



DEPARTAMENT DE CIENCIES EXPERIMENTALS
AREA DE QUIMICA FISICA

ESTUDIO TEORICO DE LOS
MECANISMOS MOLECULARES DE LAS
REACCIONES QUIMICAS CATALIZADAS
POR LA ENZIMA RUBISCO.

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
VICENT SIXTE SAFONT VILLARREAL

JUNIO 1994



UNIVERSITAT
JAUME I

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS

ÀREA DE QUÍMICA FÍSICA

ESTUDIO TEÓRICO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES DE LAS REACCIONES QUÍMICAS
CATALIZADAS POR LA ENZIMA RUBISCO.

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:
Vicent Sixte Safont Villarreal
Junio 1994

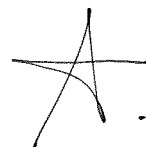
JUAN M. ANDRÉS BORT, Profesor Titular de Química Física del
Departament de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I de Castelló

CERTIFICA:

Que D. Vicent Sixte Safont Villarreal, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo mi dirección, desde Junio de 1991 hasta la actualidad, el trabajo que se recoge en esta Memoria para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Así mismo, autorizo la presentación del trabajo ante la Universitat Jaume I de Castelló para que cumpla los trámites correspondientes.

Y para que así conste a los efectos legales, presentamos dicha Tesis, firmado este Certificado en Castellón, a cinco de Abril de mil novecientos noventa y cuatro



J. M. Andrés Bort

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Departament de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I de Castelló bajo la dirección del Dr. Juan M. Andrés Bort, amigo mío, a quien quiero expresar mi más sincero agradecimiento por la ayuda y confianza que en todo momento he recibido de él.

También quiero hacer constar mi agradecimiento:

Al Prof. Orlando Tapia, cuyos inestimables consejos y orientaciones han sido fundamentales en la elaboración del trabajo que aquí se presenta.

Al Departament de Ciències Experimentals, por todos los medios puestos a mi alcance y por haber aceptado la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Convenio Fundació Bancaixa-Universitat Jaume I, por los fondos puestos a nuestra disposición que han hecho posible este trabajo.

Al equipo del Centre de Processament de Dades de la Universitat Jaume I, por su profesionalidad y constante cooperación y, especialmente, a Francesc Alted.

Por último deseo agradecer de forma muy especial a mis compañeros del Àrea de Química Física: Juan Andrés, Vicent Moliner, Rosa Llusar, Armando Beltrán, Juan Antonio Igualada, Joao B. Lopes y Ximo Queralt, por el constante apoyo y la incondicional ayuda que he recibido de ellos.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
<i>Referencias</i>	9
II RUBISCO	11
II.1 Estructura	13
II.1.1 Estructura primaria.....	13
II.1.2 Estructura secundaria.....	16
II.1.3 Estructura terciaria.....	23
II.1.4 Estructura cuaternaria.....	25
II.1.5 Estructura del centro activo.....	29
II.2 Reacciones químicas catalizadas por la enzima Rubisco	34
II.2.1 Activación.....	34
II.2.2 Enolización.....	36
II.2.3 Carboxilación.....	40
II.2.4 Oxigenación.....	47
<i>Referencias</i>	52
III SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL Y ESTRUCTURAS DE TRANSICIÓN	61
III.1 El concepto de superficie de energía potencial	61
III.2 Puntos críticos y caminos de reacción	67
III.3 Estructura de transición	76
III.3.1 Propiedades de la estructura de transición.....	76
III.3.2 Localización de la estructura de transición.....	82
<i>Referencias</i>	90
IV TEORÍA DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA	97
IV.1 Teoría del estado de transición	101
IV.2 Postulado de Pauling	105
IV.3 Catálisis enzimática y estructuras de transición <i>in vacuo</i>	109
IV.3.1 Coordinada de interconversión química.....	113
IV.3.2 Complejos precursor y sucesor.....	115
IV.3.3 Espacio activo y caracterización del estado de transición.....	119
<i>Referencias</i>	122

V MÉTODOS TEÓRICOS	127
V.1 Métodos <i>ab initio</i>	130
V.1.1 Funciones de onda SCF.....	134
V.1.2 Conjuntos de funciones de base.....	138
V.1.3 Correlación electrónica.....	141
V.1.4 Método multiconfiguracional.....	146
V.2 Métodos semiempíricos	148
V.3 Efecto del medio	154
V.4 Programas y ordenadores	157
<i>Referencias</i>	159
VI OBJETIVOS	167
VII RESULTADOS	171
VII.1 Bifuncionalidad de la enzima	171
VII.1.1 Introducción.....	171
VII.1.2 Modelo 1,2-dihidroxietileno.....	173
VII.1.2.1 Energías.....	176
VII.1.2.2 Comparación con el etileno.....	184
VII.1.2.3 Estructuras y cargas.....	187
VII.1.2.4 HOMOs y LUMOs.....	192
VII.1.3 Modelo 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato.	194
VII.1.3.1 Energías.....	195
VII.1.3.2 Estructuras y cargas.....	198
VII.1.4 Modelo 1,2-dihidroxietileno con inclusión del catión magnesio.....	202
VII.1.4.1 Energías.....	203
VII.1.4.2 Estructuras y cargas.....	208
VII.1.4.3 HOMOs y LUMOs.....	213
VII.1.5 Conclusiones.....	214
VII.1.6 Apéndice.....	217
VII.2 Mecanismo molecular de la enolización	234
VII.2.1 Introducción.....	234
VII.2.2 Modelo de tres carbonos.....	237
VII.2.2.1 Estructuras de transición.....	238
VII.2.2.2 SEP.....	242
VII.2.2.3 Inhibición.....	253
VII.2.3 Modelo de cinco carbonos.....	261
VII.2.4 Modelo de dos carbonos.....	264
VII.2.5 Modelo con inclusión de grupos fosfato.....	266
VII.2.6 Conclusiones.....	269



UNIVERSITAT
JAUME I

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS

ÀREA DE QUÍMICA FÍSICA

ESTUDIO TEÓRICO DE LOS MECANISMOS
MOLECULARES DE LAS REACCIONES QUÍMICAS
CATALIZADAS POR LA ENZIMA RUBISCO.

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Vicent Sixte Safont Villarreal

Junio 1994

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN	1
<i>Referencias</i>	9
II RUBISCO	11
II.1 Estructura	13
II.1.1 Estructura primaria.....	13
II.1.2 Estructura secundaria.....	16
II.1.3 Estructura terciaria.....	23
II.1.4 Estructura cuaternaria.....	25
II.1.5 Estructura del centro activo.....	29
II.2 Reacciones químicas catalizadas por la enzima Rubisco	34
II.2.1 Activación.....	34
II.2.2 Enolización.....	36
II.2.3 Carboxilación.....	40
II.2.4 Oxigenación.....	47
<i>Referencias</i>	52
III SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL Y ESTRUCTURAS DE TRANSICIÓN	61
III.1 El concepto de superficie de energía potencial	61
III.2 Puntos críticos y caminos de reacción	67
III.3 Estructura de transición	76
III.3.1 Propiedades de la estructura de transición.....	76
III.3.2 Localización de la estructura de transición.....	82
<i>Referencias</i>	90
IV TEORÍA DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA	97
IV.1 Teoría del estado de transición	101
IV.2 Postulado de Pauling	105
IV.3 Catálisis enzimática y estructuras de transición <i>in vacuo</i>	109
IV.3.1 Coordinada de interconversión química.....	113
IV.3.2 Complejos precursor y sucesor.....	115
IV.3.3 Espacio activo y caracterización del estado de transición.....	119
<i>Referencias</i>	122

VII.3 Mecanismo molecular de la carboxilación	271
VII.3.1 Introducción.....	271
VII.3.2 Modelo de tres carbonos.....	272
VII.3.3 Modelo de cinco carbonos.....	275
VII.3.4 Modelo con inclusión de grupos fosfato.....	282
VII.4 Mecanismo molecular de la oxigenación	285
VII.4.1 Introducción.....	285
VII.4.2 Modelo de tres carbonos.....	286
VII.4.3 Modelo de cinco carbonos.....	291
VII.4.4 Modelo con inclusión de grupos fosfato.....	296
VII.4.5 Conclusiones.....	299
<i>Referencias</i>	302
VIII CONCLUSIONES	307

VII.3 Mecanismo molecular de la carboxilación	271
VII.3.1 Introducción.....	271
VII.3.2 Modelo de tres carbonos.....	272
VII.3.3 Modelo de cinco carbonos.....	275
VII.3.4 Modelo con inclusión de grupos fosfato.....	282
VII.4 Mecanismo molecular de la oxigenación	285
VII.4.1 Introducción.....	285
VII.4.2 Modelo de tres carbonos.....	286
VII.4.3 Modelo de cinco carbonos.....	291
VII.4.4 Modelo con inclusión de grupos fosfato.....	296
VII.4.5 Conclusiones.....	299
<i>Referencias</i>	302
VIII CONCLUSIONES	307

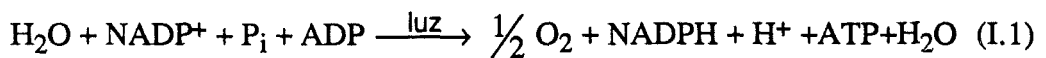
I. INTRODUCCIÓN

Uno de los procesos fundamentales en los que se basa la vida en nuestro planeta es la fotosíntesis. Ésta consiste en una serie de reacciones químicas y procesos físicos mediante los cuales las plantas verdes y algunos organismos sintetizan, a partir del dióxido de carbono atmosférico y agua, moléculas orgánicas que entran en su ciclo vital y, por extensión, en el ciclo vital de todos los seres vivos de La Tierra^{1,2}.

En las plantas verdes se realiza en los cloroplastos; en las membranas tilacoides de dichos orgánulos tiene lugar la transformación de la energía solar en energía química. La primera etapa de la fotosíntesis consiste en la absorción de la luz por unos pigmentos fotosintéticos, de los que los más conocidos son las clorofilas³. Posteriormente tiene lugar la conversión de la energía luminosa en energía química, para lo cual se requiere la cooperación de dos centros de reacción⁴⁻⁶: el fotosistema I y el fotosistema II. En el fotosistema I se produce la reducción del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADP⁺) hasta

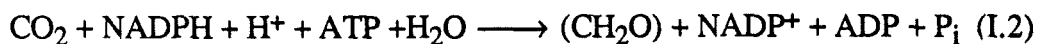
NADPH y en el fotosistema II tiene lugar la ruptura de una molécula de agua y se forma oxígeno molecular. Ambos procesos requieren la captación de fotones y es por ello que esta fase de la fotosíntesis suele denominarse fase luminosa. Como consecuencia de las reacciones producidas en ambos fotosistemas hay un exceso de protones en el interior del tilacoide y fuera, en el estroma, un defecto, de modo que se produce una salida de protones a través de la membrana, por medio de diversos sistemas enzimáticos. La energía perdida cuando la acidez se equilibra se utiliza para formar trifosfato de adenosina (ATP) a partir del difosfato (ADP) y un grupo fosfato, en una reacción que produce también agua.

La ecuación general de esta primera fase puede escribirse como:



donde la molécula de agua de los productos surge de la reacción entre el ADP y el fosfato, mientras que la de los reactivos es la que actúa como reductora, cediendo los electrones necesarios para reducir al NADP^+ y oxidándose hasta $\frac{1}{2} \text{O}_2$. P_i es un grupo fosfato.

En la segunda fase de la fotosíntesis los productos con exceso de energía de la primera, el ATP y el NADPH, se utilizan para reducir el dióxido de carbono hasta hidrato de carbono, mediante una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas. Estos procesos se denominan reacciones oscuras porque pueden transcurrir en la oscuridad, aunque generalmente se producen en el intervalo diurno, al mismo tiempo que las reacciones que requieren la participación directa de la luz. Las reacciones oscuras pueden representarse, en términos generales, por:



donde (CH_2O) representa un hidrato de carbono.

Las reacciones oscuras constituyen el conocido ciclo de Calvin⁷ y tienen lugar en el componente soluble de los cloroplastos (el estroma). Se inician con la reacción del CO_2 con la D-Ribulosa-1,5-bifosfato para formar dos moléculas de 3-D-fosfoglicerato. Esta reacción está catalizada por la enzima D-Ribulosa-1,5-

bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa (EC 4.1.1.39), usualmente conocida como Rubisco. Posteriormente, el 3-D-fosfoglicerato formado se utiliza en la vía gluconeogénica para formar una hexosa y, mediante la acción de otras enzimas, regenerar la D-Ribulosa-1,5-bifosfato. En una vuelta del ciclo de Calvin, se consumen tres moléculas de ATP y dos de NADPH y se conduce al CO₂ hasta el nivel de hexosa fosfato (Figura I.1).

De este modo, un amplio espectro de organismos consigue incorporar a la biomasa el carbono contenido en la atmósfera. En realidad, pese a la concepción errónea de que las plantas verdes son las máximas responsables del proceso fotosintético, más de la mitad de toda la fotosíntesis que se produce sobre la superficie de La Tierra la realizan las algas microscópicas de los océanos, las diatomeas y los dinoflagelados, que en conjunto constituyen el fitoplancton.

Hemos visto que la fotosíntesis tiene dos fases: las reacciones luminosas y las reacciones oscuras. Experimentalmente se ha determinado que la etapa limitante de la velocidad de la fotosíntesis en las plantas es precisamente la carboxilación de la D-Ribulosa-1,5-bifosfato, esto es, el proceso inicial del ciclo de Calvin, o fase oscura de la fotosíntesis⁸.

La eficacia teórica de la fotosíntesis ha constituido un problema fundamental y ampliamente debatido. En condiciones óptimas, utilizando luz roja, los organismos fotosintéticos podrían convertir alrededor del 30% de la energía absorbida en energía química⁹. Usando luz blanca, la eficacia descendería al 20% y, puesto que los pigmentos de las plantas verdes absorben las longitudes de onda inferiores a 700 nm, es decir, alrededor de la mitad del espectro solar, los organismos fotosintéticos sólo pueden convertir un 10% de la radiación solar incidente. Sin embargo, en la naturaleza no se encuentran rendimientos tan altos: la caña de azúcar rinde un 8%, el maíz cultivado sólo aprovecha entre el 1 y el 2% de la energía solar para formar productos fotosintéticos y las plantas no cultivadas ofrecen rendimientos mucho menores, de alrededor del 0.2%⁹. Estos bajos rendimientos fotosintéticos son consecuencia, entre otros factores, del proceso de la fotorrespiración, que compite directamente con la fotosíntesis y tiende a disminuir el rendimiento de ésta.

