistent, o bé amb el mètode de l'enllaç de valència. En els propers apartats presentarem aquests dos mètodes amb algunes de les seves variants més importants.

2.1.1.2 Mètode SCF Hartree-Fock

La resolució de l'equació (8) s'ha de fer de forma aproximada degut a la presència de termes bieletrònics en el hamiltonià \hat{H}_{el} . El mètode més emprat per resoldre aquesta equació és el mètode de Hartree-Fock o del camp autoconsistent (Self Consistent Field, SCF). [184,185]

Bàsicament la idea és considerar que cada electró es mou en un camp esfèricament simètric, que és la suma del camp degut al nucli i un camp promitgat degut als altres electrons. Amb aquesta aproximació, podem expressar el hamiltonià electrònic del sistema com una suma de hamiltonians monoeltrònics. El càlcul del camp creat pels altres electrons requereix el coneixement previ de la funció d'ona del sistema, cosa que obliga a que la resolució s'hagi de fer de forma iterativa. La funció d'ona global s'expressa com a producte antisimetritzat de funcions monoeltròniques anomenades spin-orbitals (determinant de Slater). El determinant format amb aquests orbitals és la funció d'ona Hartree-Fock per a l'estat fonamental del sistema.

L'energia es calcula segons el mètode variacional com:

$$E_{el} = \frac{\langle \Psi_{el} | \hat{H}_{el} | \Psi_{el} \rangle}{\langle \Psi_{el} | \Psi_{el} \rangle} \quad (11)$$

on \hat{H}_{el} és el hamiltonià electrònic exacte de la molècula. Mitjançant la minimització de l'energia respecte de la forma dels spin-orbitals i imposant la condició d'ortonormalitat amb el mètode dels multiplicadors de Lagrange, poden deduir-se les equacions de Hartree-Fock. Aquestes equacions són del tipus :

$$f(x_1)\chi_i(x_1) = \varepsilon_i\chi_i(x_1) \quad (12)$$

on $f(x_1)$ és un operador monoelectrònic, anomenat operador de Fock, en el qual les repulsions electró-electró es tracten de forma promitjada. Es a dir, en el mètode de Hartree-Fock es considera que cada electró es mou en un potencial creat pels nuclis i per la resta d'electrons del sistema. Per la seva banda l'energia ens ve donada de forma general [186] per:

$$E = \sum_i 2f_i h_{ii} + \sum_{ij} [\alpha_{ij}(ii | jj) + \beta_{ij}(ij | ij)] \quad (13)$$

Els valors α_{ij} , β_{ij} i f_i s'anomenen paràmetres d'estat i són constants que depenen només de l'estat electrònic per al qual estem calculant la funció d'ona. Els termes h_{ii} són les integrals monoelectròniques, els termes $(ii | jj)$ són integrals bielectròniques de repulsió, mentre que les $(ij | ij)$ són integrals de bescanvi, que responen a efectes purament quàntics relacionats amb el spin de l'electró.

A continuació s'exposaran els mètodes RHF (Restricted Hartree-Fock) i UHF (Unrestricted Hartree-Fock) que es diferencien fonamentalment en la forma d'especificar els spin-orbitals que seran solució del sistema.

Al llarg d'aquesta exposició, i com es fa habitualment en els textos especialitzats, utilitzarem les lletres llatines i, j, k, l, \dots per referir-nos als orbitals moleculars, i les lletres gregues $\alpha, \beta, \gamma, \dots$ quan parlem dels orbitals atòmics.

2.1.1.2.1 Mètode Restricted Hartree-Fock (RHF)

En el mètode Restricted Hartree-Fock (RHF) s'imposa la restricció que els spin-orbitals corresponents a dos electrons d'un orbital molecular tinguin la mateixa funció d'ona espacial i només difereixin en la funció de spin.

Es a dir,

$$\chi_{2i-1} = \varphi_i(r)\alpha(w) \quad (14)$$

$$\chi_{2i} = \varphi_i(r)\beta(w)$$

Aquesta restricció pot imposar-se tant en els sistemes a capa tancada, caracteritzats per la presència de dos electrons en cada un dels seus orbitals moleculars ocupats, com en sistemes a capa oberta, a on, a més d'orbitals doblement ocupats, hi ha un o més orbitals moleculars amb un nombre d'ocupació diferent a dos. En el primer cas parlem del mètode RHF mentre que el segon cas es coneix amb el nom de ROHF (Restricted Open Hartree-Fock). En el nostre treball només hem treballat amb espècies a capa tancada, i per això només comentarem aquest cas. A capa tancada l'expressió general (13) que dóna el valor de l'energia electrònica per a la major part dels sistemes químics queda:

$$E = 2 \sum_i^n h_{ii} + \sum_i^n \sum_j^n (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (15)$$

on h_{ii} és un terme monoelectrònic i representa l'energia d'un electró en un orbital molecular φ_i en el camp creat pels nuclis, J_{ij} és l'anomenada integral de Coulomb, que representa la interacció repulsiva entre les distribucions de càrrega $\varphi_i^* \varphi_i$ i $\varphi_j^* \varphi_j$, i K_{ij} s'anomena integral de bescanvi que recull l'energia d'interacció atractiva entre electrons de spins paral·lels situats en els orbitals φ_i i φ_j . Aquest terme apareix com a conseqüència del principi d'antisimetria que caracteritza el fet que els electrons

segueixen l'estadística de Fermi-Dirac, i representa l'estabilització energètica deguda a la correlació entre electrons de spins paral·lels.

En aquests cas les equacions integro-diferencials de Hartree-Fock que s'obtenen utilitzant el mètode variacional i imposant la condició d'ortonormalitat són:

$$f(r_1)\varphi_i(r_1) = \varepsilon_i\varphi_i(r_1) \quad (16)$$

on ε_i és l'energia d'un electró en l'orbital φ_i i $f(r_1)$ és l'operador diferencial mono-electrònic. Aquest operador depèn de φ_i i, per tant, cal resoldre les equacions de forma iterativa partint d'unes φ_i^0 inicials.

Tanmateix, per resoldre aquestes equacions es realitza una nova aproximació que consisteix en expressar els orbitals moleculars φ_i com a combinació lineal d'orbitals atòmics ϕ_μ , els quals constitueixen el conjunt de funcions de base. Aquesta aproximació va ser introduïda independentment per Roothaan i Hall, i s'anomena aproximació LCAO-MO o de Roothaan-Hall. [187-189]

$$\varphi_i = \sum_{\mu} C_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (17)$$

Els coeficients dels millors orbitals moleculars s'obtenen de la resolució iterativa de les anomenades equacions de Roothaan-Hall:

$$\sum_{\mu} (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) C_{\mu i} = 0 \quad (18)$$

o el que és el mateix, escrit en forma matricial:

$$FC = SCE \quad (19)$$

on F i S són les representacions matricials en la base de funcions atòmiques, de l'operador de Fock i de recobriment, respectivament, E és la matriu diagonal que té com a elements els valors de ε_i i C és la matriu de coeficients, les columnes de la qual són els coeficients dels orbitals moleculars.

Apart del mètode de Roothaan-Hall, s'han descrit altres mètodes per solucionar l'equació (16) com poden ésser el mètode pseudoespectral, [190] l'aproximació del hamiltonià químic (CHA), [191] o bé la teoria del funcional de densitat. [192-197] Tots aquests mètodes intenten resoldre l'equació (16) de manera menys costosa que el mètode de Roothaan-Hall, però per altra banda la resolució encara que menys cara, és més aproximada.

El mètode de Hartree-Fock-Roothaan-Hall és un mètode iteratiu i com moltes d'aquestes tècniques presenta a vegades una difícil convergència. Això és especialment cert en sistemes a capa oberta.

De cara a millorar la convergència SCF en aquest mètode s'han ideat una sèrie de tècniques entre les quals cal destacar:

- Level shift. El que es pretén és separar energèticament els orbitals virtuals dels ocupats, impedir que aquests es barregin, i evitar anar a parar a un estat electrònic no desitjat i en definitiva millorar la convergència. Per aconseguir això, als elements diagonals de la matriu de Fock (en la base d'orbitals moleculars) que corresponen als orbitals virtuals se'ls suma un determinat valor. Cal tenir en compte que així el procés SCF és torna més lent, encara que més segur. Una millora d'aquest mètode és l'anomenat level shift dinàmic, [198] on l'energia que es suma als orbitals virtuals varia al llarg del procés SCF essent més petita a l'acostar-nos als orbitals convergits.

- Damping. En aquest cas l'operador de Fock en una determinada iteració és funció dels coeficients de la funció d'ona i també de l'operador de Fock de la iteració prèvia segons:

$$F^{(n+1)} = \alpha F^n + (1 - \alpha) F^{(n+1)} \quad (20)$$

Així s'eviten els salts que es poden produir en el procés de convergència, encara que

aquesta és també més lenta.

- Mètodes d'extrapolació. Es construeix la matriu de Fock a cada iteració a partir de les anteriors, segons:

$$F = \sum_i c_i F_i \quad (21)$$

Els coeficients c_i s'obtenen de manera que minimitzin un vector d'error que permet recollir quan allunyats ens trobem de la convergència SCF. El més conegut d'aquests mètodes és el degut a Pulay anomenat DIIS (Direct Inversion in the Iterative Subspace). [199-201]

- Average Fock operators. [202,203] Vàlid només per a sistemes a capa oberta. S'intenta obtenir un operador de Fock de les mateixes característiques que l'operador de Fock a capa tancada. Té l'inconvenient que la convergència SCF és molt dependent del punt de partida.

Apart del mètode iteratiu més habitualment utilitzat, han aparegut altres mètodes per convergir la funció d'ona com poden ésser el mètode de les rotacions de Jacobi [204] o els mètodes de minimització directe. [205,206]

En el primer cas, mitjançant rotacions de tipus Jacobi com les que es poden fer servir per diagonalitzar matrius, el que s'intenta és arribar a la convergència i per tant, arribar a una matriu de Fock en la que es compleixi que:

$$\epsilon_{ij} = \epsilon_{ji}^* \quad \text{on } i \text{ o } j \text{ ocupat i l'altre virtual.} \quad (22)$$

$$\epsilon_{ij} = 0 \quad \text{per a } i \text{ i } j \text{ tots dos ocupats o virtuals.}$$

La primera de les equacions s'anomena condició d'hermiticitat de la lagrangiana.