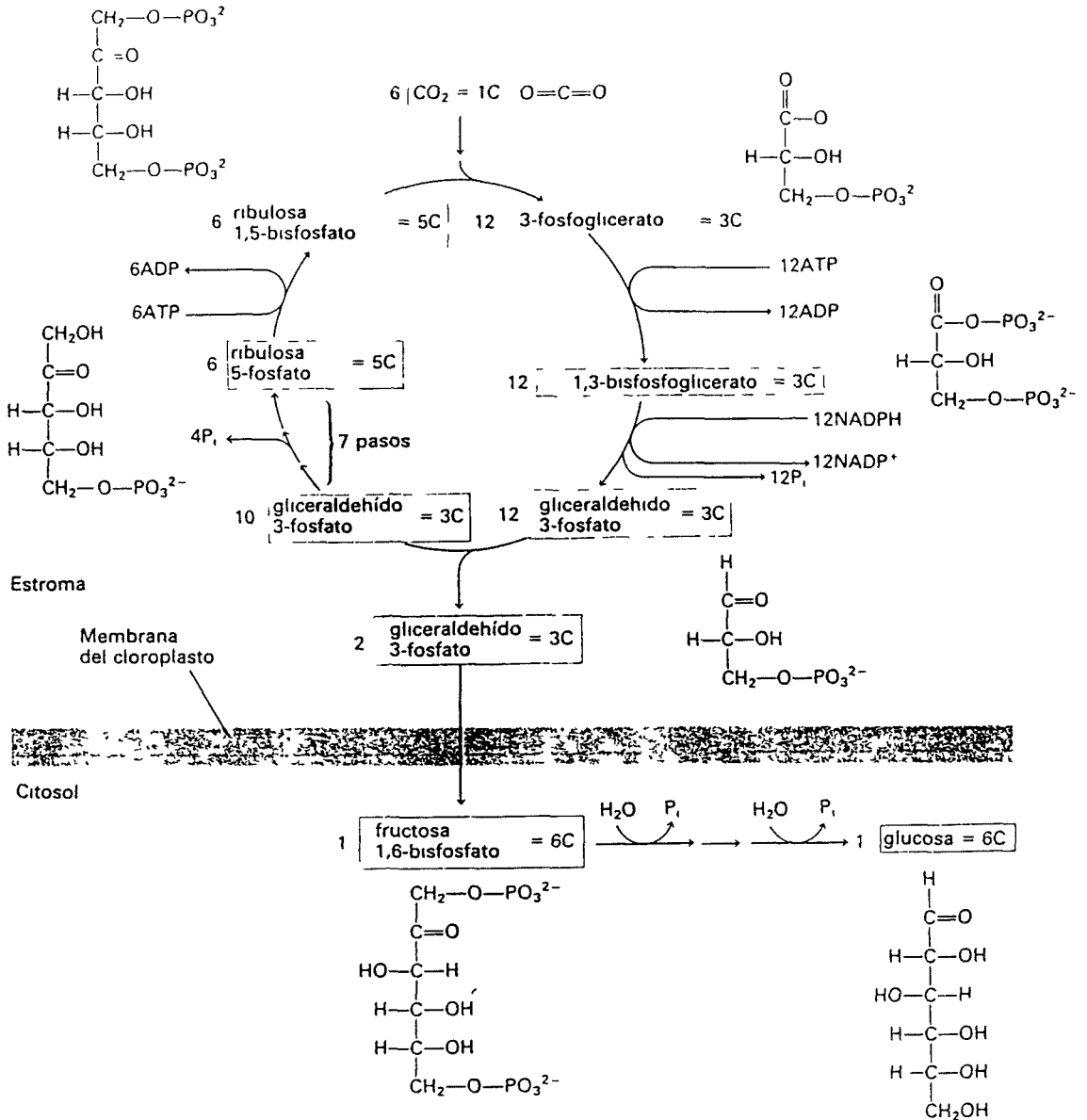


Figura I.1. Esquema del ciclo de Calvin. En cada vuelta del ciclo, conducido por las moléculas de ATP y NADPH producidas por la acción de la luz, una molécula de CO_2 es incorporada. En la figura se muestra el resultado de seis vueltas del ciclo. Fuente: Darnell et al¹⁰.

No debe confundirse la fotorrespiración con la respiración mitocondrial que exhiben las plantas en la oscuridad: ésta es la responsable del consumo de oxígeno molecular por parte de las plantas en períodos nocturnos o en ausencia de luz, con liberación de dióxido de carbono a la atmósfera y consumo de glucosa y otros combustibles orgánicos. La fotorrespiración se produce, en cambio, cuando las plantas están iluminadas y no es mitocondrial, sino que se realiza en los cloroplastos, constituyendo un cortocircuito de la fotosíntesis.

En la fotorrespiración tiene lugar la reducción del oxígeno; se inicia con la reacción de O_2 con D-Ribulosa-1,5-bifosfato, obteniéndose 3-D-fosfoglicerato y fosfoglicolato¹¹. El primero puede metabolizarse luego en el ciclo de Calvin, pero el segundo experimenta hidrólisis enzimática, produciéndose glicolato libre. Para recuperar algo del carbono perdido, las plantas C-3 han desarrollado la vía metabólica del glicolato, en la cual parte del fosfoglicolato es convertido en fosfoglicerato. Esta vía, sin embargo, consume gran cantidad de energía y el 50% del carbono todavía se pierde como CO_2 ¹².

La fotorrespiración está catalizada por la misma enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de la fotosíntesis, esto es, por la Rubisco, y ambos gases (O_2 y CO_2) compiten por el mismo sustrato, la D-Ribulosa-1,5-bifosfato. En condiciones naturales (a $25^\circ C$ y 1 atm de presión y bajo una fase gaseosa que contiene 0.033% de CO_2 y 21% de O_2) la relación entre carboxilación y oxigenación varía entre 3:1 y 4:1¹³. Consecuentemente, la oxigenación de la D-Ribulosa-1,5-bifosfato reduce sustancialmente la velocidad global de la fotosíntesis y, por tanto, la productividad de las plantas. El que una misma enzima catalice los pasos iniciales de dos procesos metabólicos primarios, pero diametralmente opuestos, resulta altamente inusual: de hecho, no se conoce otro caso similar en la naturaleza.

La actividad enzimática de la Rubisco es responsable de la fijación anual de 10^{11} toneladas de CO_2 a la biosfera. Es claramente la enzima más abundante de la Tierra: se necesitan unos 40 millones de toneladas para llevar a cabo dicha tarea^{11,12,14}. Sin embargo, como hemos visto, esta gran cantidad de enzima refleja más bien su alta ineficacia como catalizador: tarda 3 segundos en catalizar una reacción de carboxilación además de catalizar el proceso de la fotorrespiración. Dado que la Rubisco presenta siempre actividad como

oxigenasa, independientemente de su origen taxonómico, se ha sugerido¹⁵ que la oxigenación ocurre debido a que un intermedio de la reacción de carboxilación es autooxidable. Esta hipótesis, aun siendo plausible, no puede contemplarse como verdadera mientras los detalles de ambas reacciones permanezcan inciertos.

Se ha estudiado extensamente la posibilidad de modificar la enzima mediante técnicas de ingeniería genética con el objetivo de conseguir aumentar la relación entre carboxilación y oxigenación. Desgraciadamente, todos los esfuerzos que hasta la fecha se han realizado han sido inútiles: las enzimas mutantes no catalizaban en absoluto ninguna adición de especies gaseosas al sustrato¹⁶, o bien el proceso de oxigenación resultaba incluso más favorecido que en la Rubisco natural¹⁷⁻²¹. Sólo recientemente se ha diseñado una proteína mutante (S368A) en la que la especificidad CO_2/O_2 se ve incrementada 1.6 veces. Sin embargo, la velocidad de carboxilación de esta mutante es 50 veces menor que la velocidad de carboxilación de la enzima natural²². La producción de una carboxilasa más eficiente todavía no se ha logrado.

Para conseguir una Rubisco mejorada, es necesario conocer con detalle tanto la estructura de la proteína, especialmente la estructura del centro activo, como el mecanismo de las reacciones que en él tienen lugar. Como veremos en el capítulo II de esta memoria, la estructura de la Rubisco, incluyendo la de su centro activo, está bien caracterizada. Así mismo, las reacciones químicas que cataliza están bien establecidas. Sin embargo, no se conocen con detalle los mecanismos moleculares de los procesos químicos que tienen lugar en el centro activo.

En esta memoria presentamos un estudio teórico de los mecanismos moleculares de las reacciones catalizadas en el centro activo. En primer lugar analizamos la bifuncionalidad de la Rubisco. A continuación, utilizando los conceptos de estructuras o estados de transición (ET) y de vectores de transición (VT) asociados a dichas estructuras, que controlan la transformación química, estudiamos los procesos de carboxilación y oxigenación.

Las estructuras de transición se encuentran lejos de las posiciones de equilibrio y tienen tiempos de vida extraordinariamente cortos, por lo cual resulta difícil caracterizarlas de forma experimental²³. La principal fuente de información acerca de los estados de transición son los métodos teóricos.

Toda la información estructural y dinámica concerniente al mecanismo de una reacción enzimática se encuentra en la geometría del ET y en el vector asociado a dicho ET, así como en la topología de la zona de la superficie de energía (llamada zona cuadrática) en que se halla. De ese modo, tal como explicaremos detalladamente en el capítulo III de la presente memoria, obteniendo la superficie de energía para un proceso enzimático, se localiza la estructura de transición como aquella correspondiente a un punto de silla de índice uno, siempre que el vector asociado describa correctamente el cambio químico que se estudia. Una vez localizado el ET pueden derivarse de él las estructuras de los complejos precursor y sucesor (que corresponderían a los reactivos y productos, deformados en una estructura cercana a la del ET según el postulado de Pauling²⁴⁻²⁶) y se obtiene un cuadro completo del proceso químico estudiado.

Centraremos por tanto nuestros esfuerzos en la obtención y la completa caracterización de los ET para cada uno de los procesos químicos que cataliza la enzima Rubisco. Con ello obtendremos una descripción de cómo las dos vías metabólicas se inician mediante la acción de la Rubisco.

El presente trabajo se encuentra así mismo basado en una hipótesis fundamental, que utilizaremos y comprobaremos en nuestro caso: la estructura del ET y las fluctuaciones descritas por el VT son invariantes respecto a la acción de solventes pasivos o interacciones con los restos contenidos en el centro activo de la enzima. Esta hipótesis surge de la propia naturaleza del ET: dado que en él radica toda la información química relevante del sistema, los alrededores no pueden modificarlo si el proceso químico que se estudia es el mismo. En el caso de que el medio modificara la geometría del ET o las fluctuaciones descritas por el VT, entonces estaríamos ante un proceso diferente, ya que el ET contendría una información química diferente.

En el capítulo II de la presente memoria se describe con detalle la estructura de la Rubisco y las reacciones químicas que cataliza. En el capítulo III se presenta el concepto de superficies de energía potencial y su utilidad para determinar mecanismos de reacción, con especial énfasis en la caracterización de los ET. En el capítulo IV se describe la teoría del estado de transición y su aplicación a los procesos catalizados por enzimas. En el capítulo V se describen los métodos teóricos utilizados en nuestro trabajo. En el capítulo VI indicamos los objetivos y

en el capítulo VII presentamos, analizamos y discutimos los resultados obtenidos. Las referencias bibliográficas utilizadas se enumeran al final de cada capítulo, utilizando las normas de publicación del Journal of American Chemical Society. Finalmente, en el capítulo VIII detallamos las conclusiones de la presente Tesis Doctoral.

Referencias

- (1) Lehninger, A. L. *Bioquímica*; Segunda ed.; Ediciones Omega: Barcelona, 1983.
- (2) Stryer, L. *Bioquímica*; Segunda ed.; Editorial Reverté: Barcelona, 1981.
- (3) Atkins, P. W. In *Atoms, Electrons and Change* Scientific American Library: New York, 1991; pp 203-226.
- (4) Hill, R.; Bendall, F. *Nature* **1960**, *186*, 136.
- (5) Duysens, L. N. M.; Ames, J.; Kamp, B. M. *Nature* **1961**, *190*, 510.
- (6) Kok, B.; Hoch, G. *Light and Life*; Johns Hopkins Press: Baltimore, 1961.
- (7) Bassham, J. A.; Calvin, M. *The Path of Carbon in Photosynthesis*; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, 1957.
- (8) Zelitch, I. *Photosynthesis, Photorespiration, and Plant Productivity*; Academic Press: New York, 1971.
- (9) Kok, B.; Radmer, R. In *Chemical Mechanisms in Bioenergetics*; D. Rao Sanadi, Ed.; American Chemical Society: Washington D. C., 1976; pp 172-220.
- (10) Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. *Biología celular y molecular*; Editorial Labor S. A.: Barcelona, 1988.
- (11) Mizioroko, H. M.; Lorimer, G. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 507.
- (12) Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Brändén, C.-I. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 119.
- (13) Farquhar, G. D.; von Caemmerer, S.; Berry, J. A. *Planta* **1980**, *149*, 78.
- (14) Ellis, R. J. *Trends. Biochem. Sci.* **1979**, *4*, 241.
- (15) Andrews, T. J.; Lorimer, G. H. *FEBS Letters* **1978**, *90*, 1.
- (16) Hartman, F. C.; Lee, E. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *246*, 11784.
- (17) Chen, Z.; Yu, W.; Lee, J.-H.; Diao, R.; Spreitzer, R. J. *Biochemistry* **1991**, *30*, 8846.
- (18) Christeller, J. T.; Laing, W. A. *Biochem. J.* **1979**, *183*, 747.
- (19) Jordan, D. B.; Ogren, W. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *227*, 425.

- (20) Robinson, P. D.; Martin, M. N.; Tabita, R. F. *Biochemistry* **1979**, *18*, 4453.
- (21) Smith, H. B.; Larimer, F. W.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1243.
- (22) Harpel, M. R.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 6475.
- (23) Cárdenas Marín, R. Tesis Doctoral, Sveriges Lantbruksuniversitet, 1992.
- (24) Pauling, L. *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
- (25) Pauling, L. *Nature* **1948**, *161*, 707.
- (26) Pauling, L. *Am. Sci.* **1948**, *36*, 51.

II. RUBISCO

Como hemos señalado en la Introducción, la comprensión completa de la acción catalítica de la Rubisco requiere conocer la estructura de la enzima así como las reacciones químicas que cataliza. Por tanto, vamos a dividir el presente capítulo en dos apartados: en el primero describiremos la estructura de la Rubisco, partiendo de la estructura primaria o secuencia aminoácida que forma la proteína, hasta llegar a la estructura cuaternaria y la descripción de su centro activo. En el segundo detallaremos las etapas de transformación química que tienen lugar en dicho centro activo.

Nuestro interés por la Rubisco nace de la colaboración con el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Uppsala (Suecia), donde se había caracterizado experimentalmente la estructura de la enzima mediante técnicas de cristalografía de Rayos X. En dicho Departamento había un gran interés en conseguir cambiar la relación entre carboxilación y oxigenación, incrementando aquélla en detrimento de ésta. Para ello necesitaban conocer con la

mayor exactitud posible los mecanismos moleculares de las diferentes reacciones químicas que cataliza la Rubisco, por lo que nos pidieron que realizáramos un estudio teórico de dichos mecanismos y que tratáramos de dar una explicación a la bifuncionalidad de la enzima.

El estudio teórico de los procesos enzimáticos se ha desarrollado notablemente en los últimos años. Este progreso en el dominio teórico tiene sus causas directas tanto en el desarrollo vertiginoso que se observa en Biología Molecular como en la concepción de nuevos y más poderosos ordenadores. Así, la cristalización y posterior determinación de la estructura tridimensional de las enzimas mediante métodos de difracción de Rayos X y/o neutrones es el primer paso que permite focalizar al nivel atómico y molecular el estudio de las relaciones entre estructura y actividad de las biomoléculas¹. Por esta razón, hemos dedicado un apartado al análisis detallado de la estructura de la Rubisco obtenida en el laboratorio de Uppsala, entre otros. Como veremos posteriormente, el conocimiento de esta estructura nos permitirá comprender mejor los procesos catalíticos que tienen lugar en el centro activo.

II.1 ESTRUCTURA

La forma más común de la Rubisco está formada por ocho subunidades largas (L, catalíticamente activas, con una masa de 56000 daltons) y ocho pequeñas (S, con una masa de 14000 daltons). Esta estructura L₈S₈ es la que presentan las Rubiscos de todas las plantas y algas^{2,3}. La Rubisco de bacterias fotosintéticas contrasta con la enzima de las plantas en masa y composición. La Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum* es un dímero L₂^{4,5}, mientras que enzimas de otras bacterias tienen estructuras L₄, L₆, L₆S₆ y L₈². Incluso en el caso de la bacteria *Rhodopseudomonas sphaeroides* se han encontrado dos formas distintas de la enzima: L₈S₈ y L₆⁶.

Sin embargo, deben tomarse con cuidado los resultados en los que no se obtiene evidencia de la presencia de la subunidad S, dado que puede perderse artificialmente en el proceso de purificación de la enzima, como se ha demostrado en algunos casos⁷. Con excepción de la estructura dimérica bien documentada en *Rhodospirillum Rubrum*, sólo las estructuras L₈S₈ han sido bien caracterizadas.

II.1.1 ESTRUCTURA PRIMARIA

La estructura primaria de la Rubisco, es decir, la secuencia aminoácida, ha sido determinada en diversas especies. Se ha comprobado así que las subunidades L tienen composición aminoácida similar⁸. En la Tabla II.1 se presentan algunas especies en las que ha sido obtenida la estructura primaria de las subunidades L.

Tabla II.1 Algunas especies en las que la secuencia aminoácida de la subunidad L ha sido determinada. De la misma forma se conoce la estructura primaria de 30 subunidades S de diferentes especies.

Especie	Autores	Año
Maíz	McIntosh <i>et al</i> ⁹	1980
Espinaca	Zurawski <i>et al</i> ¹⁰	1981
Tabaco	Shinozaki <i>et al</i> ¹¹	1982
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Dron <i>et al</i> ¹²	1982
<i>Rhodospirillum Rubrum</i>	Nargang <i>et al</i> ¹³	1984
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	Yang <i>et al</i> ¹⁴	1986
Guisante	Zurawski <i>et al</i> ¹⁵	1986
Petunia	Aldrich <i>et al</i> ¹⁶	1986
Alfalfa	Aldrich <i>et al</i> ¹⁷	1986
<i>Rhodobacter sphaeroides form II</i>	Wagner <i>et al</i> ¹⁸	1988

Comparando las secuencias aminoácidas de las subunidades L de los polipéptidos eucarióticos más distantes desde el punto de vista evolutivo (*Chlamydomonas* frente a maíz) se observa más de un 85% de homogeneidad en un total de 475 residuos aminoácidos. Especialmente interesante es la completa conservación de la secuencia entre los residuos 169 y 220 y los residuos 321 y 340. Estas regiones contienen los restos K175 y K335 (utilizaremos como norma general a lo largo de la presente memoria la notación abreviada¹⁹ de los nombres de los aminoácidos, detallada en la Tabla II.2), que están implicados en el proceso catalítico según se ha determinado experimentalmente²⁰, así como la K201, implicada en el proceso de activación^{21,22} que detallaremos en el apartado II.2 de la presente memoria. Así mismo es interesante que la región 161-192 contiene únicamente aminoácidos neutros o básicos, y que un intento de cambiar la G171 por Ácido Aspártico (D) dio lugar a una proteína catalíticamente inactiva⁷.

Tabla II.2 Abreviaturas utilizadas en la presente memoria para nombrar los aminoácidos, según las normas de uso común en Bioquímica¹⁹.

Aminoácido	Abreviaturas	Aminoácido	Abreviaturas
Ácido Aspártico	Asp	Ácido Glutámico	Glu
Alanina	Ala	Arginina	Arg
Asparagina	Asn	Cisteína	Cys
Fenilalanina	Phe	Glicina	Gly
Glutamina	Gln	Histidina	His
Isoleucina	Ileu	Leucina	Leu
Lisina	Lys	Metionina	Met
Prolina	Pro	Serina	Ser
Tirosina	Tyr	Treonina	Thr
Triptófano	Trp	Valina	Val

En contraste con la gran homogeneidad entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades L de la Rubisco de plantas, se observa que la secuencia aminoácida de las subunidades L de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum* es muy diferente: sólo un 28% de los residuos se mantienen entre unas y otras²³. Pese a ello, la mayor parte de los aminoácidos que forman el centro activo se conservan.

La subunidad S está formada por 123 aminoácidos e igualmente se ha comprobado una gran homogeneidad (un 70%) entre la secuencia de la subunidad S en unas especies y en otras. En la Tabla II.3 se presentan algunas especies en las que ha sido obtenida la estructura primaria de las subunidades S.

Tabla II.3 Algunas especies en las que ha sido determinada la secuencia aminoácida de la subunidad S.

Especie	Autores	Año
Espinaca	Martin ²⁴	1979
Maíz	Matsuoka <i>et al</i> ²⁵	1987
Tabaco	Mazur <i>et al</i> ²⁶	1985
Guisante	Fluhr <i>et al</i> ²⁷	1986
Petunia	Turner <i>et al</i> ²⁸	1986
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Goldschmidt-Clermont <i>et al</i> ²⁹	1986
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Anderson <i>et al</i> ³⁰	1987

La subunidad S ejerce una profunda influencia en las propiedades catalíticas de la Rubisco L₈S₈³¹⁻³⁶. El bloque L₈ retiene una pequeña actividad intrínseca en ausencia de las subunidades pequeñas³⁷ y, por otra parte, estudios estructurales han mostrado que las subunidades S no contribuyen con ningún aminoácido al centro activo de la enzima³⁸⁻⁴⁰. Por tanto, el efecto de las subunidades S en la actividad catalítica debe ser ejercido mediante interacciones de largo alcance²³.

II.1.2 ESTRUCTURA SECUNDARIA

La subunidad L de la Rubisco, tanto de plantas superiores (Figura II.1) como de *Rhodospirillum Rubrum* (Figura II.2), consta de dos dominios claramente separados: el dominio N-terminal del polipéptido (aminoácidos 1-150) y el dominio C-terminal de la cadena polipeptídica (aminoácidos 151-475).



Figura II.1 Imágenes generadas por ordenador de la subunidad L de la Rubisco de espinaca.

Fuente: Knight *et al*, 1990⁴⁰

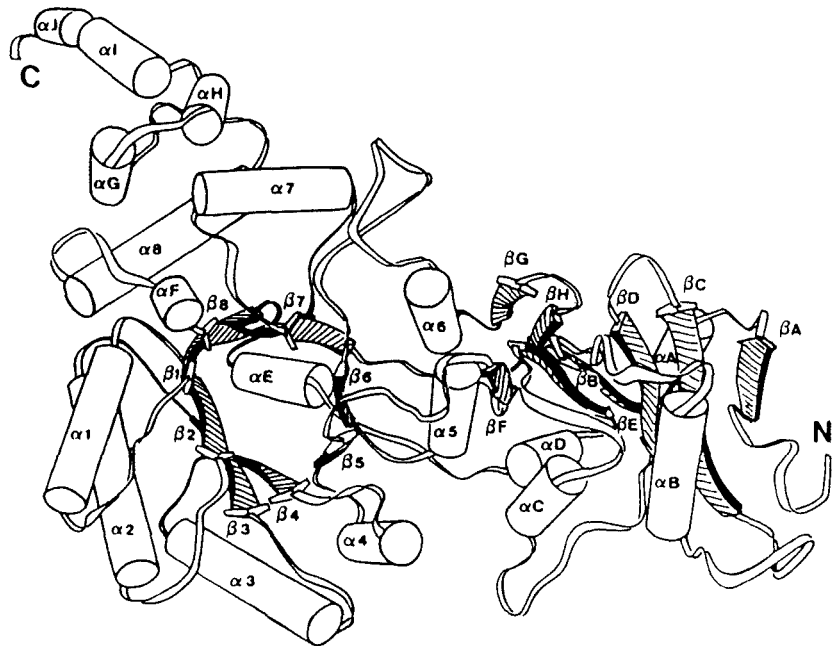


Figura II.2 Vista esquemática de la subunidad L de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum*.

Fuente: Andersson *et al*, 1989³⁸

El primero contiene en las plantas superiores 5 cadenas β que forman una lámina, así como dos hélices α a un lado de dicha lámina. El dominio empieza con una corta cadena β (βA) seguida por dos unidades $\beta\alpha\beta$ en las que las cadenas β no son adyacentes. Estas unidades están unidas mediante giros (loops). La conexión con el dominio C-terminal se realiza a través de una hélice α corta (αD) seguida por una zona bastante larga de cadena extendida⁴⁰. En la subunidad L de *Rhodospirillum Rubrum* hay otra hélice α (αA) situada entre βA y βB ³⁸ (Tabla II.4).

El dominio C-terminal tiene una estructura de barril α/β , como se ha encontrado también en la triosafosfato isomerasa⁴¹, glicolato oxidasa⁴² y otras enzimas. Esta estructura consta de ocho unidades consecutivas $\beta\alpha$ con las cadenas β en forma de barril y rodeadas de ocho hélices α . Cada cadena β está unida desde su extremo C-terminal al extremo N-terminal de la hélice α correspondiente. Estas uniones se denominan giros-C y, evidentemente, hay ocho, numerados del 1 al 8, de tal manera que el giro-C 1 conecta $\beta 1$ con $\alpha 1$, y así sucesivamente. La mayor parte de los aminoácidos que participan en el proceso catalítico se encuentran en estos giros-C. Algunos de los giros-C contienen pequeñas zonas con estructura secundaria α o β , tal como se indica en la Tabla II.4.

La estructura de la subunidad L de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum* se diferencia de la de plantas superiores, sobre todo, en los últimos 42 aminoácidos, que forman una extensión α helicoidal al barril α/β , constituyendo cuatro hélices en *Rhodospirillum Rubrum* y sólo dos en las plantas²³. Además, hay estructuras secundarias diferentes en los giros-C tanto en longitud como en la misma estructura⁴³.

Tabla II.4 Estructura secundaria de la subunidad L de la Rubisco de espinaca y la de *Rhodospirillum Rubrum*. Los elementos estructurales se presentan ordenados, empezando por el extremo N-terminal.

Espinaca		<i>Rhodospirillum Rubrum</i>		
Dominio	Estructura secundaria	Número de residuo	Estructura secundaria	Número de residuo
N-terminal	β A	24-26	β A	8-10
	β B	36-44	α A	14-20
	α B	50-60	β B	23-31
	β C	83-89	α B	38-49
	β D	97-103	β C	70-75
	α C	113-121	β D	80-86
	β E	130-139	α C	101-109
	α D	142-145	β E	120-127
C-terminal	α D	142-145	α D	130-133
	α E	155-162	α E	143-150
	β 1	169-171	β 1	159-164
	α 1	182-194	α 1	173-184
	β 2	199-201	β 2	189-191
	α 2	214-232	α 2	204-222
	β 3	237-241	β 3	227-231
	α 3	247-260	α 3	237-251
	β 4	264-268	β 4	258-263
	α 4	274-287	α 4	268-278
	β 5	290-294	β 5	284-287
	α F	298-302		
	β F	308-309	β F	301-303
	α 5	311-321	α 5	305-315
	β 6	325-327	β 6	318-321
	α 6	339-350	α 6	336-344
	β G	353-354	β G	347-349
	β H	366-367	β H	354-356
	β 7	375-379	β 7	364-369
	α 7	387-394	α 7	376-383
β 8	399-401	β 8	389-392	
		α F	394-398	
	α P	404-407		
	α 8	413-433	α 8	403-419
	α G	437-451	α G	423-429
	α H	453-462	α H	431-439
			α I	441-447
			α J	451-455

El plegamiento de la subunidad S de la Rubisco se ha estudiado con detalle^{40,44}. Los 123 aminoácidos de esta subunidad se agrupan en cuatro cadenas β antiparalelas que forman una lámina, cubiertas por un lado por dos hélices α (Figura II.3) (Tabla II.5).

Los primeros 20 aminoácidos del extremo N-terminal forman un brazo irregular que se extiende desde el cuerpo principal de la estructura hasta una subunidad S vecina en la molécula L_8S_8 . Las cadenas de la esquina de la lámina β , βB y βD , son algo irregulares, particularmente βB , en la cual los restos 71 y 73 no forman puentes de hidrógeno con la cadena βA .

Las dos cadenas βA y βB están unidas por un largo giro (Figura II.4) formado por los residuos 46 al 67, que se introduce en el canal central, abierto al solvente, de la molécula L_8S_8 . En la Rubisco de cianobacterias están ausentes los restos 52 al 63 de este giro; precisamente esa parte del giro forma lo que se denomina una horquilla- β . Dicha horquilla comienza con un par de enlaces de hidrógeno antiparalelos entre los aminoácidos Y52 y D63. Los otros posibles enlaces de hidrógeno entre las cadenas antiparalelas se encuentran impedidos por la conformación de los residuos 54 al 56, que forman una especie de abolladura. El giro, sin embargo, está estabilizado por enlaces de hidrógeno entre las cadenas laterales y la cadena principal (Tabla II.6). Esta zona de la subunidad S es muy importante, ya que forma la principal área de interacción con las subunidades L.

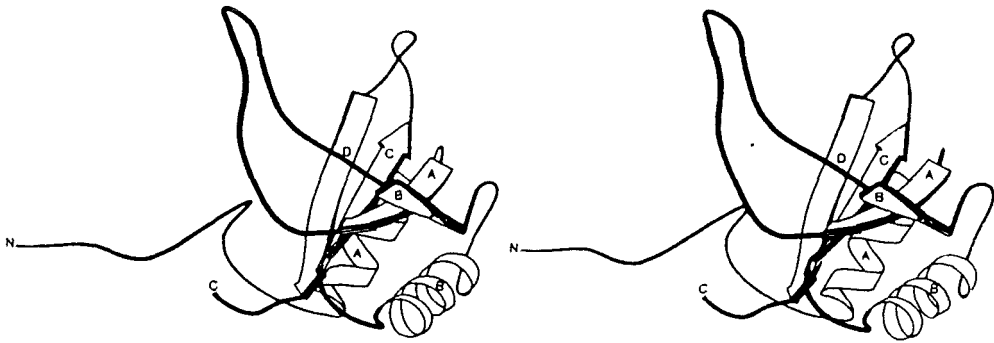


Figura II.3 Imágenes generadas por ordenador de la subunidad S de la Rubisco de espinaca.