Els mètodes de minimització directa són els més eficients per convergir la funció

d'ona i es basen en considerar l'energia com a funció d'una sèrie de paràmetres variacionals. Amb això i a partir del mètode de Newton-Raphson, podem calcular la direcció i la longitud del vector desplaçament en el procés d'optimització energètica, per acabar determinant els paràmetres que ens porten a una funció d'ona més baixa en energia en la hipersuperfície definida sobre l'espai dels paràmetres variacionals. El mètode és iteratiu i ja ha estat comprovada la seva gran eficiència, si bé com tots els mètodes iteratius el resultat pot dependre de la forma particular de la hipersuperfície al voltant del punt inicial de cada iteració. L'avantatge del mètode és que no tan sols s'arriba a un punt estacionari de l'energia (gradient zero) sinó que s'assegura que el punt obtingut sigui un veritable mínim.

2.1.1.2.2 Mètode Unrestricted Hartree-Fock (UHF)

En aquest mètode, els spins-orbitals tenen diferent funció espacial per a les diferents funcions de spin, de manera que eliminem la restricció que imposàvem a les funcions d'ona en el mètode restringit.

$$\chi_{2i-1} = \varphi_i^\alpha(r)\alpha(w) \quad (23)$$

$$\chi_{2i} = \varphi_i^\beta(r)\beta(w)$$

Aquest mètode és aplicable tant a sistemes a capa oberta com a capa tancada, i presenta l'avantatge que permet una millor descripció de la dissociació d'una molècula que no pas el mètode RHF. A més a més, amb aquest mètode, a través de la utilització de diferents funcions espacials per als electrons α i β , s'introdueix en certa forma part de correlació entre els electrons de diferent spin. Tanmateix, en el mètode UHF hi ha l'inconvenient que la funció d'ona no és funció pròpia de l'operador \hat{S}^2 , cosa que fa que hi pugui haver contaminació amb altres estats de spin de multiplicitat més alts.

Es pot demostrar que:

$$\langle S^2 \rangle_{\text{uhf}} = \left[\frac{(N_\alpha - N_\beta)}{2} \right] \left[\frac{1 + (N_\alpha - N_\beta)}{2} \right] + N_\beta - \sum \sum |S_{ij}^{\alpha\beta}|^2 \quad (24)$$

El formulisme UHF condueix a dos sistemes d'equacions diferencials, un per als electrons α i l'altre per als electrons β :

$$f^\alpha(r_1)\varphi_j^\alpha(r_1) = \varepsilon_j^\alpha \varphi_j^\alpha(r_1) \quad (25)$$

$$f^\beta(r_1)\varphi_j^\beta(r_1) = \varepsilon_j^\beta \varphi_j^\beta(r_1)$$

L'energia electrònica associada a la funció d'ona electrònica UHF obtinguda en la solució d'aquest sistema d'equacions ve donada per l'expressió:

$$E_{\text{el}} = \sum_i^\alpha h_{ii}^\alpha + \sum_i^\beta h_{ii}^\beta + \sum_{ij}^\alpha (J_{ij}^\alpha - K_{ij}^\alpha) + \sum_{ij}^\beta (J_{ij}^\beta - K_{ij}^\beta) + \sum_i^\alpha \sum_j^\beta J_{ij}^{\alpha\beta} \quad (26)$$

El sistema d'equacions (25) no es pot resoldre independentment, ja que es troben acoblats a través dels operadors de Fock f^α i f^β que contenen l'energia de repulsió coulòmbica entre els electrons α i β , de manera que:

$$f^\alpha(1) = h^\alpha(1) + \sum [J_a^\alpha(1) - K_a^\alpha(1)] + \sum J_a^\beta(1) \quad (27)$$

De manera anàlega al cas RHF, els orbitals moleculars s'expressen com a combinació lineal d'orbitals atòmics.

$$\varphi_i^\alpha = \sum_\mu C_{\mu i}^\alpha \phi_\mu \quad (28)$$

$$\varphi_i^\beta = \sum_\mu C_{\mu i}^\beta \phi_\mu$$

i així s'arriba a a les equacions de Pople-Nesbet: [207]

$$F^\alpha C^\alpha = S C^\alpha \varepsilon^\alpha \quad (29)$$

$$F^\beta C^\beta = S C^\beta \varepsilon^\beta$$

que cal resoldre simultàniament i de forma iterativa. Quan $N^\alpha = N^\beta$, una solució restringida (RHF) de les equacions de Roothaan és una solució particular de les equacions de Pople-Nesbet. Pot existir una altra solució, si bé per trobar-la és necessari que de partida les matrius corresponents a la densitat d'electrons α i β siguin diferents.

2.1.1.2.3 Energia de Correlació

Una funció d'ona SCF Hartree-Fock es descriu com un producte antisimetritzat de spin-orbitals i només té en compte les interaccions entre electrons de forma promitgada. Hauríem de tenir present les interaccions instantànies entre els electrons, donat que la posició d'un electró en un instant determinat ve influenciada per la posició de tots els altres. Es diu que els moviments dels electrons estan correlacionats entre sí i es parla doncs de correlació electrònica. De fet, una funció Hartree-Fock té implícita una correlació instantània anomenada *correlació de Fermi* donat que satisfà el principi d'exclusió de Pauli, que impedeix que dos electrons d'igual spin es puguin trobar en un mateix punt de l'espai. Tanmateix, els electrons amb spins contraris no es troben correlacionats a nivell HF.

Es defineix l'energia de correlació com la diferència entre l'energia no relativista exacta i l'energia límit Hartree-Fock (aquella obtinguda amb una base infinita d'orbitals atòmics). [208] Pot distingir-se la correlació dinàmica, deguda a la no correlació dels electrons en el model de Hartree-Fock d'electrons independents, i la correlació no-dinàmica o estàtica que apareix degut a l'existència de determinants de Slater degenerats o quasi-degenerats.

S'han desenvolupat diferents mètodes per determinar l'energia de correlació d'un

sistema químic, dels quals els dos més corrents són els mètodes variacionals, com és el d'interacció de configuracions, i els pertorbacionals. El mètode d'interacció de configuracions té l'avantatge de ser variacional, però té l'inconvenient de no ser consistent de tamany (size-consistent), és a dir, la suma de les energies de dos monòmers A i B calculades independentment no coincideix amb el valor obtingut per al sistema A+B a distància infinita, excepte quan s'introdueixen totes les possibles excitacions (full-CI). Per la seva banda el mètode pertorbacional, encara que és size-consistent, presenta el problema que no és variacional. Altres mètodes utilitzats per introduir correlació electrònica que es poden citar són el CIPSI [209-211] que combina el mètode pertorbacional i el variacional, el Coupled-Cluster (CC) desenvolupat per diferents autors [212-220] o el més recent anomenat quadratic configuration interaction (QCI) del grup de Pople. [221,222]

Anem a comentar breument a continuació els mètodes variacional i pertorbacional.

2.1.1.2.3.1 Mètode variacional

Els mètodes variacionals que podem utilitzar per tal d'introduir correlació electrònica són el mètode d'interacció de configuracions (CI) [223,224] i els mètodes multiconfiguracionals (MCSCF). [225] Donat que en la present Tesi no s'han fet càlculs MCSCF, només comentarem ara el mètode CI.

En el mètode d'interacció de configuracions s'expressa la funció d'ona del sistema Ψ com a combinació lineal de determinants de Slater, construïts a partir de les funcions monoelectròniques que s'han obtingut després de resoldre les equacions de

Roothaan amb una sèrie limitada de funcions de base, o sigui:

$$|\Psi\rangle = c_0|\theta_0\rangle + \sum c'_a|\theta'_a\rangle + \sum c^{rs}_{ab}|\theta^{rs}_{ab}\rangle + \dots \quad (30)$$

on θ_0 és el determinant de Slater format pels N spin-orbitals de més baixa energia. θ'_a difereix de θ_0 en què s'ha substituït el spin-orbital χ_a pel χ_r , és a dir, es tracta d'una configuració monoexcitada que correspon a un sistema on un electró s'ha promocionat d'un spin-orbital a ocupat en l'estat fonamental a un de virtual r . Per la seva banda, θ^{rs}_{ab} representa un determinant d'una configuració biexcitada.

A mesura que afegim més configuracions, una funció d'ona CI s'aproxima més i més a la millor funció polieletrònica que es pot tenir amb aquella base. Si es consideren totes les excitacions per a un conjunt de base finit determinat arribem a la funció full-CI. Donat que això suposa un gran temps de càlcul per poc que el sistema sigui un xic gran, sovint s'agafen només les configuracions simplement i doblement excitades (CISD). En aquests casos es parla de CI truncades, les quals presenten com a principal problema el fet que no són size-consistent, si bé aquest problema es pot atenuar parcialment mitjançant la correcció de Davidson. [226]

Una vegada s'ha definit la funció d'ona, els coeficients de l'expansió es determinen variacionalment, el que porta a la resolució d'un sistema d'equacions lineal de dimensió igual al nombre de determinants de Slater considerats.

2.1.1.2.3.2 Mètode pertorbacional

En aquest apartat s'exposaran els mètodes pertorbacionals per introduir l'energia de correlació que es basen en la teoria de Rayleigh-Schrödinger (RS) [227,228] i que constitueixen l'anomenada *Many Body Perturbation Theory* (MBPT). [229-233] A diferència dels mètodes d'interacció de configuracions aquests no són variacionals però,

en canvi tenen la propietat de ser consistents de tamany, és a dir, quan s'aplica a un conjunt de sistemes aïllats, s'obtenen resultats additius.

Suposem que Ψ sigui la funció d'ona a determinar i \hat{H} el hamiltonià total correcte del sistema. En aquesta aproximació el hamiltonià \hat{H} s'expressa com a suma del hamiltonià \hat{H}^0 i d'una pertorbació \hat{V} .

$$\hat{H} = \hat{H}^0 + \hat{V} \quad (31)$$

on \hat{H}^0 és el hamiltonià d'ordre zero del qual es coneixen les seves funcions pròpies Ψ_i^0 i valors propis ε_i^0 .

En el procediment matemàtic s'introdueix un paràmetre λ adimensional que representa d'alguna manera el grau de pertorbació del sistema. Així si $\lambda = 0$ el sistema no està pertorbat i ve definit per les funcions Ψ_i^0 , mentre que per $\lambda = 1$ el sistema es troba totalment pertorbat. L'energia i funció d'ona per a qualsevol estat no degenerat poden desenvolupar-se en sèrie de potències de la següent forma:

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^{(0)} + \lambda \varepsilon_i^{(1)} + \lambda^2 \varepsilon_i^{(2)} + \dots = \sum_{k=0}^{\infty} \lambda^k \varepsilon_i^{(k)} \quad (32)$$

$$|\Psi_i\rangle = |\Psi_i^{(0)}\rangle + \lambda |\Psi_i^{(1)}\rangle + \lambda^2 |\Psi_i^{(2)}\rangle + \dots = \sum_{k=0}^{\infty} \lambda^k |\Psi_i^{(k)}\rangle$$

on les $\varepsilon_i^{(k)}$ i les $|\Psi_i^{(k)}\rangle$ són les correccions d'ordre k a l'energia i a la funció d'ona, respectivament, sense pertorbar. Les energies a diferents nivells s'obtenen truncant aquesta sèrie a un determinat nivell i fent $\lambda = 1$. Així l'energia amb correccions fins a segon ordre (MP2) ve donada per:

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^{(0)} + \varepsilon_i^{(1)} + \varepsilon_i^{(2)} \quad (33)$$

on pot demostrar-se que:

$$\varepsilon_i^{(1)} = \langle \Psi_i^{(0)} | \hat{V} | \Psi_i^{(0)} \rangle \quad (34)$$

$$\varepsilon_i^{(2)} = \langle \psi_i^{(0)} | \hat{V} | \psi_i^{(1)} \rangle$$

Pot observar-se que per conèixer la correcció d'ordre dos a l'energia cal saber no-més la correcció de primer ordre de la funció. Aquesta correcció pot expressar-se com a combinació lineal de les funcions no pertorbades:

$$\psi_i^{(1)} = \sum_n a_n \psi_n^{(0)} \quad (35)$$

on pot demostrar-se que:

$$a_n = \frac{\langle \psi_n^{(0)} | \hat{V} | \psi_i^{(0)} \rangle}{\varepsilon_i^{(0)} - \varepsilon_n^{(0)}} \quad n \neq i \quad (36)$$

Tenint en compte això, l'energia fins a segon ordre és:

$$\varepsilon_i = \varepsilon_i^{(0)} + \langle \psi_i^{(0)} | \hat{V} | \psi_i^{(0)} \rangle + \sum_{n \neq i} \frac{|\langle \psi_i^{(0)} | \hat{V} | \psi_n^{(0)} \rangle|^2}{\varepsilon_n^{(0)} - \varepsilon_i^{(0)}} \quad (37)$$

Les expressions de l'energia amb correccions d'ordre superior són bastant complicades i s'obtenen algebraicament o bé basant-se en tècniques diagramàtiques.

Una vegada determinades les expressions per obtenir les correccions de l'energia i de la funció d'ona cal definir el hamiltonià d'ordre zero. La definició d'aquest hamiltonià pot fer-se segons la partició Epstein-Nesbet [234,235] i la de Møller-Plesset, [236] essent aquesta darrera la que s'utilitza més habitualment. La partició Møller-Plesset pren el hamiltonià d'ordre zero com a suma dels operadors monoelectrònics de Fock. D'aquesta manera l'energia amb la correcció de primer ordre $\varepsilon_i^{(0)} + \varepsilon_i^{(1)}$ correspon a l'energia Hartree-Fock i, per tant, les primeres correccions a l'energia Hartree-Fock apareixen en les correccions de segon ordre.

2.1.1.2.4 Derivades de l'energia

D'un sistema químic ens interessa no pas tan sols la seva energia i funció d'ona, sinó també la resposta que ofereix a estímuls externs. Aquest aspecte es tractarà a la secció 2.1.2, en allò que fa referència a camps elèctrics. Per una altra part és molt interessant conèixer les variacions de l'energia respecte de canvis en els paràmetres que intervenen en la funció d'ona. En particular, les derivades de l'energia respecte a desplaçaments nuclears ens donen la informació necessària per localitzar punts estacionaris en les hipersuperfícies de potencial. Presentarem aquí el càlcul analític de les derivades de l'energia respecte a un desplaçament nuclear per una funció d'ona RHF a capa tancada. Aquest mètode ha sigut el més àmpliament utilitzat en les optimitzacions de geometries que es presenten en aquest treball.

L'energia electrònica per una funció d'ona RHF a capa tancada ve donada com ja hem vist per:

$$E_{\text{RHF}} = 2 \sum_i^n h_{ii} + \sum_i^n \sum_j^n (2J_{ij} - K_{ij}) \quad (38)$$

a on h_{ii} representa les integrals monoelectròniques,

$$h_{ii} = \sum_{\mu\nu}^{\text{AO}} c_{\mu i} c_{\nu i} H_{\mu\nu} \quad (39)$$

i $(ii | jj)$ les integrals bielectròniques,

$$(ii | jj) = \sum_{\mu\nu\sigma\lambda}^{\text{AO}} c_{\mu i} c_{\nu i} c_{\sigma j} c_{\lambda j} (\mu\nu | \sigma\lambda) \quad (40)$$

en funció de la base atòmica.

Derivant l'expressió (38) respecte a una coordenada nuclear a , tal com fan Saxe, Yamaguchi, i Schaefer, [237] s'obté l'expressió:

$$\frac{\partial E_{\text{RHF}}}{\partial a} = 2 \sum_i^{\text{occ}} h_{ii}^a + \sum_{ij}^{\text{occ}} [2(ii | jj)^a - (ij | ij)^a] - 2 \sum_i^{\text{occ}} S_{ij}^a \epsilon_i \quad (41)$$

a on les derivades de les integrals mono i bielectròniques i les derivades de les integrals de recobriment es defineixen de forma paral·lela a les expressions sense derivar:

$$h_{ii}^a = \sum_{\mu\nu}^{AO} c_{\mu i} c_{\nu i} \frac{\partial h_{\mu\nu}}{\partial a} \quad (42)$$

$$(ii | jj)^a = \sum_{\mu\nu\sigma\lambda}^{AO} c_{\mu i} c_{\nu i} c_{\sigma j} c_{\lambda j} \frac{\partial (\mu\nu | \sigma\lambda)}{\partial a} \quad (43)$$

$$S_{ii}^a = \sum_{\mu\nu}^{AO} c_{\mu i} c_{\nu i} \frac{\partial S_{\mu\nu}}{\partial a} \quad (44)$$

i a on ϵ_i són les energies orbital que venen donades pels valors propis de la matriu de Fock $\epsilon_i = F_{ii}$, els elements de la qual per a funcions d'ona RHF a capa tancada tenen la forma:

$$F_{ij} = h_{ij} + \sum_k^{occ} [2(ij | kk) - (ik | jk)] \quad (45)$$

2.1.1.3 Mètode de l'enllaç de valència (VB)

La teoria de l'enllaç de valència (per a articles de revisió veure [238-243]) va aparèixer l'any 1927 de la mà de Heitler i London, els quals van aplicar per primer cop aquest mètode de càlcul de l'energia a la molècula d'hidrogen. Es tracta doncs, d'una teoria anterior a la d'orbitals moleculars, i de fet ha estat injustament oblidada a partir de 1960, encara que darrerament torna a despertar l'interès dels químics teòrics degut a les seves grans possibilitats.

La idea bàsica consisteix en construir la funció d'ona electrònica molecular directament a partir de les funcions d'ona dels àtoms, permetent l'intercanvi de parells d'electrons de valència entre els orbitals atòmics dels àtoms enllaçats. Cada forma

diferent d'aparellar els electrons per formar els enllaços químics es coneix amb el nom d'*estructura de Rumer*.

En aquest mètode la funció d'ona s'expressa com a combinació lineal d'estructures de Rumer, cadascuna d'elles amb un pes determinable quantitativament i amb un significat físic idèntic al de les estructures habitualment emprades pels químics orgànics. La funció d'ona es diu que és un híbrid de ressonància de les diferents estructures de Rumer.

Un cop coneguda la funció d'ona, l'energia s'obté a partir del principi variacional, segons:

$$E = \frac{\langle \Psi_{VB} | \hat{H} | \Psi_{VB} \rangle}{\langle \Psi_{VB} | \Psi_{VB} \rangle} \quad (46)$$

El principal problema del mètode és la gran quantitat d'estructures de Rumer iòniques (apart de les covalents) que s'han d'introduir per tenir una bona descripció del sistema i una bona energia. El paper de les estructures iòniques és bàsic en el mètode de l'enllaç de valència clàssic, perquè permet tenir en compte la deformació dels orbitals atòmics en la formació de la molècula. Per la seva banda, el mètode spin-coupled VB [240,244-246] només utilitza les estructures de Rumer covalents, però optimitza els orbitals atòmics inicials, de manera que es pot considerar a cavall entre la teoria VB clàssica i la teoria MO.

2.1.1.3.1 Estructures de Rumer

En el tractament no relativista l'hamiltonià no depèn de les variables de spin \hat{S}^2 o \hat{S}_z , de manera que la funció d'ona pot escriure's com a producte d'una part espacial (θ) per una de spin (Ω):

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) = \theta(r_1, r_2, \dots, r_N) \Omega_{S,M}^N(\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_N) \quad (47)$$

Donat un valor de la multiplicitat $2S+1$ i un número d'electrons N per a un sistema determinat, hi ha un número concret de funcions de spin independents $\Omega_{S,M}^N$ cadascuna de les quals correspon a una estructura de Rumer, també anomenada estructura Valence Bond o estructura ressonant. [247]

Per la seva banda, la part espacial segons l'aproximació de partícules independents s'agafa com producte de N funcions (orbitals) d'un electró:

$$\theta(r_1, r_2, \dots, r_N) = o_1(r_1)o_2(r_2)\dots o_N(r_N) \quad (48)$$

Si en el producte orbital θ tota la sèrie d'orbitals o_i són diferents tenim *estructures covalents*; si un únic orbital apareix dues vegades llavors parlem d'*estructures monoioniques*; i en general parlem d'*estructures n-ioniques* quan n parells d'orbitals iguals són usats en la funció espacial.

El problema de construir totes les possibles funcions de spin independents per a un sistema de N electrons i spin S es pot resoldre utilitzant diferents mètodes [241] tots ells fàcilment relacionables entre si. Els més coneguts són els branching diagrams, els leading terms i els standard tableaux, també anomenats Yamanouchi-Kotani tableaux o Weyl tableaux. Aquest darrer mètode és el més recomanable per la seva implementació a un programa de càlcul.