Fuente: Knight *et al*, 1990⁴⁰

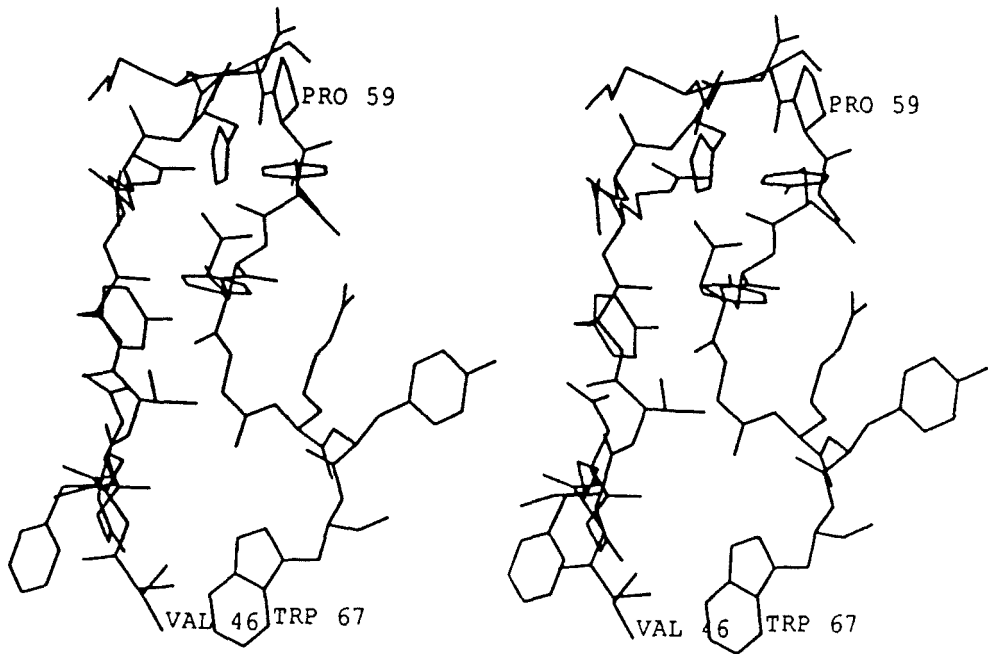


Figura II.4 El giro-horquilla (restos 46 al 67) de la subunidad S de la Rubisco de espinaca.

Fuente: Knight *et al*, 1990⁴⁰

Tabla II.5 Estructura secundaria de la subunidad S de la Rubisco de espinaca. Los elementos estructurales se presentan ordenados, empezando por el extremo N-terminal.

Estructura secundaria	Número de residuo
α A	23-35
β A	39-45
β B	68-74
α B	80-93
β C	98-105
β D	110-118

Tabla II.6 Enlaces de hidrógeno ($d < 3.3 \text{ \AA}$) entre residuos del giro-horquilla en la subunidad S.

Residuo	Átomo		Residuo	Átomo
D48	N	-	E45	O
Y52	N	-	D63	O
	O	-		N
R53	O	-	K57	N
	N	-	Y61	O
	N	-		O
	N	-	S58	O
E54	N	-	D63	O
	O	-	K57	N
H55	N	-	D63	O
	N	-		O
S58	O	-	Y61	N
G60	O	-	R65	N
Y62	O	-		N
R65	O	-	R100	N

II.1.3 ESTRUCTURA TERCIARIA

Para determinar si un aminoácido de la cadena polipeptídica está oculto o se encuentra en la superficie accesible al exterior, se compara su accesibilidad relativa frente a un tripéptido G-X-G, donde X es el aminoácido en cuestión⁴⁵. De esta manera se ha calculado en la Rubisco que hay 158 aminoácidos ocultos en la subunidad L (de un total de 463, el 34%) y sólo 15 en la subunidad S (de un total de 123, el 12%)⁴⁰. Estos aminoácidos ocultos forman lo que se conoce como "cores" (regiones internas) de las subunidades.

Hay fundamentalmente cuatro regiones internas hidrofóbicas en la subunidad L: una en el dominio N-terminal, dos en el C-terminal y una en la región de unión entre ambos dominios.

La región interna del dominio N-terminal está situada entre las hélices αB y αC y la lámina β . Los aminoácidos que pertenecen a ella se detallan en la Tabla II.7. Una de las regiones internas del dominio C-terminal está formada por los restos de las cadenas β que apuntan hacia el interior del barril α/β . Las cadenas laterales de estos restos están ordenadas en tres estratos; el estrato superior define lo que sería el suelo del centro activo de la enzima⁴⁶ (Tabla II.7). La segunda región interna hidrofóbica del dominio C-terminal comprende restos laterales de las ocho hélices, que se empaquetan unos contra otros y contra las ocho cadenas β (Tabla II.7). La hélice $\alpha 5$ en el dominio C-terminal está involucrada en interacciones dominio-dominio y está completamente oculta en el interior de la subunidad L. Interacciona con las hélices αC y αD del dominio N-terminal y con las cadenas βG y βH del dominio C-terminal. Los residuos que la componen forman la cuarta región interna hidrofóbica de la subunidad L (Tabla II.7).

En la subunidad S sólo hay una región interna hidrofóbica, formada por el empaquetamiento de dos hélices α contra la lámina antiparalela β . Los aminoácidos que forman esta región interna están detallados en la Tabla II.8. Todos ellos son invariablemente hidrofóbicos, excepto A97 y V99.

Tabla II.7. Aminoácidos que forman las cuatro regiones internas hidrofóbicas de la subunidad L de la Rubisco de espinaca.

"Core"	Aminoácidos		
"Core" del dominio N-terminal	I36	A38	F40
	V42	P44	A53
	G54	V57	A58
	S61	G82	C84
	C99	V101	Y103
	I120	V124	P141
Y144			
"Core" del barril α/β del dominio C-terminal	G171	F199	K201
	Y239	I264	M266
	H292	H325	H327
	V377	V399	Q401
Segundo "core" del dominio C-terminal	P168	L170	C172
	I174	Y185	G186
	V189	C192	L193
	T200	D202	V206
	M212	R217	F218
	C221	A222	L225
	A228	K236	H238
	L240	A242	M250
	A254	A257	V262
	V265	H267	Y269
	N277	L280	C284
	L289	L291	I293
	F311	A315	L318
	G323	I326	S328
	T342	F345	V346
	L349	V374	P376
	A378	I382	M387
	L390	T391	F394
S398	L400	F402	
T406	A417	N420	
L424			
"Core" en la región de unión entre ambos dominios	L37	A39	I98
	V113	M116	A132
	L133	R134	L135
	E136	D137	L138
	I140	V145	G150
	P151	H310	R312
	V313	K316	A317
	L320	S321	Q366

Tabla II.8. Aminoácidos que forman la región interna hidrofóbica de la subunidad S de la Rubisco de espinaca.

V30	L33	P40	L42
V83	V87	V90	A97
V99	I101	F115	

II.1.4 ESTRUCTURA CUATERNARIA

Debido al papel central de la Rubisco en el ciclo del carbono, varios grupos han realizado estudios cristalográficos de la enzima de diversas fuentes. Los primeros estudios cristalográficos fueron realizados en la Rubisco de tabaco^{47,48}. Sin embargo, los cristales utilizados no eran de suficiente calidad como para permitir una determinación estructural de alta resolución. Posteriormente fueron publicados datos cristalográficos de mayor resolución de la enzima homodimérica de *Rhodospirillum Rubrum*⁴⁹⁻⁵² y de la enzima de tabaco^{53,54}, espinaca⁵⁵⁻⁵⁷, patata⁵⁸, *Alcaligenes eutrophus*^{59,60}, *Chromatium vinosum*⁶¹ y *Synechococcus*⁶².

La estructura de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum* fue posteriormente resuelta con una resolución de 2.9 Å⁶³. Este estudio reveló la estructura en dos dominios de la subunidad L, que ya ha sido comentada, y localizó el centro activo en la superficie de contacto de las dos subunidades L, en el extremo C-terminal de las cadenas β que forman el barril α/β. Recientemente se ha refinado la estructura de *Rhodospirillum Rubrum* hasta 1.7 Å⁴³. Asimismo se han realizado estudios de la enzima complejada con el producto de la reacción de carboxilación⁶⁴, con 2-carboxi-D-Arabinol-1,5-bifosfato, un estado de transición análogo de la reacción de carboxilación⁶⁵, con el catión Mg²⁺ presente en el centro activo y la molécula de CO₂ que activa la enzima (ver sección II.2 de la presente memoria)⁶⁶, así como de la enzima activada complejada con su sustrato, D-Ribulosa-1,5-bifosfato⁶⁷.

Por su parte, han sido realizadas descripciones preliminares de la Rubisco no activada del tabaco a 3.0 y 2.6 Å de resolución^{39,68} así como un estudio resuelto a 2.0 Å⁶⁹. También se han publicado estudios cristalográficos de la Rubisco de espinaca activada y complejada con el estado de transición análogo de

la reacción de carboxilación³⁸ y posteriormente una corrección a la estructura de la subunidad S⁴⁴ que previamente había sido interpretada de modo incorrecto⁶⁸ así como una descripción completa de la enzima no activada de espinaca resuelta a 2.4 Å⁴⁰.

De todos estos estudios se deduce que la agrupación L₂ es la mínima unidad funcional de la Rubisco. Dicha unidad tiene la forma de un elipsoide deformado de dimensiones 45 × 70 × 105 Å y una intensa interacción entre ambas subunidades (Figura II.5). Estas interacciones tienen lugar por un lado entre los dominios C-terminales de ambas subunidades y por otro lado entre el dominio N-terminal de cada una con el dominio C-terminal de la otra, formándose en este último tipo de contactos entre subunidades dos centros activos de la enzima.

La molécula L₈S₈, por su parte, tiene forma de cubo de aproximadamente 110 Å de lado con vértices redondeados (Figura II.6). Hay un eje cuaternario que relaciona cuatro agrupaciones diméricas L₂, de modo que la organización de las subunidades L puede entenderse como (L₂)₄. Las subunidades S, por su parte, se ordenan en dos grupos S₄, que interaccionan fuertemente con los dímeros L₂. De este modo, cuatro caras del cubo están formadas por parejas de dímeros L₂ adyacentes y las otras dos, opuestas entre sí, por los grupos S₄.

En el centro de la molécula, a lo largo del eje cuaternario que corre entre los dímeros L₂, hay un canal abierto al solvente. La anchura de este canal es variable, encontrándose que las partes más anchas corresponden a las zonas de entrada (que tienen forma de embudo), localizadas en las caras del cubo formadas por los grupos S₄. En el punto de menor anchura, el diámetro del canal es de unos 15 Å. En el centro de la molécula el canal se ensancha y forma una cavidad de unos 30 Å de diámetro (Figuras II.7).

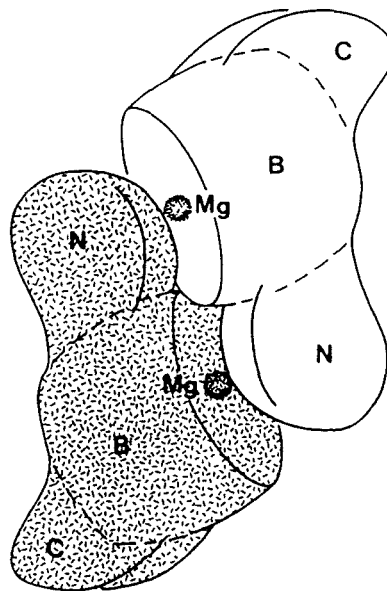


Figura II.5. Diagrama esquemático del dímero L_2 , en el que se aprecian las interacciones entre ambas subunidades. En los alrededores de los centros activos (indicados en la figura mediante la posición de los cationes Mg (II)), puede apreciarse que las interacciones se producen entre el dominio N-terminal de una subunidad (N) y el dominio C-terminal de la otra, concretamente con el barril α/β (B). Fuente: Andersson *et al*, 1989³⁸

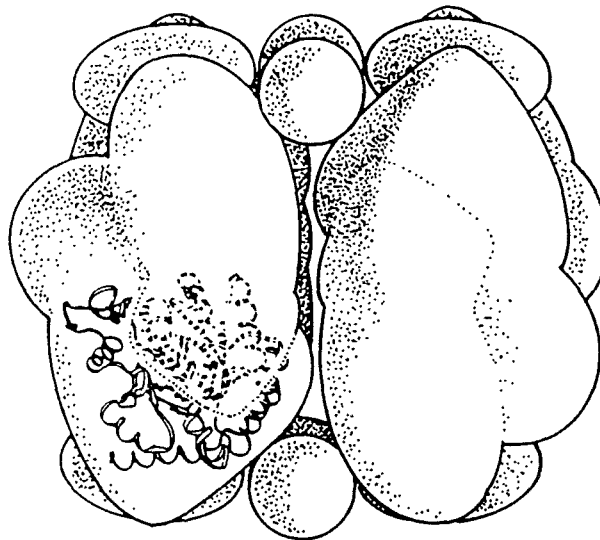
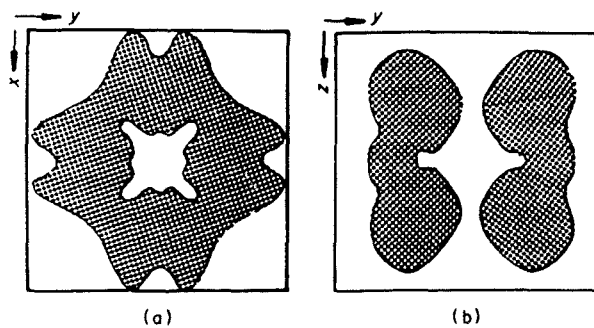


Figura II.6. Diagrama de la arquitectura de la molécula L₈S₈ de Rubisco.

Fuente: Knight *et al*, 1990⁴⁰



Figuras II.7. Sección de la Rubisco de espinaca, ilustrando el canal abierto al solvente. En (a) se aprecia una vista a lo largo del eje cuaternario y en (b) una vista perpendicular a dicho eje.

Fuente: Knight *et al*, 1990⁴⁰

II.1.5 ESTRUCTURA DEL CENTRO ACTIVO

El centro activo de la Rubisco se localiza en los dímeros L₂, concretamente en la zona de interacción entre el dominio C-terminal de una subunidad L y el dominio N-terminal de la segunda^{38,39,63}. Como en todas las enzimas encontradas con estructuras de barril α/β , el centro activo está en el extremo carboxílico de las cadenas β del barril⁷⁰. Los residuos de los giros-C que van de las cadenas β a las hélices α del barril contienen la mayoría de los aminoácidos esenciales para la unión del sustrato y para la catálisis.

La K175, situada en el giro-C 1, ha sido identificada mediante diferentes técnicas como uno de los aminoácidos que forman el centro activo^{38,63,64,68,71,72}. En el mismo giro-C, la K177 también apunta al interior del centro activo. Ambas lisinas forman parte de una red de cargas y enlaces de hidrógeno que configuran en parte el centro activo⁷⁰.

El giro-C 2 contiene otros tres aminoácidos que forman parte del centro activo: K201, D203 y E204. Estos tres aminoácidos forman el centro donde se produce la activación de la enzima; concretamente el resto K201 es el que se carbamila en dicho proceso (como se explicará más detalladamente en el apartado II.2 de la presente memoria) y, una vez carbamylado, junto con el D203 y el E204 forman la zona donde se sitúa el catión magnesio.

Los giros-C 3 y 4 no contribuyen con aminoácidos a la formación del centro activo de la proteína; intervienen en las interacciones entre subunidades.