En qualsevol cas, la fórmula més general que ens dóna el número de funcions de spin independents i-ioniques per un sistema de N electrons, amb U funcions de base i spin S , és:

$$n_s = \binom{U}{i} \binom{U-i}{N-2i} \frac{(2S+1)(N-2i)!}{(\frac{1}{2}N-i+S+1)!(\frac{1}{2}N-i-S)!} \quad (49)$$

Quasibé sempre, $U=N$ i en aquest cas si només considerem les estructures covalents, el número total de funcions de spin independents que ens dóna el número total de

maneres de situar N electrons en N orbitals amb spin final S, és:

$$\frac{(2S + 1)N!}{(\frac{1}{2}N + S + 1)!(\frac{1}{2}N - S)!} \quad (50)$$

2.1.1.3.2 Càlcul de l'energia en el mètode de l'enllaç de valència

La funció d'ona VB total s'escriu com a combinació lineal d'estructures de Rumer,

$$\Psi_{VB} = \sum_i c_i V_i \quad (51)$$

on a la vegada cada estructura de Rumer és combinació lineal de determinants de Slater segons:

$$V_i = \sum_l d_{il} DS_l \quad (52)$$

Els coeficients d_{il} són coneguts, donat que són el resultat de la normalització de l'estructura de Rumer V_i ($\langle V_i | V_i \rangle = 1$). Els coeficients c_i es determinen a l'igual que l'energia, a partir de la resolució de l'equació variacional,

$$HC = SCE \quad (53)$$

amb

$$h_{ij} = \langle V_i | H | V_j \rangle = \sum_l \sum_k d_{il} d_{jk} \langle DS_l | H | DS_k \rangle \quad (54)$$

$$S_{ij} = \langle V_i | V_j \rangle = \sum_l \sum_k d_{il} d_{jk} \langle DS_l | DS_k \rangle$$

Els valors de la integral $\langle DS_l | H | DS_k \rangle$ en l'equació (54) es determinen utilitzant les regles de Slater si els orbitals són ortogonals, o les regles de Löwdin en cas contrari. [241]

De la resolució de (53) obtenim l'energia de l'estat fonamental i de tots els excitats, així com els coeficients que corresponen a cada estructura de Rumer per als diferents estats electrònics. Finalment, el pes de cada estructura de Rumer en la funció d'ona VB es pot determinar amb la fórmula de Gallup [248] o amb la de Chirgwin i Coulson. [249] En aquest darrer cas, el pes de l'estructura n en l'estat electrònic i és:

$$W_{in} = d_{in}^2 + \sum_m d_{im}d_{in}S_{nm} \quad (55)$$

$$S_{nm} = \langle V_n | V_m \rangle$$

En el transcurs d'aquesta Tesi s'ha preparat un programa VB semiempíric on a partir dels valors de les integrals mono i bielectròniques entre orbitals atòmics, extretes d'un càlcul tipus AMPAC o MOPAC, es resol l'equació (53) i es determina variacionalment l'energia VB i els pesos de les estructures ressonants considerades. Les integrals de (54) s'evaluen amb les regles usals de Slater, a partir del número de diferències que apareixen al comparar dos determinants de Slater.

2.1.1.3.3 Projectió d'una funció MO sobre una VB

Per a una determinada base, el càlcul full-CI i el VB amb totes les possibles estructures n -iòniques coincideixen. Són el límit no relativista per a aquesta base. A part d'aquest fet, una funció d'ona es pot expressar tant en forma MO com en VB. Per raons històriques i d'eficiència és avui en dia molt més fàcil construir funcions d'ona MO que no pas VB. Llavors, una manera d'aprofitar la facilitat d'anàlisi d'una funció VB però mantenint la facilitat de càlcul d'una funció MO, és projectar la funció MO sobre la VB.

Per projectar una funció d'orbitals moleculars en una d'enllaç de valència es pot fer servir el formalisme de Hiberty i Leforestier. [250-253] Aquest mètode està basat

en el fet que tant la funció VB com la MO poden expandir-se linealment en una sèrie comuna de determinants de Slater formats per orbitals atòmics.

La funció MO a capa tancada és un determinant de Slater format per spin orbitals,

$$\Psi_{MO} = | \chi_1 \bar{\chi}_1 \dots \chi_i \bar{\chi}_i \dots | \quad (56)$$

cadascun dels quals és a la vegada combinació lineal d'orbitals atòmics,

$$\chi_i = \sum_{\mu} c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (57)$$

de manera que,

$$\Psi_{MO} = \sum_i^n K_i D_i^{AO} \quad (58)$$

Els coeficients K_i es determinen a partir de la matriu de coeficients MO segons:

$$K_i = \sum_P (-1)^P P(\dots c_{\mu i} c_{\nu j} \dots) \sum_P (-1)^P P(\dots c_{\mu' i} c_{\nu' j} \dots) \quad (59)$$

on $c_{\mu i}$ es refereixen als spin orbitals de spin α i els $c_{\mu' i}$ als de spin β . P són totes les possibles permutacions dels índexs i i j entre sí, de manera equivalent a com es desenvolupa un determinant de Slater en productes de Hartree.

Per la seva banda, com ja hem vist, la funció d'enllaç de valència és combinació lineal d'estructures de Rumer,

$$\Psi_{VB} = \sum_i^m c_i V_i \quad (60)$$

i cada estructura de Rumer s'expressa com a combinació lineal de determinants de Slater d'orbitals atòmics,

$$V_i = \sum_j^{\frac{N}{2}} d_{ij} D_j^{AO} \quad (61)$$

o sigui que:

$$\Psi_{VB} = \sum_i^n c_i \sum_j^{\frac{N}{2}} d_{ij} D_j^{AO} \quad (62)$$

De (58) i (62) es pot veure que la funció MO (o qualsevol funció CI o CASSCF [179]) pot expandir-se en una sèrie completa de funcions VB segons:

$$\Psi_{MO} = \sum_n k_n V_n \quad (63)$$

D'aquesta manera solucionant només un sistema d'equacions lineals es pot obtenir una funció VB a partir d'una MO. Aquest sistema d'equacions conté més equacions que variables desconegudes (k_n), si bé el sistema presenta una solució única perquè la major part de les equacions són linealment dependents. Cal fer notar que s'han de considerar totes les estructures VB dins d'una classe (per exemple, covalents, monoòniques, biòniques, *etc.*), i que per cada classe s'ha de resoldre un sistema independent d'equacions lineals.

En principi, es pot utilitzar qualsevol base per obtenir la funció MO a projectar, encara que només la base mínima permet dotar de significat físic a totes les estructures VB que es poden construir. S'han publicat treballs molt interessants utilitzant aquest mètode, [254-260] un bon nombre d'ells dedicats a estudiar els 1,3-dipols. En l'apèndix A d'aquesta Tesi es presenta el programa FORTRAN escrit en el transcurs de la mateixa, que permet construir les estructures de Rumer d'un sistema de característiques determinades, i projectar una funció MO calculada a partir de qualsevol dels programes *ab initio* de què disposem en el departament, en una funció VB.

2.1.1.3.4 Comparació VB/MO

El mètode VB en principi es pot aplicar a qualsevol problema químic. [242] El fet que aquesta funció s'expressi com a combinació lineal d'estructures de Rumer permet dotar-la de significat físic de manera clara, cosa que facilita la interpretació dels resultats. El problema es presenta quan s'intenta tractar sistemes de més de

15-20 electrons. En aquest cas, el nombre d'estructures ressonants n-iòniques que s'obtenen és extremadament gran, el que impossibilita l'ús del mètode VB clàssic. El mètode spin-coupled VB disminueix considerablement aquest problema, si bé a l'optimitzar els OA es perd gran part de la capacitat interpretativa del mètode.

En qualsevol cas, d'entrada i tal com ha assenyalat McWeeny [261] el mètode VB presenta certs avantatges sobre el mètode MO com poden ésser:

- No hi ha passos iteratius i per tant no presenta problemes de convergència.
- Si es consideren totes les estructures dins d'una determinada classe, no dona problemes de consistència de tamany donat que utilitza OA.
- L'estat fonamental i els excitats es calculen simultàniament.
- La programació és relativament senzilla.
- La funció VB sempre és funció pròpia de \hat{S}^2 , donat que les estructures de Rumer són funcions independents de spin.
- No dona problemes de degeneració i quasi-degeneració perquè la funció pertany sempre a una de les representacions irreduïbles del sistema.

Per acabar recordar que com ja hem dit fer un càlcul VB amb totes les estructures ressonants (full-VB) equival a fer un càlcul MO full-CI, i per tant, que en el límit els dos mètodes coincideixen.

Creiem que el gran esforç desenvolupat a partir dels anys 60 per construir un mètode MO aplicable als sistemes químics, no s'ha produït encara amb la teoria VB, si bé, per altra part presenta uns avantatges evidents sobre la MO, i uns inconvenients que caldrà resoldre en els propers anys.

2.1.2 EFECTE DE PERTORBACIONS EXTERNES

Són ben coneguts els efectes de pertorbacions externes en l'estructura i reactivitat química de les molècules. Des d'un punt de vista experimental, han estat àmpliament estudiats els efectes de camps elèctrics uniformes, com els que apareixen en la doble capa electroquímica, [262,263] i també els de camps elèctrics no-uniformes, com els creats per càrregues puntuals en les zeolites. [264,265] Per un altre costat, moltes reaccions químiques es veuen altament influenciades pel camp de reacció creat pel solvent. Un exemple d'això és l'estudi pioner portat a terme per Menshutkin ara fa un segle de la reacció entre la trietilamina i el iodur d'etil utilitzant vint-i-tres solvents diferents. [266,267]

En aquest apartat es comentarà com es pot introduir en un càlcul tèoric l'efecte de pertorbacions externes com poden ésser les degudes a un camp elèctric o a la presència de solvent.

2.1.2.1 Camps elèctrics

La presència d'un camp elèctric es pot computar introduint en l'hamiltonià mo-noelectrònic el terme corresponent a la interacció entre electró i camp. Evidentment l'energia nuclear també es veu alterada per efecte del camp aplicat. D'aquesta manera el hamiltonià ve expressat segons:

$$\hat{H}^* = \hat{H} - \vec{F}(\vec{r} - \vec{C}) \quad (64)$$

on \vec{F} és el camp elèctric, \vec{r} les coordenades de l'electró, \vec{C} és el punt al voltant del qual es calcula l'efecte d'aquest camp, i \hat{H} és l'hamiltonià en absència de pertorbació externa.

En aquest cas només cal determinar de bell nou les integrals monoelectròniques del tipus:

$$\langle \mu | -\vec{F}(\vec{r} - \vec{C}) | \nu \rangle \quad (65)$$

El canvi en l'estructura electrònica s'obté a partir d'un nou procés SCF que s'inicia amb la funció convergida en absència de camp elèctric.

En alguns casos s'han realitzat estudis teòrics sense permetre la relaxació de la geometria. [268] Tanmateix, donat que l'aplicació del camp elèctric crea noves forces en els nuclis, [269] la molècula optimitzada sense tenir en compte cap pertorbació, deixa d'ésser un mínim en la superfície de potencial quan s'aplica el camp. Cal, per tant, reoptimitzar les geometries inicials. [269-271] Ja han aparegut publicades les expressions analítiques a resoldre per obtenir els gradients i el hessià [272] de l'energia en presència d'un camp elèctric, expressions que s'han obtingut a partir de la resolució de les equacions de Hartree-Fock acoblades [273] modificades per tenir en compte la pertorbació.

En aquesta Tesi, per computar la influència del camp elèctric s'han utilitzat les opcions de GAUSSIAN, FIELD i MESSAGE per camps elèctrics uniformes i no-uniformes respectivament. Amb la opció MESSAGE es pot col·locar un conjunt de càrregues puntuals que creen camps elèctrics no uniformes. Aquestes càrregues poden tenir qualsevol signe.

2.1.2.2 Camp de reacció creat per un solvent

La major part de les reaccions químiques o bioquímiques tenen lloc en solució. La resposta experimental del sistema depèn molt del medi en el qual es desenvolupa la reacció. Per estudiar les complicades interaccions entre el solut i el solvent s'han

proposat aproximacions teòriques de diferent grau de complexitat. Els mètodes proposats es poden dividir en tres grups: a) models discrets; b) models continus; i c) models discret-continus.

En els models discrets es pren un número finit de molècules de solvent que envolten el solut tot i mantenint la seva identitat química. Aquest model descriu bé efectes tals com els enllaços d'hidrogen o la transferència de càrrega entre les molècules de solut i solvent. El principal inconvenient d'aquest model es troba en el limitat número de molècules de solvent que es poden considerar, si bé aquesta dificultat pot ésser superada amb altres aproximacions, pels mètodes de Monte Carlo i de dinàmica molecular.

En els models continus el dissolvent es representa per les seves propietats macroscòpiques i es descriu com un medi homogeni i continu, caracteritzat per la seva constant dielèctrica ϵ . La molècula de solut interacciona amb el dielèctric polaritzable a través del camp de reacció que es crea degut a les càrregues induïdes sobre el medi dielèctric per la distribució electrònica del solut. Entre d'altres, es poden utilitzar dos possibles aproximacions en aquest mètode com són el model de cavitat [274-277] i el model de càrregues efectives. [278]

Per la seva banda, els models discret-continus combinen els dos models anteriors, incorporant una capa de solvatació on les molècules de solvent són tractades explícitament, mentre que en la regió fóra d'aquesta capa, el solvent es tracta com un continu polaritzable.

Comentem ara un xic més a fons el model de cavitat de Tomasi [276,277,279-282] donat que ha estat el més utilitzat en la present Tesi. En aquest mètode el solvent és representat per un dielèctric polaritzable de constant dielèctrica ϵ , i el solut es situa dins d'una cavitat definida per la seva pròpia geometria. La forma de la cavitat és

la que s'obté per la intersecció d'un conjunt d'esferes centrades cada una sobre un dels àtoms del sistema, amb un radi determinat. Es sol agafar el radi de Van der Waals augmentat en un 20%. L'energia de cavitació (G_{cav}) necessària per situar el solut en la cavitat es calcula amb la fórmula de Pierotti. [283] Per la seva banda, la polarització del dielèctric degut al solut es simula amb la creació d'un sistema de càrregues sobre la superfície de la cavitat. Així, si $\rho(\vec{r})$ és la densitat electrònica del solut que actua sobre el dissolvent, i $\sigma(\vec{s})$ és la densitat de càrrega superficial sobre la superfície de la cavitat es té que:

$$\sigma(\vec{s}) = \frac{\epsilon - 1}{4\pi\epsilon} \left(\frac{\partial V(\vec{r})}{\partial \vec{n}} \right) \quad (66)$$

amb,

$$V(\vec{r}) = V_\rho(\vec{r}) + V_\sigma(\vec{r}) \quad (67)$$

on $V(\vec{r})$ és el potencial electrostàtic total i $V_\rho(\vec{r})$ i $V_\sigma(\vec{r})$ són les contribucions al potencial electrostàtic que provenen de la distribució de càrrega en el solut i en la superfície de la cavitat, respectivament. El procés comença fent un càlcul SCF que permet determinar $\rho(\vec{r})$. Mantenint $\rho(\vec{r})$ constant es calcula $\sigma^{00}(\vec{s})$ substituint en l'equació (66) i (67). Amb la nova $\sigma^{00}(\vec{s})$ s'obté una $\sigma^{01}(\vec{s})$ i així fins arribar a l'autoconsistència $\sigma^{of}(\vec{s})$. Arribats a aquest punt del mètode de Tomasi, encara no es té en compte la polarització del solut pel camp de reacció. Seguidament el que es fa és introduir $\sigma^{of}(\vec{s})$ en l'equació de Schrödinger i es calcula una nova $\rho'(\vec{r})$, amb la qual es pot determinar $\sigma^{10}(\vec{s})$, i així succesivament fins a $\sigma^{nf}(\vec{s})$. En general, la convergència és molt ràpida ($n, f \leq 4$). D'aquesta manera es té en compte la polarització del solvent pel solut i l'efecte de retropolarització del solut pel solvent (feed-back effect). Del resultat d'aquest càlcul s'obté la contribució electrostàtica a l'energia lliure (ΔG_{el}). Finalment, la suma de ΔG_{el} i G_{cav} ens dóna una aproximació a l'energia lliure de solvatació (ΔG_{solv}).

2.1.3 IMPLEMENTACIONS METODOLOGIQUES

Fins aquí, servint-nos de l'aproximació de Born-Oppenheimer i de les teories MO per un costat i VB per l'altre, hem establert les equacions de l'energia per a una molècula. Arribats a aquest punt, hi ha una sèrie de mètodes de càlcul per a les integrals que hi apareixen que ens permetran resoldre aquestes equacions. Tant a nivell MO com VB, els podem separar en dos grans grups com són els mètodes semiempírics i els mètodes *ab initio*. En parlarem a continuació aplicats a la teoria MO donat que ha estat la més desenvolupada.

2.1.3.1 Mètodes semiempírics en la teoria MO

En els mètodes semiempírics s'introdueixen certes aproximacions i paràmetres ajustables a partir de resultats experimentals, per tal de simplificar el número total d'integrals a calcular. Excepte en casos molt particulars, mai no es considera la totalitat dels electrons en aquest tipus de càlculs. Podem agrupar els mètodes respecte al nombre d'electrons considerats en:

- Mètodes AVE, si es consideren tots els electrons de valència.
- Mètodes π , si només es consideren els electrons π .

També es pot fer una classificació en:

- Mètodes d'electrons independents, quan no es considera la repulsió interelectrònica.
- Models SCF, quan es consideren les repulsions interelectròniques.

L'estalvi de temps de càlcul respecte a un mètode *ab initio* és molt important. La majoria d'aquests mètodes utilitzen l'aproximació ZDO (Zero Differential Overlap) [284] en la que se suposa que:

$$\langle \mu\nu | \lambda\sigma \rangle = \langle \mu\mu | \lambda\lambda \rangle \delta_{\mu\nu} \delta_{\lambda\sigma} \quad (68)$$

el que es tradueix en una disminució important del número d'integrals bielectròniques que cal calcular.

Dins dels mètodes semiempírics AVE que tenen en compte les repulsions interelectròniques i utilitzen l'aproximació ZDO, cal distingir els mètodes del grup de Pople [207,284] (CNDO,INDO,NDDO i PNDO) que intenten reproduir els moments dipolars experimentals de les molècules i els del grup d'en Dewar (MINDO, [285,286] MNDO, [287-289] AM1, [150,290] i PM3 [291,292]), que pretenen obtenir bons calors de formació.

El mètode més utilitzat en la present Tesi ha estat el mètode AM1 [150,151,293,294] (Austin Model 1) de Dewar. Aquest mètode està basat en l'aproximació NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap), i ve parametrizat a partir de calors de formació experimentals. Es pretén superar un problema que tenien anteriors mètodes, com és la mala representació de l'enllaç d'hidrogen sense que això suposi un increment del temps de càlcul. El problema rau en una tendència a sobreestimar les repulsions entre àtoms. La manera de solucionar-ho és modificar la funció de repulsió de Core (CRF). Comentar també que els mètodes AM1 i PM3 utilitzen les mateixes expressions formals, encara que tinguin diferent parametrizacions.

S'han usat dues estratègies per modificar la CRF i reduir l'excessiva repulsió interatòmica a grans distàncies. D'entrada, un o més termes gaussians atractius s'han afegit en les zones en què les repulsions eren excessives. Per un altre cantó, s'han

afegit termes gaussians repulsius centrats en les zones de més petita separació internuclear. Tot això condueix sobretot a una reducció del terme principal de repulsió en l'expressió de la CRF, i d'aquesta manera s'aconsegueix reduir la repulsió a distàncies interatòmiques grans.

Hem utilitzat el mètode semiempíric AM1 en alguns càlculs per dues raons principals. La primera és que només per als mètodes MNDO i l'AM1 s'han publicat paràmetres per al zinc, [153,154] encara que tenim notícia que per al mètode PM3 també s'està a punt de treure'n. La segona raó és la importància de l'enllaç d'hidrogen en els sistemes bioquímics, i concretament en l'anhidrasa carbònica, enllaç que només el mètode AM1 pot reproduir de manera satisfactòria. [295]

Finalment, comentar de passada el mètode Hückel estès, que s'agrupa dins dels mètodes AVE com a model d'electrons independents, i que és de gran interès per a compostos químics amb un nombre d'àtoms gran. Aquest mètode ha adquirit relevància sobretot després dels treballs de Hoffmann i col·laboradors. [296]

2.1.3.2 Mètodes *ab initio* en la teoria MO

Els mètodes *ab initio* són els que realitzen el càlcul de l'energia avaluant totes les integrals mono i bielectròniques que apareixen en les equacions de Roothaan. En aquests mètodes no s'hi introdueix cap paràmetre experimental i com a aproximacions només es considera la de Born-Oppenheimer i les que introdueix el propi mètode SCF.