El residuo H294, situado en el giro-C 5, interviene en la catálisis y se encuentra en el centro activo^{38,40,67}. En el mismo giro-C se encuentra la H298 que no es esencial para el proceso catalítico, aunque su sustitución produce una pérdida apreciable (un 40%) de la actividad enzimática⁷³. También en el giro-C 5 están la R295 y la H327, que participan en el proceso de unión a la proteína de uno de los grupos fosfato del sustrato⁶⁷ y también del ET análogo^{38,65}.

El giro-C 6 es flexible y se encuentra desordenado en la forma no activada de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum*^{43,63}. Una vez que la Rubisco ha sido activada este giro-C se cierra, aislando al sustrato del solvente, y contribuye a la estructura del centro activo con el aminoácido K334^{38,69}.

El giro-C 7 contiene el resto S379, que participa en la unión del sustrato⁶⁷, del ET análogo^{38,65} y del producto a la enzima⁶⁴.

El giro-C 8 participa en la formación del punto de unión del segundo grupo fosfato del sustrato al centro activo con los aminoácidos G403 y G404.

Dos regiones del dominio N-terminal de la segunda subunidad también participan en la construcción del centro activo de la Rubisco, por medio de los aminoácidos E60 y T65 por un lado y el residuo N123 por otro. Éste último forma parte de la esfera de coordinación del catión metálico en la Rubisco activada de *Rhodospirillum Rubrum*⁶⁶ y posteriormente, una vez el sustrato ha ocupado el centro activo, cede su lugar en la esfera de coordinación a uno de los oxígenos de aquél y pasa a interactuar con el grupo hidroxilo del carbono 4 del sustrato⁶⁷.

En la Figura II.8 se presenta una vista esquemática de los aminoácidos que forman el centro activo de la Rubisco. Se incluye el ET análogo y el ion magnesio para visualizar mejor las interacciones que tienen lugar.

Mediante estudios estructurales del complejo formado por la enzima no activada y el producto de la reacción de carboxilación, 3-D-fosfoglicerato, se ha determinado el centro de unión de uno de los grupos fosfato⁶⁴. Este grupo interactúa con los aminoácidos H327 y R295, así como con los átomos de nitrógeno de los restos T328 y G329. Además, el aminoácido S379 interactúa con el oxígeno puente entre el grupo fosfato y el resto del 3-D-fosfoglicerato. El grupo carboxilo del producto interactúa con K201, que en la enzima activada se encuentra carbamylada e interactúa con el catión magnesio.

Por su parte, estudios del complejo formado por la enzima no activada y el ET análogo, 3-carboxi-D-Arabinitol-1,5-bifosfato (CABP), muestran que dicho ET análogo se enlaza a lo largo del centro activo⁶⁵. Uno de los grupos fosfato se encuentra enlazado como se ha descrito en el párrafo anterior. El segundo se une a los aminoácidos G403, G404, K175, K334 y N123, así como con T65.

Uno de los dos oxígenos del grupo 2-carboxilo del CABP, que simula el sustrato CO₂, se ha encontrado coordinado con el catión Mg(II) en estudios del complejo entre la enzima activada y el ET análogo, mientras que el segundo está enlazado con el resto K334⁴⁰. Dos de los grupos hidroxilo del CABP se sitúan también en la esfera de coordinación del catión, mientras que el tercero forma un enlace de hidrógeno con el resto S379.

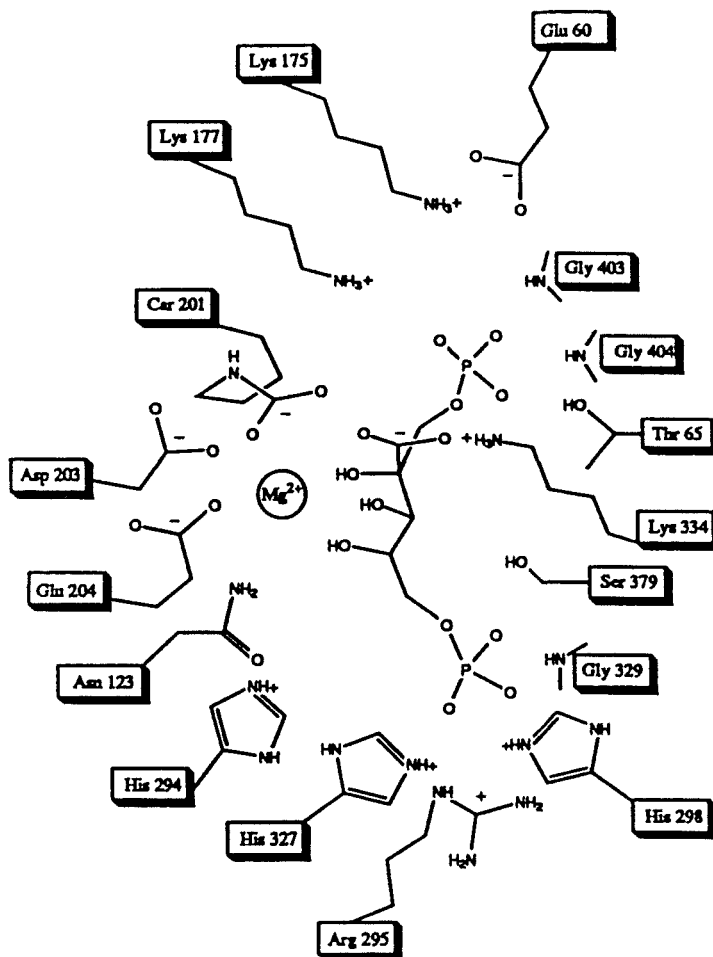


Figura II.8 Vista esquemática del centro activo de la Rubisco con el ET análogo y el catión magnesio. Fuente: Schneider *et al*, 1992⁷⁰

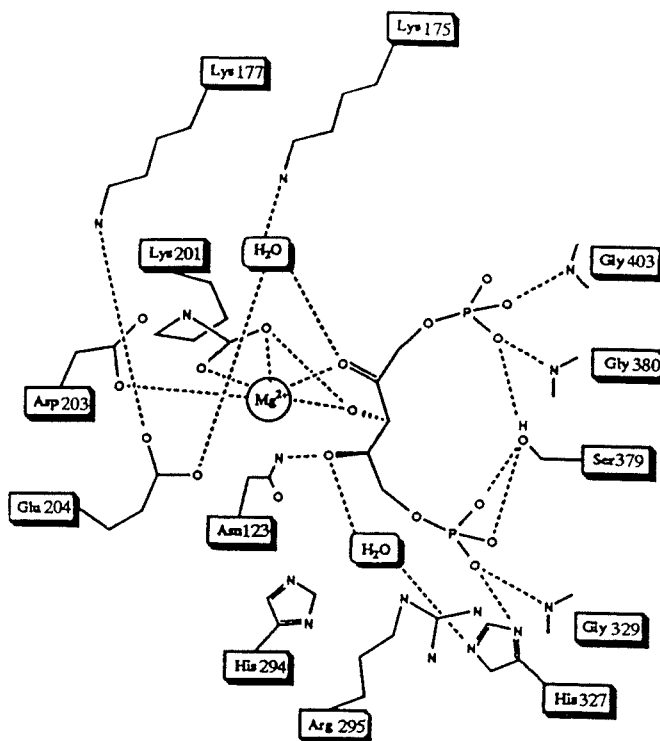


Figura II.9 Vista esquemática del sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato y sus interacciones en el centro activo de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum*. Fuente: Lundqvist *et al*, 1991⁶⁷. La numeración ha sido actualizada para facilitar la comparación.

Una comparación de los complejos formados por la enzima no activada y la activada con el CABP muestran que la presencia del catión magnesio ejerce una profunda influencia en la manera en que el inhibidor se une al centro activo. En el complejo con la enzima no activada el CABP se une al revés, con los grupos fosfato intercambiados respecto a la manera como se une con la enzima activada^{38,65}. El catión metálico, por tanto, juega un papel importante en la orientación del ET análogo y, por extensión, del sustrato en el interior del centro activo.

La unión del sustrato a la enzima activada de *Rhodospirillum Rubrum* se ha estudiado a 2.6 Å de resolución⁶⁷ (Figura II.9). El sustrato se une a la enzima en una conformación doblada. Debido al cambio en la posición de los giros-C 7 y 8 y de la hélice $\alpha 8$ en la Rubisco L₂²³, el sustrato está más doblado que en la Rubisco L₈S₈. Los oxígenos de los carbonos 2 y 3 del sustrato están coordinados con el metal, lo cual lleva a la formación del enodiol *cis* en el primer paso del proceso catalítico (ver sección II.2 de la presente memoria).

La comparación de las formas inactivas de la Rubisco, tanto de *Rhodospirillum Rubrum*^{43,63} como de tabaco^{39,68}, con los complejos cuaternarios con CABP de la enzima activada de espinaca^{38,40}, revelan importantes diferencias conformacionales en el centro activo. En las formas activadas, el giro-C 6 está cerrado sobre el CABP, de modo que el resto K334 interacciona con uno de los oxígenos del grupo carboxilo de dicho ET análogo. La posición de este giro-C es diferente, así como también lo es la del extremo C-terminal desde el residuo 460 en adelante: esta parte de la proteína se pliega sobre el giro-C 6 en las formas activadas complejadas con el CABP. Estos cambios conformacionales que se producen cuando la enzima lleva a cabo el proceso catalítico aislan el centro activo del exterior y se produce un desplazamiento de algunos residuos hasta dicho centro activo, donde interaccionan con el sustrato o el ET análogo. Con ello, la unión entre la enzima y el sustrato provoca en ambos un cambio conformacional. Este hecho extiende el postulado de Pauling⁷⁴⁻⁷⁶, en el sentido de que no sólo la enzima moldea al sustrato cuando éste se une al centro activo, también en el proceso la propia enzima se adapta y es moldeada por el sustrato.

II.2 REACCIONES QUÍMICAS CATALIZADAS POR LA ENZIMA RUBISCO

II.2.1 ACTIVACIÓN

Una característica común de todas las moléculas de Rubisco que han sido analizadas hasta la fecha es la presencia de una primera reacción química, necesaria para convertir la enzima en su forma activa⁷⁰. Este proceso de activación consiste en la formación de un carbamato por reacción de una primera molécula de CO₂ con el grupo ε-amino de un resto Lisina en el centro activo, concretamente del aminoácido K201^{21,22}. Esta molécula de CO₂ es distinta de la que posteriormente se incorpora a la D-Ribulosa-1,5-bifosfato durante la catálisis^{77,78}. Por su parte, un examen del campo electrostático en el interior del centro activo de la Rubisco explica la alta reactividad del resto K201 comparada con otras Lisinas: la K201 se encuentra protonada, de manera que tiende a perder el protón y se produce una reacción ácido-base con CO₂⁷⁹, lentamente, siendo éste el paso limitante de la velocidad del proceso de activación^{80,81}.

Una vez obtenido el carbamato, éste se une al Mg(II) formando el complejo ternario enzima-CO₂-Mg(II)^{77,80}. Se ha realizado un considerable esfuerzo por analizar la esfera de coordinación del metal en la enzima activada, utilizando técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de Resonancia Paramagnética de Electrones (RPE). Estos análisis han mostrado que el carbamato se encuentra estabilizado por su unión con el Mg(II)^{77,80,82}. Sin embargo, antes de que la estructura del complejo ternario fuera determinada por técnicas de Rayos X⁶⁶, todos los intentos por demostrar la existencia de una coordinación directa entre los oxígenos del carbamato y el metal habían fallado. Así, los estudios de RPE con Mn(II) o Cu(II) y carbamato marcado isotópicamente con ¹⁷O en complejos cuaternarios de la enzima de *Rhodospirillum Rubrum* no pudieron demostrar la coordinación directa⁸³⁻⁸⁵, mientras que los estudios de RMN de ¹³C en los complejos enzima-CO₂-Metal(II)-CABP sólo sugerían que el metal se encontraba a una distancia de 5 a 6 Å del carbamato⁸⁶.

En el complejo ternario, el ion Mg(II) puede ser reemplazado *in vitro* por una serie de iones metálicos, como Mn(II), Fe(II), Ca(II), Cu(II), Co(II) o Ni(II). Sin embargo, el grado de actividad catalítica depende tanto del metal como del tipo de Rubisco utilizado. En la Rubisco del tipo L₂ se ha observado actividad catalítica cuando se reemplaza el Mg(II) por Fe(II), Ca(II) y Cu(II)⁸⁵⁻⁹⁰. En la de tipo L₈S₈ se mantiene actividad catalítica cuando se reemplaza el Mg(II) por Ni(II), Co(II), Fe(II), Mn(II) y Cu(II)^{87,88,91-94}. Estas sustituciones provocan incluso cambios en la especificidad que muestra la enzima ante CO₂ y O₂. En algunos casos, la Rubisco modificada de esta manera sólo muestra actividad como oxigenasa, en otros pierde eficacia como carboxilasa y en otros no cataliza en absoluto la adición de gases al sustrato. Sin embargo, en ningún caso se ha observado un aumento en el rendimiento de la Rubisco como carboxilasa.

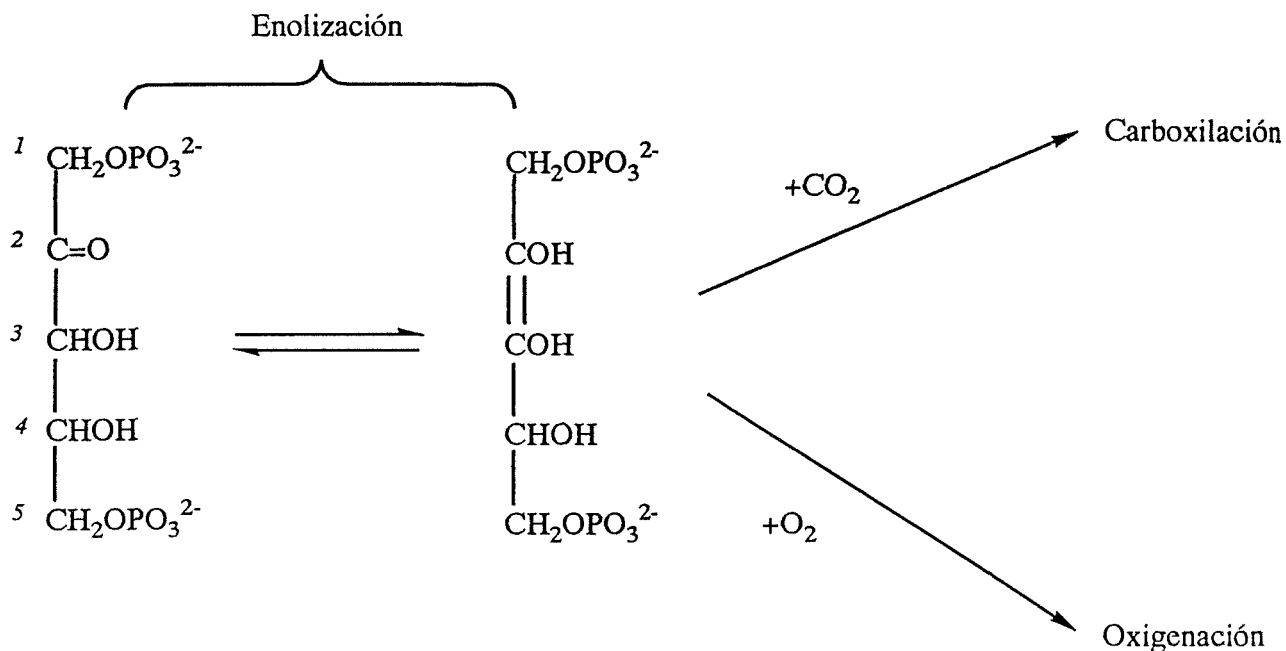
La activación de la Rubisco provoca cambios en las propiedades químicas de la enzima, ya que la reactividad y nucleofilia de otros restos aminoácidos del centro activo se modifican. De este modo, aunque el proceso de activación no origina grandes cambios conformacionales en el centro activo ni en la estructura global de la enzima⁷⁰, su afinidad por el sustrato⁹⁵ y otros compuestos fosforilados^{96,97} se ve alterada.