Es poden classificar en dos grans grups que serien:

- Càlculs "all electron". Es consideren tots els electrons de la molècula sense distinció.

- Càlculs AVE. Es consideren només els electrons de valència i s'introdueix l'efecte dels electrons de core mitjançant un potencial monoelèctric.

Passem a comentar ara aquests dos tipus de mètodes *ab initio*.

2.1.3.2.1 Càlculs "all electron"

En l'aproximació de Roothaan-Hall els orbitals moleculars s'expressen com a combinació lineal d'orbitals atòmics que són els que constitueixen el conjunt de funcions de base. En el cas que el nombre de funcions fos infinit s'obtindria la millor aproximació a l'energia en el mètode SCF-MO i ens trobaríem en l'anomenat límit Hartree-Fock. Donat que no és possible treballar amb un nombre infinit de funcions cal triar conjunts de base finits. Les funcions més correntment emprades en aquests conjunts de base són les de Slater (STO) i les Gaussians (GTO).

Els orbitals tipus Slater tenen una dependència radial proporcional a $r^{n-1}e^{-\alpha r}$ i proporcionen una millor descripció de la densitat elèctrica que les funcions gaussianes. Tanmateix, resulta difícil resoldre les integrals de Coulomb i de bescanvi amb aquestes funcions.

Les bases operacionals són les GTO, que presenten una dependència radial proporcional a $r^{n-1}e^{-\alpha r^2}$, la qual cosa fa que el càlcul de les integrals resulti més senzill que en el cas anterior ja que el producte de dues funcions gaussianes centrades en diferents punts de l'espai és una altra funció gaussiana centrada en un tercer punt. Aquest tipus de funcions, però, representen pitjor la densitat elèctrica i, per aquest motiu, cal utilitzar un nombre suficient de gaussianes o representar cada funció com a combinació lineal de gaussianes amb coeficients fixos.

Poden distingir-se els següents tipus de bases:

- Base mínima: cada orbital atòmic es representa per una única funció o combinació lineal de funcions.
- Base estesa: cada orbital es representa per més d'una funció o combinació lineal de funcions. Dins d'aquest grup es distingeixen les bases doble- ζ , triple- ζ , etc., segons es representi cada orbital per dues, tres, etc., funcions o combinacions lineals de funcions, respectivament.
- Base *split valence*: és un cas intermedi entre les dues anteriors. En aquest cas, es descriuen els orbitals interns amb una sola funció o combinació lineal de funcions i els orbitals de la capa de valència amb més d'una funció o combinació lineal de funcions.

Sovint per realitzar càlculs moleculars és necessari afegir a aquests conjunts de base funcions de polarització i funcions difuses per descriure aquells orbitals no ocupats en els àtoms que poden tenir importància en la molècula.

Les bases més freqüentment utilitzades són les anomenades bases standard del grup de Pople. Aquestes bases presenten la particularitat que els exponents de les gaussianes que representen orbitals amb el mateix nombre quàntic principal (per exemple, s i p) són iguals, encara que els coeficients de les combinacions lineals són diferents. Les principals bases d'aquest grup són les bases mínimes STO-NG [297,298] que utilitzen una combinació lineal de N gaussianes per a cada orbital atòmic i les bases *split valence* N-21G i N-31G, [299] doble- ζ en la capa de valència, en les que cada orbital de valència es desdobra en dos grups de gaussianes de diferents exponents, aconseguint-se així una més gran flexibilitat. Els exponents s'optimitzen en els àtoms i s'utilitzen sense canvis en els càlculs moleculars. Per una altra part, hem demostrat en el transcurs d'aquesta Tesi que l'optimització a escala molecular dels exponents

en funcions de polarització no condueix necessàriament a millors resultats en les diferències energètiques entre les espècies que intervenen en el procés. [300]

En qualsevol cas, sigui quina sigui la base utilitzada, sempre cal assegurar-se que la base està equilibrada i no dóna excessiva densitat electrònica a un determinat àtom o enllaç. El problema de com determinar la millor base per un determinat estudi ha estat àmpliament debatut, [301-303] si bé en darrera instància s'acaba convertint moltes vegades en un problema d'intuïció i experiència.

Al llarg de la Tesi la base que més hem utilitzat ha estat la 3-21G de Pople, [304-307] recentment ampliada a metalls de transició de la primera [308] i segona [309] files, encara que també s'han assajat altres bases, entre elles les del grup d'Huzinaga [310-317] que són també de tipus gaussià, però en les que s'elimina la restricció que presenten les bases del grup de Pople de tenir el mateix exponent per a gaussianes que representen orbitals atòmics del mateix nombre quàntic principal. Dos exemples es poden trobar en les bases MINI-i, que són bases mínimes que intenten reproduir resultats doble- ζ , i les bases MIDI-i que són *split valence* i resulten de subdividir les contraccions de gaussianes corresponents a les MINI-i.

2.1.3.2.2 Càlculs amb només electrons de valència. Pseudopotencials.

Els càlculs *ab initio effective core potentials* (ECP's) [318-325] han estat pensats per tal de computar només els efectes dels electrons de valència. Ben sabut és que els electrons de valència són els que determinen la major part de les propietats químiques de la molècula. Els electrons de core no sofreixen transformacions massa importants. El seu efecte és apantallar la càrrega nuclear i proporcionar un camp efectiu sobre els electrons de valència.

La idea dels ECP's és intentar reproduir els càlculs all electron *ab initio* estalviant temps de càlcul en substituir els electrons interns (de core) per un potencial efectiu monoelèctric o pseudopotencial, i per tant no haver de computar totes les integrals bielectròniques per a aquests electrons.

En un càlcul amb tots els electrons, el hamiltonià atòmic ve donat per la següent expressió:

$$\hat{H} = \sum_i^N \left[-\frac{\nabla_i^2}{2} - \frac{Z}{r_i} \right] + \sum_{i<j}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (69)$$

on N correspon al nombre total d'electrons existents en l'àtom i Z és la càrrega nuclear.

En el mètode dels pseudopotencials el hamiltonià s'expressa de la següent manera:

$$\hat{H}_{ps} = \sum_i^{N_v} \left[-\frac{\nabla_i^2}{2} + \hat{W}_{ps}(i) \right] + \sum_{i<j}^{N_v} \frac{1}{r_{ij}} \quad (70)$$

on N_v és el nombre d'electrons de valència i \hat{W}_{ps} és l'operador monoelèctric de pseudopotencial que recull l'efecte dels electrons de core sobre els de valència.

Aquest operador \hat{W}_{ps} pot expressar-se de diferents formes, segons els paràmetres de què depengui. En aquest treball s'han utilitzat els pseudopotencials de Hay i Wadt [326-329] que s'expressen segons:

$$\hat{W}_{ps} = -\frac{Z}{r} + \sum_l \hat{W}_l(r) P_l \quad (71)$$

on P_l és l'operador angular de projecció sobre el subespai dels harmònics esfèrics, que permet incorporar en el potencial monoelèctric efectiu la dependència del moment angular:

$$P_l = \sum_{m=-l}^l |Y_{lm}\rangle \langle Y_{lm}| \quad (72)$$

i la funció $W_l(r)$ és la que ens descriu els efectes locals del potencial monoelèctric sobre un electró de simetria l . Una representació adequada d'aquesta funció podria ésser:

$$W_l(r) = \sum_i C_{i,l} r^{n_{i,l}} e^{\alpha_{i,l} r^2} \quad (73)$$

on $C_{i,l}$, $n_{i,l}$ i $\alpha_{i,l}$ són els paràmetres que s'han de determinar. Aquests s'obtenen de manera que el pseudooperador de Fock construït a partir de $W_l(r)$ ens condueixi a valors de les energies i dels pseudoorbitals el màxim de semblants possible als valors de ϵ_v i ϕ_v determinats prèviament en un càlcul all electron.

Un cop obtinguts els pseudopotencials, la resolució de l'equació de Schrödinger es realitza de manera anàlega a l'explicada anteriorment en l'apartat 2.1.1.2, és a dir, basant-nos en la teoria Hartree-Fock.

Per acabar, cal assenyalar que per a àtoms amb un nombre atòmic elevat, els efectes relativistes poden ésser importants a l'estudiar l'estructura dels seus compostos. Per això, en aquests casos s'inclouen alguns efectes relativistes en la parametrització del pseudopotencial. Els efectes relativistes que normalment s'inclouen en el pseudopotencial són els corresponents al terme de correcció de massa-velocitat i al de la correcció de Darwin que s'ha mostrat que són els que més influeixen. Per contra, el terme d'acoblament spin-òrbita pot negligir-se en la majoria dels casos. A més, la consideració d'aquest terme complicaria considerablement els càlculs.

2.1.3.3 Càlculs amb la teoria d'enllaç de valència

En la secció 2.1.1.3 hem comentat els principals aspectes de la teoria d'enllaç de valència. Volem exposar aquí dues aplicacions d'aquest mètode que hem desenvolupat en la present Tesi. El programa FORTRAN que hem escrit es troba en l'apèndix A

d'aquesta Tesi.