El proceso de activación está catalizado por la enzima D-Ribulosa-1,5-bifosfato Carboxilasa/Oxigenasa Activasa⁹⁸⁻¹⁰⁰ tanto *in vivo* como en concentraciones fisiológicas del sustrato *in vitro*, siendo la actividad de esta enzima dependiente de la concentración de ATP¹⁰¹⁻¹⁰³. En su ausencia, sólo se carbamila entre un 20 y un 40% de los centros activos de la Rubisco, con la consiguiente reducción del rendimiento de la fotosíntesis^{104,105}.

Una vez que el Mg(II) interacciona con el carbamato de K201 el centro activo queda preparado para aceptar una molécula del sustrato, D-Ribulosa-1,5-bifosfato, e iniciar el proceso catalítico bien de carboxilación o bien de oxigenación. En ambos procesos es necesaria una etapa previa, que detallamos a continuación, en la cual el sustrato se enoliza.

II.2.2 ENOLIZACIÓN

Una vez activada la enzima y unida al sustrato se inicia el proceso catalítico. En este proceso, la enolización de la D-Ribulosa-1,5-bifosfato se acepta como el primer paso del mecanismo molecular de la catálisis¹⁰⁶. Este primer paso es esencial para activar al sustrato, tanto frente a la carboxilación como frente a la oxigenación, y es considerado por algunos autores como el paso limitante de la velocidad del proceso catalítico^{107,108}. El 2,3 enodiol formado es formalmente el reactivo para los procesos de carboxilación y oxigenación en los cuales bien una molécula de CO₂ o bien una de O₂ se adiciona al carbono 2 (Esquema II.1).



Esquema II.1 Enolización de la D-Ribulosa-1,5-bifosfato y posterior ataque del CO₂ y del O₂ sobre el enodiol resultante. En el esquema se muestra la numeración de los átomos de carbono del sustrato.

Respecto al mecanismo molecular mediante el cual se produce la enolización, han sido propuestas dos posibilidades⁷⁰: o bien el proceso es intermolecular, con lo cual un grupo básico en el centro activo puede captar el protón de C3 y provocar la formación del 2,3 enodiolato^{72,109-111}, o bien es intramolecular. En este caso se han postulado a su vez dos posibilidades: o bien uno de los grupos fosfato actúa como base para extraer el protón de C3 y formar un enodiolato⁶⁷, o bien se produce un paso directo del protón desde el C3 al oxígeno del C2¹¹². A continuación extendemos cada una de estas posibilidades.

Dado que el oxígeno unido al C2 del sustrato está cerca del ion metálico, se produce una polarización del doble enlace entre dicho oxígeno y el C2, lo cual incrementa la acidez del protón directamente unido a C3 que puede así ser extraído. En la hipótesis del mecanismo intermolecular, se ha sugerido que el resto K175 es la base que capta el protón^{72,111}. Para llegar a esta conclusión se utilizaron tanto datos bioquímicos como mutagenéticos: la K175 tiene un pK_a inusualmente bajo, de 7.8¹¹⁰, lo cual está de acuerdo con el pK_a de 7.5 determinado a partir de la dependencia del pH del efecto isotópico de deuterio calculado para extraer el protón de C3 del sustrato¹¹³. Además, estudios de mutagénesis dirigida en los cuales el resto K175 era reemplazado por glicina, alanina, serina, glutamina, arginina, cisteína e histidina, daban lugar a proteínas mutantes con severas deficiencias en su actividad como carboxilasas⁷². La mutante K175G, por ejemplo, puede experimentar activación y unir el CABP al centro activo, pero no cataliza el paso de enolización¹¹¹. Asimismo, esta hipótesis de la enolización intermolecular se veía reforzada por el hecho de que los modelos cristalográficos iniciales del centro activo de la Rubisco no excluían que la K175 pudiera actuar como base³⁸.

Sin embargo, con el aumento de la resolución de los estudios de Rayos X del complejo cuaternario de la Rubisco, ha quedado patente una profunda discrepancia entre la función postulada para la K175 y la estructura observada. Esta discrepancia se detectó primero en el análisis de la estructura cristalina del complejo cuaternario de la Rubisco de espinaca activada con el CABP⁴⁰. En esa estructura, la K175 está a 6 Å de distancia del átomo C3 y mediante experimentos de modelización molecular no se consigue acercar el residuo al C3 lo suficiente como para que tenga lugar la transferencia del hidrógeno sin destruir la

conformación del giro-C 1⁷⁰. Una situación similar se detectó en el análisis de la estructura del complejo cuaternario de la Rubisco de *Rhodospirillum Rubrum* activada con el sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato⁶⁷, en la cual la distancia entre la K175 y el C3 es de 7 Å y los experimentos de modelización molecular sólo la acercan hasta 5 Å. De acuerdo con los datos estructurales, los restos del centro activo que se encuentran más cercanos al C3 y pueden, por tanto, actuar como base y captar el protón son K177 y K334. Pero ninguno de estos aminoácidos parece esencial para el proceso de enolización, ya que proteínas mutantes en esas posiciones son capaces de catalizar la formación del enodiol aunque, eso sí, a velocidades menores que la enzima natural^{114,115}.

Dado que los estudios cristalográficos publicados hasta la fecha no permiten establecer sin ningún género de dudas la conformación del sustrato en el interior del centro activo, caben en principio dos posibles conformaciones con sus implicaciones mecanísticas. En la conformación que llevaría a la obtención del enodiol *trans* varios restos del centro activo se encuentran cerca del C3: N123, H294 y uno de los oxígenos del carbamato de la K201, así como una molécula de agua situada en el centro activo y unida mediante puentes de hidrógeno al resto H327. Recientemente se ha descartado al resto N123, puesto que enzimas mutantes en dicha posición retienen actividad catalítica en el paso de enolización, lo que indica que el resto N123 tiene su papel en otras etapas del proceso catalítico¹¹⁶. En rigor, cualquiera de las otras posibilidades no ha podido ser excluida, por lo que la formación de un enodiol *trans* no debe descartarse. Sin embargo, tanto nuestros resultados como recientes datos aún no publicados¹¹⁷ indican que el enodiol que se forma es el isómero *cis*.

En ese caso, no hay ningún resto aminoácido suficientemente cerca del C3 que pueda actuar como base abstrayendo el protón. Por ello, se ha propuesto que sea uno de los oxígenos del grupo fosfato de C1 quien actúe como base, dado que se encuentra a sólo 4 Å de dicho carbono⁶⁷, mientras que el resto K175 actuaría entonces como ácido, cediendo un protón al oxígeno de C2, del que le separan sólo 4.6 Å. La posibilidad de que un grupo fosfato actúe como base se ha sugerido en la acción de la aldolasa¹¹⁸ y en la eliminación e isomerización no enzimática de triosafosfatos¹¹⁹. Esta posibilidad en el caso de la Rubisco es, sin embargo, difícil de mantener, dado que la protonación de uno de los oxígenos del

grupo fosfato podría provocar un cambio sustancial en las interacciones que lo mantienen fijado al centro activo. Además, la posición del resto K175 parece ideal para ceder un protón al propio C2 tras la formación del carbanión de fosfoglicerato en las últimas etapas del proceso catalítico⁴⁰, más que para cederlo al oxígeno de C2 en la etapa de enolización. Así pues, para elucidar este punto son necesarios más estudios experimentales que puedan aclarar qué mecanismos son posibles y cuáles no.

Desde el punto de vista teórico, nuestros resultados sugieren un mecanismo mucho más sencillo, sin participación directa de grupos exteriores al propio sustrato: una transferencia intramolecular del protón directamente desde el C3 al oxígeno de C2¹²⁰, como presentaremos en el capítulo VII de la presente memoria.

Una misteriosa característica de la catálisis mediante Rubisco ligada a la etapa de enolización es la pérdida de actividad catalítica con el tiempo que muestra la Rubisco de plantas superiores activada *in vitro*.

La velocidad de fijación fotosintética de CO₂ es una consecuencia directa de la actividad de la Rubisco, que depende, *in vivo*, de alteraciones ambientales¹²¹ como el cambio en la intensidad de la luz¹²²⁻¹²⁵ o la concentración de O₂¹²⁶. Existen al menos dos mecanismos que regulan la actividad específica aparente de la enzima¹²⁷: el primero es el proceso de activación que ya ha sido detallado en el apartado anterior de esta memoria; el segundo se relaciona con el control de la concentración de un inhibidor natural de la actividad de la Rubisco: el 2-carboxi-Arabinol-1-fosfato, que ocupa los centros activos e impide, por tanto, su ocupación por el sustrato^{121,128-130}. Existen también otras posibilidades para regular la enzima, dado que el 2-carboxi-Arabinol-1-fosfato no es el único inhibidor encontrado en la naturaleza y las distintas especies de plantas difieren en el mecanismo que emplean para regular la actividad de la Rubisco^{121,127,131,132}.

In vitro, la enzima purificada de plantas superiores puede ser activada mediante incubación con CO₂ y Mg²⁺ a pH alcalino¹³³. Tras añadir sustrato a la Rubisco así activada, se observa que la velocidad de la catálisis disminuye con un tiempo medio de varios minutos^{97,133-137}. Esta pérdida de actividad (llamada caída -"fallover"- en la literatura¹³⁸) no es debida a que el sustrato se acabe ni a que se acumulen productos¹³⁴. Al respecto se han propuesto varias explicaciones:

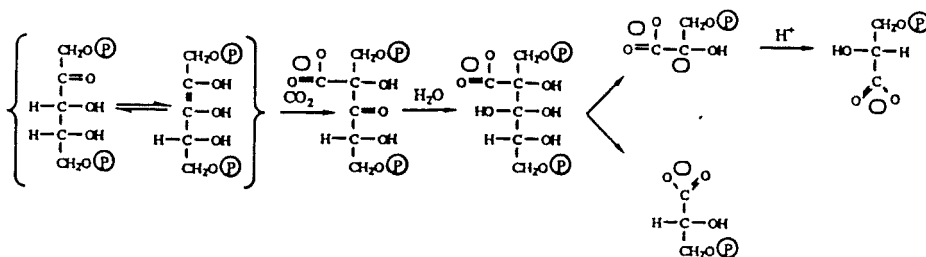
a) el sustrato se une más fuertemente a la enzima no carbamilada que a la carbamilada, lo cual llevaría a una descarbamilación con la consiguiente pérdida de actividad^{95,97,135}; b) el sustrato puede unirse a un centro regulador diferente del centro activo de la enzima¹³⁹; c) la inhibición es consecuencia de la lenta e intensa unión al centro activo de productos de isomerización o degradación que se acumularían en las preparaciones del sustrato durante su almacenamiento¹⁴⁰; d) los productos de isomerización del sustrato que inhiben a la Rubisco se formarían por la propia enzima durante la catálisis^{138,141-143}. Esta última hipótesis es la más aceptada actualmente⁷⁰, habiéndose identificado uno de los productos que inhiben a la Rubisco como D-Xilulosa-1,5-bifosfato¹⁴¹, que se forma en el centro activo como consecuencia de una retroenolización estereoquímicamente incorrecta del 2,3 enodiol.

En cualquier caso, lo que resulta obvio es que esta inactivación durante la catálisis no ocurre *in vivo* o, si ocurre, algún mecanismo reparador invierte el efecto. De hecho, recientes trabajos experimentales indican que la enzima Rubisco Activasa puede tanto prevenir como revertir *in vivo* la pérdida de actividad de la Rubisco observada *in vitro* y también sugieren que esta caída de la actividad se debe a la unión de un inhibidor fosforilado al centro activo de la enzima¹³⁶.

Nuestros resultados, obtenidos desde el punto de vista teórico, se ajustan a estos resultados experimentales y relacionan, por tanto, el fenómeno de la inactivación de la Rubisco con el paso de enolización del proceso catalítico, tal como describiremos en el capítulo VII de la presente memoria.

II.2.3 CARBOXILACIÓN

La reacción de carboxilación de D-Ribulosa-1,5-bifosfato catalizada por la Rubisco es mucho mejor conocida que la de oxigenación. La carboxilación es un proceso complejo que comprende una serie de etapas. Desde 1956, cuando Calvin¹⁴⁴ propuso esta secuencia, se han sugerido diferentes modificaciones⁷, siendo el mecanismo global del proceso catalítico actualmente aceptado⁷⁰ el presentado en el Esquema II.2.



Esquema II.2 Mecanismo global del proceso catalítico de carboxilación.

Existen evidencias experimentales que apoyan esta propuesta. Por un lado, la formación del 2,3 enodiol es un paso lento en el proceso global¹⁰⁸ y se ha comprobado, utilizando sustrato tritiado en el C3, que el hidrógeno unido inicialmente a dicho centro experimenta intercambio con el solvente una vez que el proceso catalítico tiene lugar^{107,145,146}. Este hecho estaría de acuerdo tanto con un mecanismo intermolecular de formación del enodiol, en el cual dicho protón se intercambiaría en un proceso ácido-base con un resto aminoácido de la enzima, como con un proceso intramolecular, en el cual dicho protón o bien se transfiere a un grupo fosfato o al O2 (ver apartado anterior). Además, la observación experimental de que los oxígenos unidos a los átomos C2 y C3 se conservan durante la reacción de carboxilación^{147,148} también está de acuerdo con la participación de un intermedio enodiol y descarta mecanismos en los que se formen aductos covalentes del sustrato con la enzima¹⁴⁹.

Una vez que el enodiol se ha formado, se produce el ataque del CO_2 , que lleva a la obtención de un intermedio de seis carbonos. Experimentos de captura con borohidruro confirman la presencia de este intermedio¹⁵⁰. El posterior ataque de una molécula de agua sobre el C3 es anterior a la rotura del enlace entre C2 y C3, tal como se ha demostrado¹⁵¹. Una vez que el intermedio de seis carbonos se ha roto, de su mitad inferior se forma una molécula de 3-D-fosfoglicerato y de su

mitad superior se obtiene un carbanión (en el C2) de tres carbonos. Tal y como algunos autores han señalado¹⁵², dado que la protonación de este carbanión fuera del centro activo, utilizando protones del solvente, produciría mezclas racémicas de 3-D y 3-L-fosfoglicerato y éste último no se observa, debe existir algún mecanismo que controle la estereoquímica de los productos obtenidos. Una posibilidad ya comentada es que el carbanión se protone estando aún en el centro activo, captando un protón del resto K175⁴⁰.