La primera fa referència a l'expansió d'una funció MO en una funció VB (veure apartat 2.1.1.3.3). Dins d'aquesta Tesi, s'ha desenvolupat un programa anomenat BELLVB [330] que genera les estructures ressonants per un sistema químic determinat (veure apartat 2.1.1.3.1) i que mitjançant l'algorisme de Hiberty projecta una funció MO en una VB, que possibilita la determinació dels pesos de les estructures ressonants (que permeten una fàcil interpretació química) a partir de funcions d'ona MO (que presenten més facilitat de càlcul). Aquest programa ha estat aplicat amb èxit a l'estudi dels efectes de perturbacions externes, concretament camps elèctrics i camps de reacció creats pel solvent, sobre els sistemes químics. [260]

En segon lloc, s'ha desenvolupat un mètode VB semiempíric que utilitza l'aproximació ZDO. El programa que genera les estructures ressonants del sistema químic és el mateix que en el cas anterior. Un cop obtingudes les estructures de Rumer, les integrals mono i bielectròniques necessàries per resoldre (54) es calculen dins les aproximacions AM1, MNDO, ... El tercer pas consisteix en calcular les h_{ij} (representació de l'operador hamiltonià en la base d'estructures ressonants) i S_{ij} segons (54) per acabar resolent (53). Per resoldre (54) s'utilitzen les regles de Slater, donat que dins l'aproximació ZDO estem tractant, afortunadament, amb orbitals que es fan ortogonals ($\langle \mu | \nu \rangle = \delta_{\mu\nu}$). El mètode que hem descrit s'ha aplicat de moment a l'estudi del dímer d'hidrogen, de l'aigua, i dels òxids i sulfurs de zinc i mercuri. El principal problema que presenta el mètode que hem ideat és la no-invariança respecte a la rotació dels OA i al fet que per un sistema petit amb 12 electrons apareixin ja 411312 estructures VB diferents si es consideren totes les possibles n-iòniques, el que complica molt la resolució per diagonalització de l'equació (53).

2.2 SUPERFÍCIES DE POTENCIAL

El curs d'una reacció química ve determinat entre altres factors per la funció energia potencial del moviment nuclear $U(R)$ que ens ha sortit en l'equació (8) quan parlàvem de l'aproximació Born-Oppenheimer, on R recull les coordenades dels N nuclis de les molècules reactants. $U(R)$ és una funció de $3N-6$ variables donat que hi ha tres graus de llibertat translacionals i tres de rotacionals (només n'hi ha dos per molècules lineals) que deixen $U(R)$ inalterada. La representació de $U(R)$ permet obtenir el que es coneix amb el nom de *superfície de potencial*.

El concepte de superfície de potencial, geometries d'equilibri, estats de transició (TS) i camins de reacció (IRP) emergeixen de l'aproximació de Born-Oppenheimer, que tracta el moviment dels electrons i dels nuclis per separat. Els mínims en la superfície de potencial nuclear es poden identificar amb la clàssica imatge d'estructures d'equilibri per a les molècules. Els punts cadira es poden relacionar amb els estats de transició donat que són punts màxims sobre un camí de mínima energia. La diferència energètica entre l'estat de transició i reactius s'anomena alçada de la barrera, de la qual depèn en gran part la velocitat de reacció. Per acabar, el camí de reacció es defineix com el camí que segueix una partícula clàssica relliscant a velocitat infinitesimal per la superfície de potencial des d'un estat de transició a un mínim. [331-335] En el cas que l'aproximació de Born-Oppenheimer no sigui vàlida, per exemple en les proximitats d'un creuament de dues superfícies diabàtiques, els efectes no-adiabàtics són importants i el significat clàssic de les estructures és menys clar. En els càlculs que hem dut a terme hem suposat que l'aproximació de Born-Oppenheimer és aplicable arreu.

La construcció de la superfície de potencial completa per a un sistema químic

requereix una gran quantitat de càlculs fins i tot per a molècules petites. De totes maneres, no cal construir de forma completa la superfície de potencial per estudiar una reacció química, donat que per trobar la barrera energètica només cal conèixer l'energia de l'estat de transició i la dels reactius, si bé l'estudi complet de la superfície de potencial ens permet obtenir informació referent a altres mecanismes possibles de reacció.

En els propers apartats tractarem dels mètodes que es fan servir per localitzar reactius, intermedis, productes i estats de transició en una superfície de potencial.

2.2.1 LOCALITZACIO DE PUNTS D'INTERES QUIMIC EN LA SUPERFICIE DE POTENCIAL

Els punts d'interès químic d'una superfície de potencial són els mínims que representen els reactius, productes i intermedis de la reacció, i els punts cadira o de sella que són els estats de transició.

Tots ells són punts estacionaris, el que suposa que les derivades de l'energia potencial respecte de tots els paràmetres geomètrics del sistema són nul·les.

Els valors propis de la matriu de derivades segones de l'energia respecte als paràmetres geomètrics mesuren la corbatura de la funció energia potencial sobre cadascuna de les direccions que corresponen als vectors propis. Per a un mínim tots aquests valors propis són positius, mentre que per un punt cadira tots són positius menys un. El vector propi que correspon al valor propi negatiu s'anomena vector de transició i ens dóna la direcció en que es mou l'estat de transició a l'anar de reactius a productes o a la inversa. El vector de transició ha de complir tres requisits de simetria: a) no pot

pertànyer a una representació degenerada del grup de simetria de la molècula, donat que en aquest cas al menys hi hauria un altre vector propi amb el mateix valor propi, i ja no estaríem davant un estat de transició de primer ordre; b) ha d'ésser antisimètric respecte de les operacions de simetria que converteixen reactius en productes; c) ha d'ésser simètric respecte a les operacions de simetria que deixen reactius i productes inalterats. Assenyalar també que l'estat de transició ha d'ésser el punt de més alta energia al llarg d'una línia que connecti reactius i productes. Si hi ha més d'un punt que compleix això, l'estat de transició serà el de més baixa energia de tots els que ho facin.

Abans de procedir a l'optimització de la geometria, cal elegir un sistema de coordenades per representar l'estructura de la molècula i la seva superfície de potencial. Gairebé tan important és l'elecció del sistema de coordenades com la del mètode d'optimització. També és important que les coordenades no siguin redundants per tal que les derivades respecte a les coordenades internes es puguin calcular sense ambigüetats. Per un altre costat, els acoblaments forts entre coordenades causa invariablement dificultats en les optimitzacions. Això és especialment cert en molècules cícliques o estats de transició, de manera que un canvi en l'elecció de les coordenades pot millorar o empitjorar sensiblement les optimitzacions. [336] En aquests casos, l'ús d'àtoms ficticis sense càrrega ni funcions de base, pot ajudar a definir una geometria a partir de distàncies i angles que ens resultin més convenients perquè estan menys acoblats. En tot cas, sempre queda l'últim remei d'optimitzar la molècula en coordenades cartesianes, que no estan gens acoblades.

Finalment, assenyalar que abans de començar un procés d'optimització és molt recomenable tenir una bona estimació de la geometria òptima. Els valors inicials per a les longituds d'enllaç i angles es poden obtenir, a vegades, de dades experimentals com estudis de Raigs-X, difracció electrònica o altres tipus d'espectroscòpia, o bé

d'anteriors càlculs teòrics. Per això hi ha diferents bases de dades, ja sigui en forma de llibre, de microfilm, o en suport magnètic o CD-ROM.

2.2.1.1 Optimització sense constriccions en funcions multivariable. Localització de mínims

Hi ha un gran nombre de mètodes diferents per a la minimització sense constriccions de funcions multivariable. [336,337] Un bon algorisme d'optimització ha de tenir una alta velocitat de convergència, ha d'ésser estable i fiable, i ha d'ésser poc costós des d'un punt de vista computacional. L'elecció del millor mètode depèn molt de cada cas particular.

La majoria dels algorismes utilitzats pels programes d'optimització de geometries es basen en l'expansió quadràtica de l'energia. En termes de les coordenades, \vec{x}_0 , l'energia calculada, E_0 , el gradient calculat o aproximat, \vec{g}_0 , i un hessià exacte o matriu de derivades segones aproximada, H , l'energia i el gradient poden expressar-se com:

$$E = E_0 + \vec{g}(\vec{x} - \vec{x}_0) + \frac{1}{2}(\vec{x} - \vec{x}_0)H(\vec{x} - \vec{x}_0) \quad (74)$$

$$\vec{g} = \vec{g}_0 + H(\vec{x} - \vec{x}_0) \quad (75)$$

Per a una geometria optimitzada, el gradient és zero; aleshores, la següent estimació de la geometria òptima es troba resolent la segona equació per a $\vec{g} = 0$, és a dir, aplicant un mètode Newton-Raphson:

$$\vec{x} = \vec{x}_0 - H^{-1}\vec{g}_0 \quad (76)$$

Gairebé tots els algorismes [336,338,339] tenen aquests passos en comú, per tant, tots els mètodes d'optimització necessiten una geometria de partida i una estimació

inicial del Hessià. Una elecció assenyada del sistema de coordenades internes, de la geometria inicial i una bona estimació inicial del hessià ens pot evitar molts problemes a l'optimitzar geometries i fer més ràpid el procés d'optimització.

En general, es poden subdividir els algorismes d'optimització segons la informació que utilitzen per a la minimització de la funció en: a) Mètodes que calculen només el valor de la funció; b) Mètodes que necessiten el valor de la funció i de les primeres derivades; c) Mètodes que computen la funció, els gradients i el hessià.

Els mètodes que calculen només l'energia tenen una convergència massa baixa, mentre que els que calculen energia, gradient i hessià suposen un cost computacional inaccessible per a molècules un xic grans. Per això, els mètodes més emprats habitualment en la minimització de l'energia en els càlculs mecanoquàntics són els que calculen l'energia i els gradients, i d'aquests seran dels que en parlarem més extensament a continuació.

2.2.1.1.1 Algorismes d'optimització que precisen del càlcul de l'energia i gradient

El mètode més senzill inclòs dins aquest grup és el de *màxim pendent* (steepest descent). En aquest cas, el hessià es pren com la matriu unitat al llarg de tot el procés d'optimització. El vector de recerca \vec{p}_k es fa igual a $-\vec{g}_k$ (o si es vol, $H=1$ en (76)), de manera que en cada pas del procés d'optimització, es calcula el següent punt a partir de l'anterior segons:

$$\vec{x}_{k+1} = \vec{x}_k + \alpha_k \vec{p}_k \quad (77)$$

i per tant baixem en la direcció en la que la funció decreix més ràpidament, si bé al final la convergència és molt lenta, degut a les oscil·lacions del mètode. α_k es pot

determinar de manera que el valor de l'energia en el punt $k+1$ sigui el mínim possible. En aquest cas es diu que es fa una recerca lineal (linear search), que també pot ésser quadràtica, cúbica..., segons la funció que ajustem als punts calculats.