Con objeto de establecer la estereoquímica del proceso de carboxilación, es necesario conocer previamente cuál es la orientación que el sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato adopta en el centro activo de la enzima. Un estudio de RMN de ³¹P la ha determinado¹⁵³ (Figura II.10).

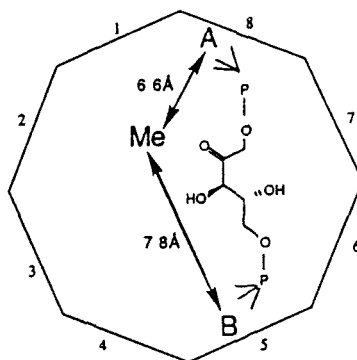
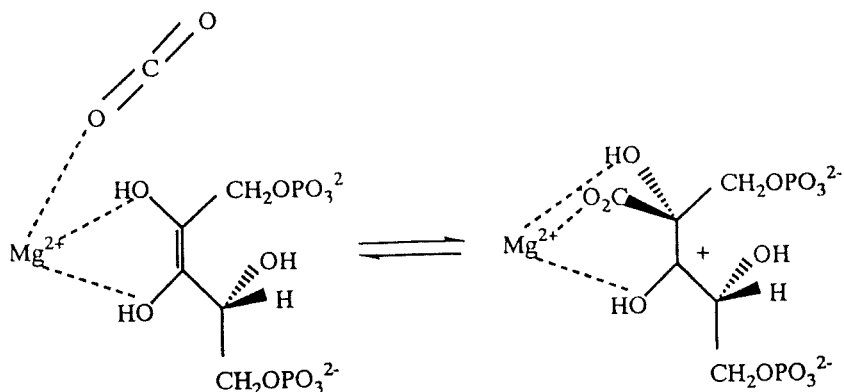


Figura II.10 Orientación del sustrato en el interior del centro activo. La vista es desde la perspectiva de una molécula que entrara en el centro activo, como la de CO₂ o la de O₂.

Fuente: Lorimer *et al*, 1989¹⁵³

Una vez conocida la orientación del sustrato, la estereoquímica resultante del C2 queda determinada, ya que el CO₂ debe atacar a dicho carbono desde el lado del sustrato que mira al exterior (Esquema II.3). En el C3 puede quedar un carbocatión que, por pérdida del hidrógeno del grupo hidroxilo de dicho carbono, da lugar al CABP.



Esquema II.3 Estereoquímica del paso de carboxilación.

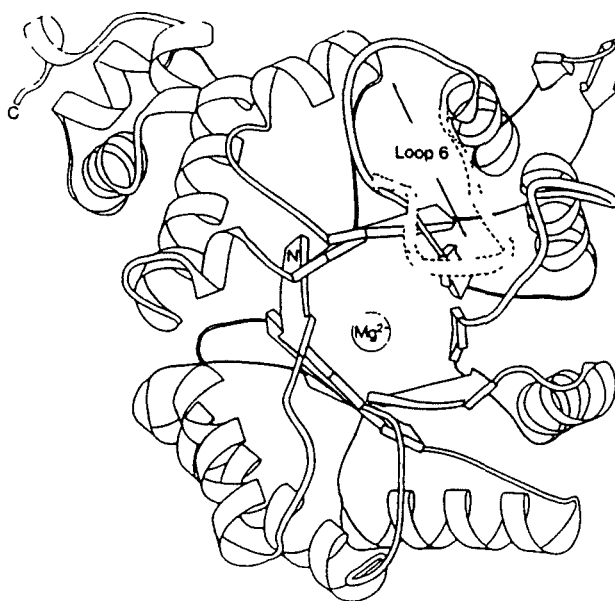
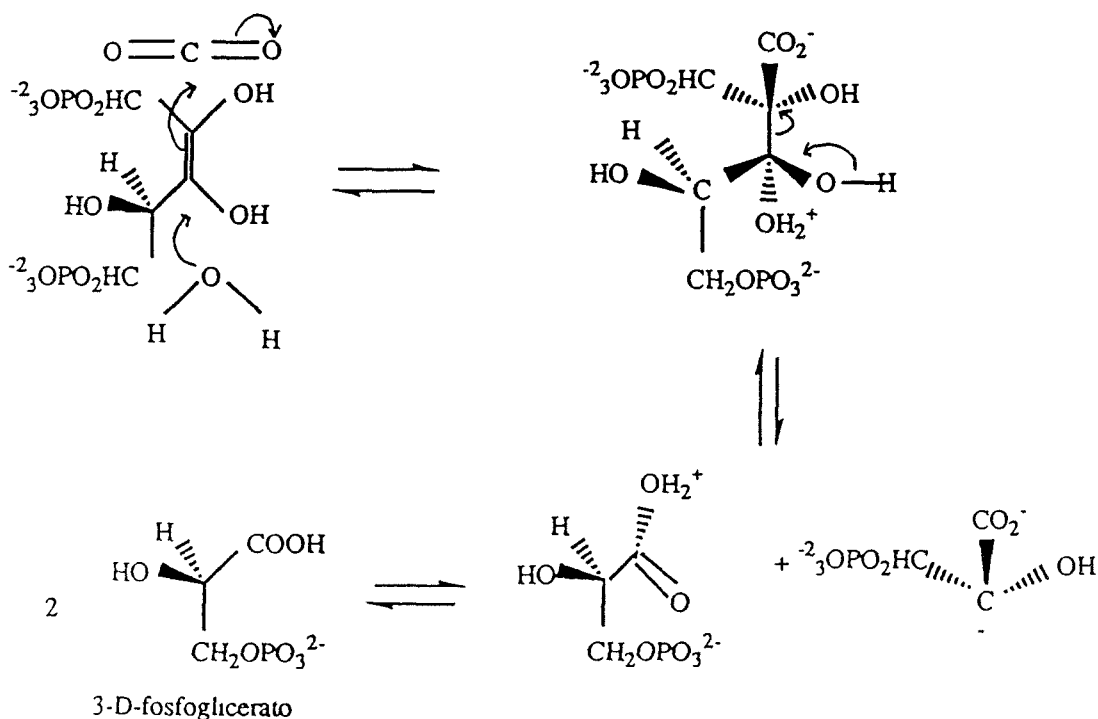


Figura II.11 Dibujo esquemático del dominio C-terminal de la Rubisco, ilustrando la conformación abierta (línea continua) y cerrada (línea discontinua) del giro-C 6. En el dibujo se indica la posición del catión magnesio. Fuente: Lundqvist *et al*, 1991⁶⁷

Una vez que el CO_2 ha entrado en el centro activo, éste queda aislado del solvente debido al cierre del giro-C 6, como ya hemos comentado en el apartado anterior (Figura II.11). Por ello, resulta obvio que la molécula de agua que interviene en el subsiguiente paso de hidratación ya debe encontrarse en el interior del centro activo cuando éste se cierra. Efectivamente, una molécula de H_2O se encuentra cerca del C3, formando puentes de hidrógeno con el oxígeno unido a C4 y con un nitrógeno del resto H327⁶⁷ (ver Figura II.9).

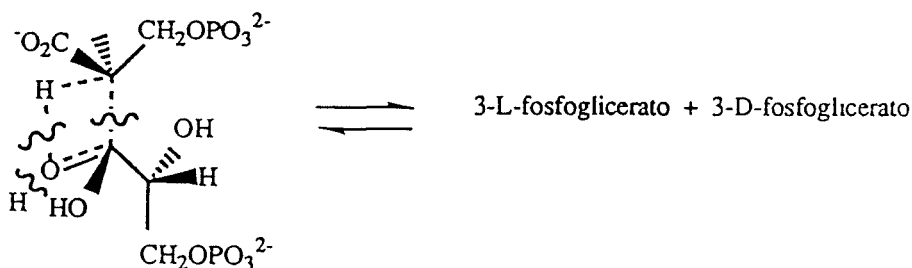
Se han postulado dos mecanismos para el paso de hidratación. Una posibilidad recientemente sugerida es que la carboxilación y la hidratación tengan lugar de modo concertado¹⁵⁴, según se indica en el Esquema II.4:



Esquema II.4 Mecanismo de ataque concertado del CO_2 y el H_2O , con rotura inmediatamente posterior del enlace C2-C3.

Sin embargo, en este caso se requiere que el CO_2 y el H_2O ataquen al sustrato desde lados opuestos, con el CO_2 entrando desde el interior del centro activo para que los productos sean dos moléculas de 3-D-fosfoglicerato. Esto no es posible, ya que la molécula de CO_2 debe proceder del lado del centro activo que mira al exterior.

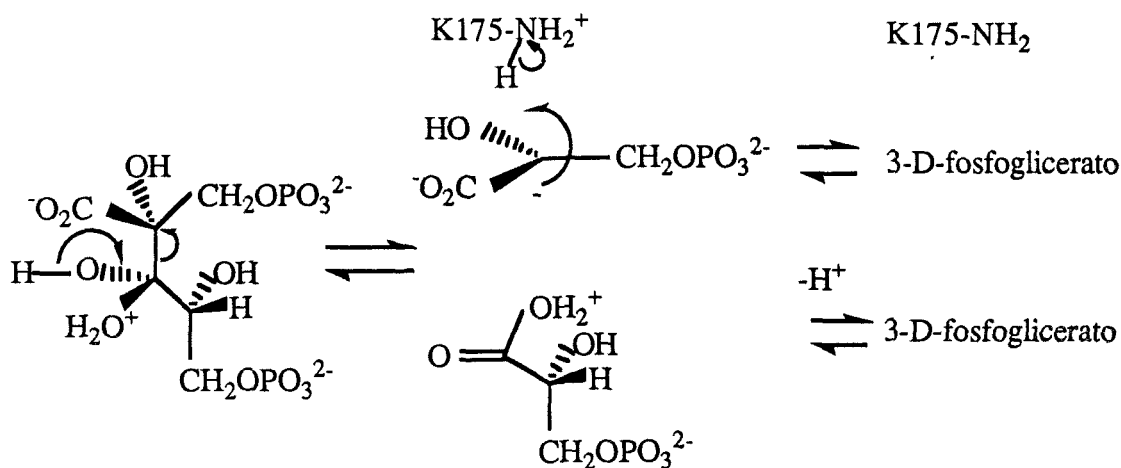
La segunda posibilidad es que la hidratación tenga lugar posteriormente, con la molécula de agua atacando al intermedio de seis carbonos. Este ataque podría producir un ciclo de cuatro miembros en el que la rotura del enlace C2-C3 sería simultánea a la del enlace O-H en el agua, o podría producirse en dos pasos, formándose primero un intermedio hidratado y rompiéndose con posterioridad el enlace C-C. La primera opción llevaría a la obtención de una mezcla racémica de 3-fosfoglicerato: el D se formaría de la parte baja de la molécula y el L de la parte alta, a no ser que el ciclo de cuatro se abra mucho y el átomo de hidrógeno que entra en C2 fuerce la inversión de la quiralidad de ese átomo de carbono (Esquema II.5).



Esquema II.5 Hidratación y rotura simultánea del enlace C2-C3, con obtención de una mezcla racémica de D- y L-fosfoglicerato.

La segunda opción llevaría a la formación de 3-D-fosfoglicerato (de la parte inferior del intermedio de seis carbonos) y un carbanión plano (de la parte superior). Este carbanión se protonaría estereoespecíficamente con posterioridad, captando un protón, por ejemplo, del resto K175 según han propuesto Knight *et*

at⁴⁰. Por su parte, el grupo hidroxilo protonado, $-\text{OH}_2^+$, cedería su protón extra, obteniéndose finalmente los productos (Esquema II.6). Esta posibilidad es la que mejor se adapta a los datos experimentales.



Esquema II.6 Hidratación y posterior rotura del enlace C-C, con protonación estereoespecífica del carbanión en C2 mediante la participación del resto K175 y formación de dos moléculas de 3-D-fosfoglicerato.

El Mg(II) del centro activo juega un papel crucial en el mecanismo de la reacción de carboxilación (y también en el de la oxigenación)^{40,67,109}. Por un lado, estabiliza el 2,3 enodiol mediante la coordinación de sus grupos hidroxilo. Los 2,3 enodios similares son inestables en disolución y experimentan eliminación β del grupo fosfato de C-1^{140,155}. Así mismo, el intermedio de seis carbonos obtenido tras el paso de carboxilación es estabilizado por coordinación de uno de los oxígenos del grupo carboxilo con Mg(II).

El grupo carboxilo de este intermedio también está estabilizado por interacción con el resto positivo K334, perteneciente al giro-C 6. De hecho, proteínas mutantes en las que se ha reemplazado la K334 por otros aminoácidos muestran una actividad como carboxilasas marcadamente inferior a la Rubisco natural¹⁵⁶. Así mismo, el aminoácido E60, que interacciona con la K334, ha sido

reemplazado por ácido aspártico, lo que reduce drásticamente la velocidad de la catálisis¹¹⁵.

II.2.4 OXIGENACIÓN

El estudio del mecanismo de la reacción de oxigenación catalizada por la Rubisco se ha limitado esencialmente al de aquellas etapas comunes con el proceso de carboxilación. Se ha establecido, sin embargo, mediante estudios experimentales con $^{18}\text{O}_2$, que uno de los átomos de la molécula de oxígeno queda incorporado en el grupo carboxilato del fosfoglicolato, mientras que el otro se pierde aparentemente en el medio¹⁵⁷. También ha quedado claro que, como en la carboxilación, el átomo de oxígeno del C2 del sustrato se mantiene durante el proceso catalítico¹⁵⁸ y que la rotura del enlace C2-C3 también se produce¹⁵⁸. Sin embargo, el número de estudios experimentales sobre este proceso es relativamente escaso⁸¹.

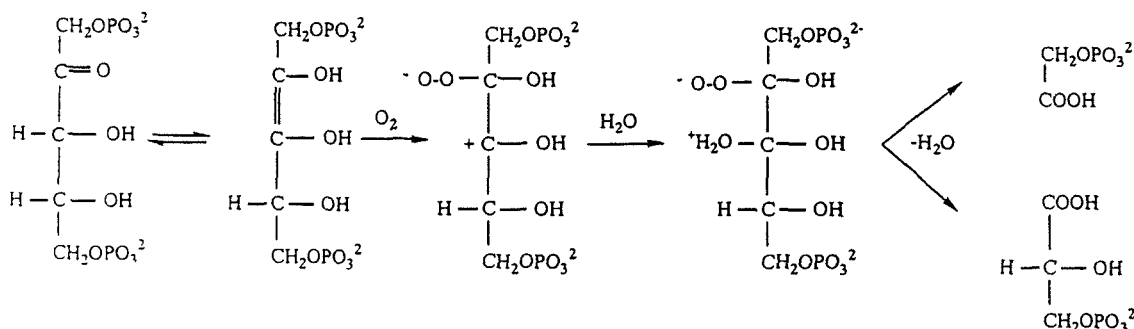
Para que la reacción de oxigenación tenga lugar debe producirse una inversión de spin: la formación de productos en estado electrónico singlete (el 3-D-fosfoglicerato) a partir de una mezcla de un reactivo singlete (la D-Ribulosa-1,5-bifosfato) y uno triplete (la molécula de oxígeno). Este tipo de reacciones están consideradas por lo general como prohibidas ya que los tiempos de vida de los complejos que se forman cuando los reactivos colisionan es usualmente demasiado corto para que tenga lugar la inversión de spin¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Así que los pares radicales resultantes de dichas colisiones o bien revierten hacia los reactivos o bien se disocian en especies radicales independientes.