A l'altre extrem de l'espectre d'algorismes que usen el gradient exacte, ens trobem amb el *mètode de Newton*. En aquest mètode no només el gradient, sino que també el hessià es calculen exactament a cada pas del procés d'optimització, per seguidament obtenir \bar{x}_{k+1} de l'equació (76). L'haver de calcular les derivades segones a cada pas del procés d'optimització fa que aquest mètode sigui poc recomanable en la major part dels casos, a pesar de la seva elevada velocitat de convergència. Els mètodes més habituals i efectius es troben enmig del mètode de Newton i el de steepest-descent, i s'anomenen *mètodes quasi-newtonians*. En aquests, s'evita el càlcul directe del hessià, començant amb un hessià aproximat i millorant-lo utilitzant la informació que ens dona el càlcul del gradient a cada iteració. S'han proposat diferents mètodes per corregir (el terme anglès és 'to update') el hessià en cada pas d'optimització, que es poden consultar a la bibliografia. [340,341] Aquí només comentarem els més utilitzats en els programes que disposem en el departament per realitzar càlculs teòrics.

El mètode dels gradients conjugats [342] és el més antic d'aquest grup, i és especialment indicat per a sistemes amb moltes variables on el hessià no pot ésser emmagatzemat. En aquest cas, el vector de recerca es troba mitjançant la fórmula:

$$\bar{p}_k = -\bar{g}_k + \bar{p}_{k-1} \frac{\bar{g}_k^T \bar{g}_k}{\bar{g}_{k-1}^T \bar{g}_{k-1}} \quad (78)$$

que obliga a guardar en memòria el gradient de la iteració anterior.

Si el hessià (\mathbf{H}) o la inversa del hessià (\mathbf{B}) de la iteració $k-1$ es pot guardar en memòria, els mètodes quasi-newtonians presenten una millor convergència cap al mínim. Alguns dels mètodes utilitzats per modificar \mathbf{H} o \mathbf{B} a cada iteració a partir del càlcul dels gradients són els següents:

- Algorisme de Davidon-Fletcher-Powell (DFP). [343-345] La inversa del hessià es modifica segons:

$$B_k = B_{k-1} + \frac{\Delta \vec{x}_k \Delta \vec{x}_k^T}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k} - \frac{B_{k-1} \Delta \vec{g}_k \Delta \vec{g}_k^T B_{k-1}}{\Delta \vec{g}_k^T B_{k-1} \Delta \vec{g}_k} \quad (79)$$

$$\Delta \vec{x}_k = \vec{x}_k - \vec{x}_{k-1}$$

- Algorisme de Murtagh-Sargent (MS), [346] on:

$$B_k = B_{k-1} + \frac{[\Delta \vec{x}_k - B_{k-1} \Delta \vec{g}_k][\Delta \vec{x}_k - B_{k-1} \Delta \vec{g}_k]^T}{[\Delta \vec{x}_k - B_{k-1} \Delta \vec{g}_k]^T \Delta \vec{g}_k} \quad (80)$$

- Algorisme de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) [337,347-349] que utilitza l'expressió:

$$B_k = [I - \frac{\Delta \vec{x}_k \Delta \vec{g}_k^T}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k}] B_{k-1} [I - \frac{\Delta \vec{x}_k \Delta \vec{g}_k^T}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k}] + \frac{\Delta \vec{x}_k \Delta \vec{x}_k^T}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k} \quad (81)$$

Aquests tres algorismes pertanyen a la família d'algorismes de Broyden que es caracteritzen per modificar el hessià amb l'expressió:

$$B_k = B_{k-1} + \frac{\Delta \vec{x}_k \Delta \vec{x}_k^T}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k} - \frac{B_{k-1} \Delta \vec{g}_k \Delta \vec{g}_k^T B_{k-1}}{\Delta \vec{g}_k^T B_{k-1} \Delta \vec{g}_k} + \pi_k \Delta \vec{g}_k^T B_{k-1} \Delta \vec{g}_k W_k W_k^T \quad (82)$$

$$W_k = \frac{\Delta \vec{x}_k}{\Delta \vec{x}_k^T \Delta \vec{g}_k} - \frac{B_{k-1} \Delta \vec{g}_k}{\Delta \vec{g}_k^T B_{k-1} \Delta \vec{g}_k}$$

Fer notar que quan $\pi_k = 0$ recuperem la fórmula del mètode DFP i si $\pi_k = 1$ la del BFGS. El mètode òptimament condicionat (OC) elegeix π_k perquè minimitzi la relació entre el valor propi del hessià més gran i el més petit, millorant la convergència. Finalment assenyalem que les mateixes fórmules que serveixen per modificar la matriu B , s'utilitzen per millorar H si interessa, únicament intercanviant Δx per Δg en cadascuna de les fórmules que hi apareixen.

Si bé és difícil determinar quin és el millor mètode dins del grup dels quasi-newtonians, sembla ésser que el BFGS té clars avantatges sobre el DFP [177,350-352]

i per això ha estat el més utilitzat per a les optimitzacions d'estructures d'equilibri en aquesta Tesi.

2.2.1.2 Optimització constrenyida en funcions multivariable. Localització d'estats de transició

Tant mínims com estats de transició es caracteritzen per tractar-se de punts de gradient zero en la superfície de potencial. Ara bé, l'estat de transició ha d'ésser un màxim en una i només una direcció. S'han proposat molts algorismes per localitzar estats de transició, [336,338,339,353-357] els més importants dels quals són el mètode de la coordenada de reacció i els mètodes de localització directe dels quals en parlarem als propers paràgrafs.

El mètode de la coordenada de reacció prové del mètode de relaxació proposat per Empedocles [358] i consisteix en agafar una o dues coordenades com a variables independents de l'energia potencial, de manera que per a cada conjunt de valors d'aquestes variables independents es minimitza l'energia respecte a la resta dels graus de llibertat del sistema.

El camí de reacció de mínima energia (MEP) [359] està considerat com la trajectòria ortogonal que connecta dos mínims d'energia passant per un punt cadira comú. Aquest camí reflecteix la forma de la superfície de potencial, la qual depèn molt de les coordenades utilitzades per descriure el sistema, essent diferent per a cada conjunt de coordenades. Una elecció inadequada pot portar-nos a camins de reacció sense significat físic. En general, es trien com a variables independents aquelles que són funcions monòtones del grau d'avançament de la reacció i presenten un interval

de variació gran en passar de reactius a productes. Cal dir també que les estructures moleculars que corresponen a punts crítics en la superfície són independents de l'elecció de coordenades, fins i tot si el camí de reacció és alterat de forma radical.

El problema més important que presenta aquest mètode és el de la histèresi química [360] que pot conduir-nos a camins de reacció diferents per a la reacció directa i per a la inversa, quan les variables escollides no representen bé la veritable coordenada de reacció.

Aquest mètode dona una orientació sobre la geometria de l'estat de transició, però no el permet localitzar exactament. Per això s'utilitza per fer una exploració prèvia de la superfície abans de determinar exactament l'estructura de l'estat de transició amb els mètodes de localització directa.

Precisament, aquests mètodes de localització directa es divideixen en tres grans grups: els que només requereixen el càlcul de l'energia, els que precisen també del càlcul del gradient, i els que necessiten a més el hessià a cada iteració. Els mètodes emprats en aquest treball pertanyen al segon grup.

En aquest cas es parteix de la base que en tot punt estacionari la norma del gradient ha d'ésser nul·la. Donat que la norma és sempre més gran o igual a zero, el que es fa és minimitzar la norma del gradient, la qual cosa, però, no garanteix arribar a un punt estacionari. L'estimació de la matriu de derivades segones que ha de presentar un únic valor propi negatiu, és ara molt més complicada, [361] i per això es recomana fer un càlcul previ del hessià inicial, que pot ésser analític, o bé numèric i només referit a les variables que creiem que tindran més pes en el vector de transició.

En l'algorisme de Schlegel [338] a cada iteració s'exigeix que la matriu de derivades segones tingui un únic valor propi negatiu. Cal que el punt de partida sigui pròxim

a l'estat de transició que es vol localitzar. Aquest mètode aprofita tota la informació que es va acumulant al llarg del procés d'optimització a l'anar cercant l'estat de transició, i ha estat el mètode més utilitzat en la recerca d'estats de transició en aquesta Tesi. També s'ha fet servir en alguns casos la subrutina VA05 de Powell implementada en el programa MONSTERGAUSS, i que el que fa és minimitzar la norma del gradient, utilitzant una combinació del mètode de Newton-Raphson, steepest descent i algorisme de Marquardt.

2.3 PROGRAMES

En aquest apartat es descriuran breument les característiques principals dels programes utilitzats en aquest treball. Els calculs *ab initio* s'han realitzat amb el sistema de programes GAUSSIAN-86, [362] i MONSTERGAUSS. [363]

El programa GAUSSIAN-86 dissenyat per Pople i col.laboradors presenta importants millores respecte a les anteriors versions GAUSSIAN 70, 76, 80 i 82. Consisteix en un conjunt de programes connectats que permeten la determinació de l'energia i de la funció d'ona amb mètodes *ab initio* tant a nivell RHF com UHF. També permet introduir energia de correlació amb la teoria pertorbacional de Møller-Plesset fins a diferents ordres o amb interacció de configuracions. L'optimització de geometries moleculars i localització de mínims pot fer-se amb diferents algorismes, dels quals el mètode de Schlegel, com s'ha esmentat anteriorment, és el que ha estat utilitzat en el present treball. És interessant assenyalar que permet treballar amb pseudopotencials, a diferència del programa MONSTERGAUSS. Aquest darrer és una versió millorada per Peterson i col.laboradors del GAUSSIAN 70 i lògicament té característiques molt similars a l'anterior. El càlcul de les derivades primeres de l'energia, però, és menys

eficient i les derivades segones només poden calcular-se numèricament, de manera que els càlculs d'optimització i de freqüències són més lents. Cal assenyalar que aquest programa va estar considerablement millorat pel que fa a la convergència SCF quan vàrem programar i implementar en el transcurs d'aquesta Tesi el ja comentat mètode DIIS de Pulay.

Els càlculs semiempírics s'han portat a terme amb el programa AMPAC [364] del grup de Dewar i col.laboradors. En aquest programa estan introduïts els hamiltonians semiempírics MNDO, MINDO/3 i AM1. Permet calcular propietats termodinàmiques, efectes de substitució isotòpica, espectres de vibració, localitzar orbitals i un llarg *etcétera*. La localització d'estats de transició es fa utilitzant de forma conjunta les subrutines NLLSQ i SIGMA que té incorporades el programa. En el transcurs de la Tesi s'han introduït en aquest programa els paràmetres del zinc per als mètodes MNDO i AM1.