Varias teorías trataban de dar una explicación racional a este problema. Por ejemplo, se ha postulado la formación de oxígeno molecular singlete en un proceso inverso a la adición¹⁶². También se ha propuesto que los pares radicales resultantes de la colisión entre una molécula singlete y una triplete estén estabilizados mediante efectos de jaula^{163,164} que ejercería el propio centro activo de la proteína, con lo cual el tiempo de vida de estas especies se alargaría lo suficiente como para dar tiempo a que se produzca la inversión de spin⁸¹. Una tercera posibilidad, planteada por nuestro grupo, es que la reacción se produzca entre el oxígeno triplete y el estado triplete del sustrato, cuya energía es cercana a

la del estado singlete dada la rotación a que está sometido el doble enlace C2-C3 en el enodiol. De esta forma quedaría explicada la bifuncionalidad de la Rubisco.

Posteriormente, en el estudio del proceso de oxigenación que detallaremos en el apartado VII.4, debe tenerse en cuenta que participan cuatro electrones desapareados que pueden dar lugar a una supermolécula (el ET) en estado electrónico singlete, triplete o quintuplete.

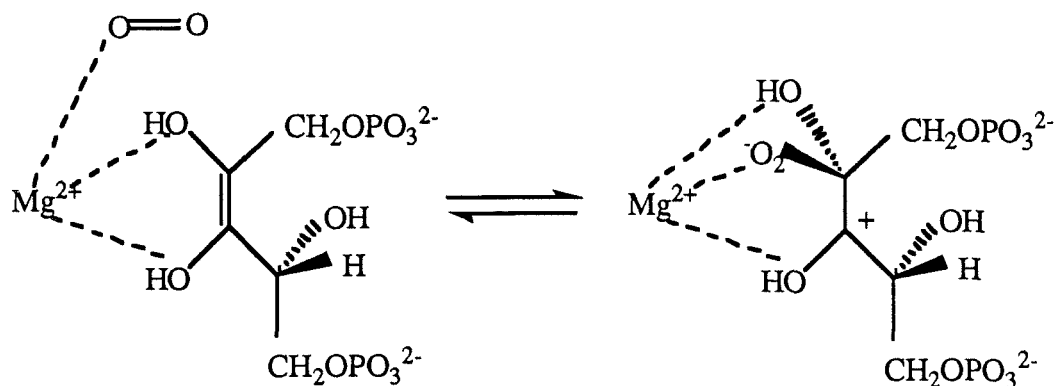
El mecanismo global de la oxigenación se plantea, por analogía con el de carboxilación y de acuerdo con los pocos hechos experimentales conocidos, como una serie de etapas. En el Esquema II.7 se muestra la secuencia propuesta para la reacción de oxigenación completa.



Esquema II.7 Mecanismo global del proceso catalítico de oxigenación

La formación del enodiol precede al ataque del oxígeno sobre el C2 para formar un hidropéroxido. El ataque del O₂ debe proceder del mismo lugar del que procede el ataque del CO₂ en el proceso de carboxilación. En el C3 puede quedar

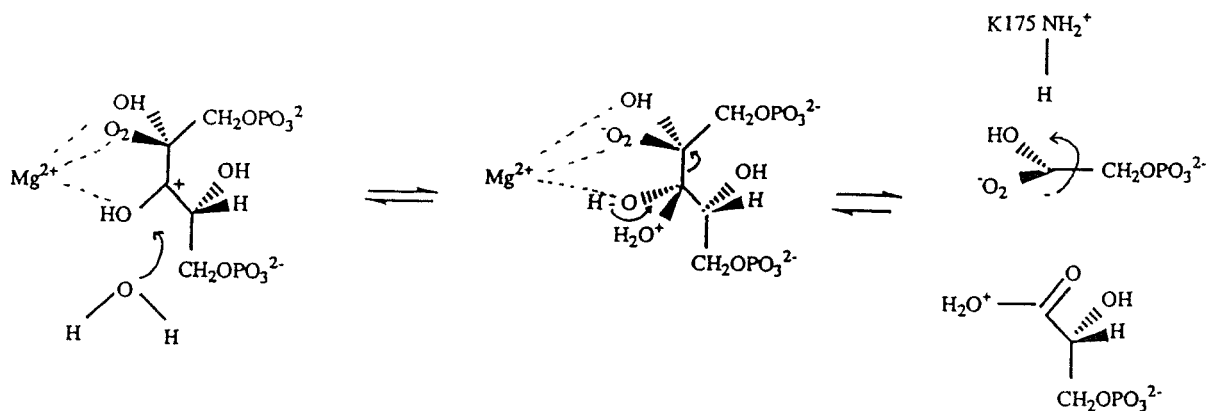
un carbocatión o, si se produce desprotonación del grupo hidroxilo de dicho carbono, un grupo carbonilo (Esquema II.8)



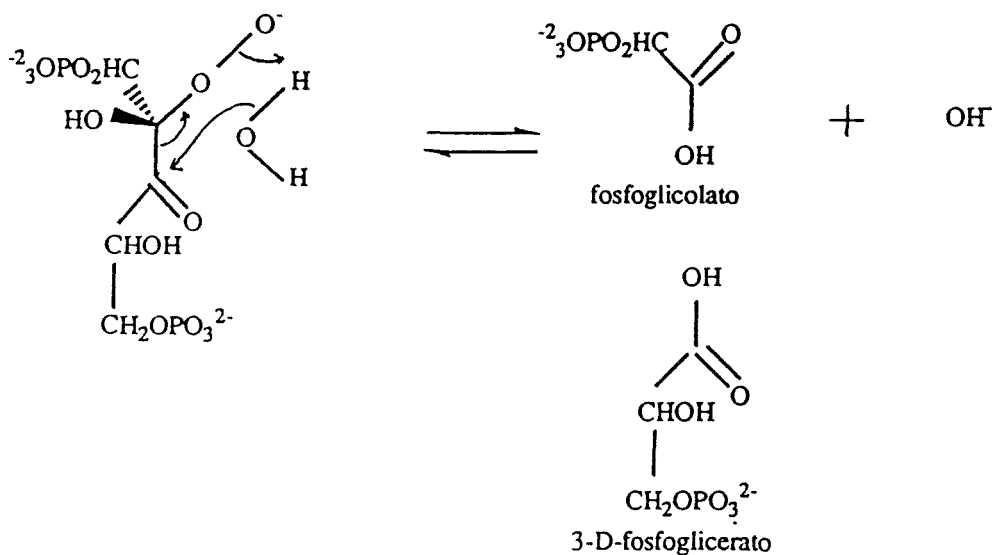
Esquema II.8 Estereoquímica del paso de oxigenación.

Posteriormente, una molécula de agua ataca sobre el C3 y se produce la rotura del enlace C2-C3, obteniéndose 3-D-fosfoglicerato de la parte baja del intermedio y un carbanión de la parte alta. Éste se protonaría captando un protón del resto K175, como en el mecanismo de carboxilación, para formar finalmente fosfoglicolato tras descomponerse el grupo peróxido y formarse un anión hidroxilo (Esquema II.9).

Otra alternativa sería un proceso de ataque del agua y rotura del enlace C-C en un proceso concertado en el que también se rompería el enlace O-O del grupo peróxido. En este caso no hay problemas de estereoquímica como en el proceso de carboxilación, dado que la conformación de la parte baja del intermedio, que da lugar al 3-D-fosfoglicerato, no se altera a lo largo del proceso, y de la parte alta se obtiene una molécula (el fosfoglicolato) sin carbonos quirales (Esquema II.10).



Esquema II.9 Hidratación y posterior rotura del enlace C-C con protonación mediante la participación del resto K175.



Esquema II.10 Proceso concertado de hidratación y rotura del enlace C-C, con rotura simultánea del enlace O-O del grupo peróxido.

Todos los mecanismos propuestos se adaptan a los escasos datos experimentales conocidos del proceso de oxigenación e intentan explicar cómo se produce, aunque algunos puntos del mismo permanecen sin aclarar. Pero tal vez la cuestión más intrigante sea por qué se produce la oxigenación, es decir, por qué ocurre la fotorrespiración. Algunos autores asignan a la fotorrespiración una función biológica¹⁶⁵, otros indican que la fotorrespiración es una consecuencia de la química que se desarrolla en el centro activo de la Rubisco¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. En cualquier caso, hasta que no estén claros todos los detalles del proceso catalítico de la oxigenación no se podrá resolver esta cuestión.

Precisamente intentar explicar de forma racional el porqué de la bifuncionalidad de la enzima va a ser el primer objetivo de la presente tesis. En el capítulo VII ofreceremos una explicación para este singular comportamiento de la Rubisco y para el mecanismo molecular de los procesos de enolización, pérdida de actividad de la Rubisco, carboxilación y oxigenación.

Referencias

- (1) Creighton, T. E. *Proteins. Structures and Molecular Properties*; Segunda ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 1993.
- (2) McFadden, B. A. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 394.
- (3) *Photosynthetic Carbon Assimilation*; Plenum: New York, 1978.
- (4) Tabita, F. R.; McFadden, B. A. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3459.
- (5) Schloss, J. V.; Phares, E. F.; Long, M. W.; Norton, I. L.; Stringer, C. D.; Hartman, F. C. *Bacteriol.* **1979**, *137*, 490.
- (6) Gibson, J. L.; Tabita, F. R. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 943.
- (7) Mizioroko, H. M.; Lorimer, G. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 507.
- (8) Akazawa, T.; Takabe, T.; Asami, S.; Kobayashi, S. In *Photosynthetic Carbon Assimilation*; H. W. Siegelman and G. Hind, Ed.; Plenum: New York, 1978; pp 209-225.
- (9) McIntosh, L.; Poulsen, C.; Bogorad, L. *Nature* **1980**, *288*, 556.
- (10) Zurawski, G.; Perrot, R.; Bottomley, W.; Whitfeld, P. R. *Nucleic Acids Res.* **1981**, 3251.
- (11) Shinozaki, K.; Sugiura, M. *Gene* **1982**, *20*, 91.
- (12) Dron, M.; Rahiv, M.; Rochaix, J. D. *J. Mol. Biol.* **1982**, *162*, 775.
- (13) Nargang, F.; McIntosh, L.; Somerville, C. *Mol. Gen. Genet.* **1984**, *193*, 220.
- (14) Yang, R. C. A.; Dove, M.; Seligy, V. L.; Lemieux, C.; Turmel, M.; Narang, S. A. *Gene* **1986**, *50*, 259.
- (15) Zurawski, G.; Whitfeld, P. R.; Bottomley, B. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 3975.
- (16) Aldrich, J.; Cherney, B.; Merlin, E.; Palmer, J. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 9534.
- (17) Aldrich, J.; Cherney, B.; Merlin, E.; Palmer, J. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 9535.
- (18) Wagner, S. J.; Stevens, J., S. E.; Nixon, B. T.; Lambert, D. H.; Quivey, J., R. G.; Tabita, F. R. *FEMS Microbiol. Letters* **1988**, *55*, 217.
- (19) Lehninger, A. L. *Bioquímica*; Segunda ed.; Ediciones Omega: Barcelona, 1983.

- (20) Hartman, F. C.; Norton, E. L.; Stringer, C. D.; Schloss, J. V. In *Photosynthetic Carbon Assimilation*; H. W. Siegelman and G. Hind, Ed.; Plenum: New York, 1978; pp 245-269.
- (21) Lorimer, G. H. *Biochemistry* **1981**, *20*, 1236.
- (22) Lorimer, G. H.; Mizioroko, H. M. *Biochemistry* **1980**, *19*, 5321.
- (23) Schneider, G.; Knight, S.; Andersson, I.; Brändén, C.-I.; Lindqvist, Y.; Lundqvist, T. *EMBO J.* **1990**, *9*, 2045.
- (24) Martin, P. G. *Aust. J. Plant Physiol.* **1979**, *6*, 401.
- (25) Matsuoka, M.; Kano-Murakami, Y.; Tanaka, Y.; Ozeki, Y.; Yamamoto, N. *J. Biochem.* **1987**, *102*, 673.
- (26) Mazur, B. J.; Chui, C.-F. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 2373.
- (27) Fluhr, R.; Moses, P.; Morelli, G.; Coruzzi, G.; Chua, N.-H. *EMBO J.* **1986**, *5*, 2063.
- (28) Turner, N. E.; Clark, W. G.; Tabor, G. J.; Hironaka, C. M.; Fraley, R. T.; Shah, D. M. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 3325.
- (29) Goldschmidt-Clermont, M.; Rahire, M. *J. Mol. Biol.* **1986**, *191*, 421.
- (30) Anderson, K.; Caton, J. *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 4547.
- (31) Andrews, T. J.; Abel, K. M. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 8445.
- (32) Andrews, T. J.; Ballment, B. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 7514.
- (33) Incharoensakdi, A.; Takabe, T.; Akazawa, T. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *237*, 445.
- (34) Incharoensakdi, A.; Takabe, T.; Akazawa, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 698.
- (35) Jordan, D. B.; Chollet, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *236*, 487.
- (36) Takabe, T.; Incharoensakdi, A.; Akazawa, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122*, 763.
- (37) Andrews, T. J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12213.
- (38) Andersson, I.; Knight, S.; Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Lundqvist, T.; Brändén, C.-I.; Lorimer, G. H. *Nature* **1989**, *337*, 229.
- (39) Chapman, M.; Suh, S. W.; Cascio, D.; Smith, W. W.; Eisenberg, D. *Nature* **1987**, *329*, 354.
- (40) Knight, S.; Andersson, I.; Brändén, C.-I. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 113.

- (41) Phillips, D. C.; Sternberg, M. J. E.; Thornton, J. M.; Wilson, I. A. *J. Mol. Biol.* **1978**, *119*, 329.
- (42) Lindqvist, Y.; Brändén, C.-I. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **1985**, *82*, 6855.
- (43) Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Lundqvist, T. *J. Mol. Biol.* **1990**, *211*, 989.
- (44) Knight, S.; Andersson, I.; Brändén, C.-I. *Science* **1989**, *244*, 702.
- (45) Miller, S.; Janin, J.; Lesk, A. M.; Chothia, C. *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 641.
- (46) Lesk, A. M.; Brändén, C.-I.; Chothia, C. *Proteins* **1989**, *5*, 139.
- (47) Baker, T. S.; Eisenberg, D.; Eiserling, F. A.; Weissman, L. *J. Mol. Biol.* **1975**, *91*, 391.
- (48) Baker, T. S.; Eisenberg, D.; Eiserling, F. A. *Science* **1977**, *196*, 293.
- (49) Choe, H.-W.; Jakob, R.; Hahn, U.; Pal, G. P. *J. Mol. Biol.* **1985**, *185*, 781.
- (50) Janson, C. A.; Smith, W. W.; Eisenberg, D.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 11594.
- (51) Schneider, G.; Brändén, C.-I.; Lorimer, G. H. *J. Mol. Biol.* **1984**, *175*, 99.
- (52) Schneider, G.; Brändén, C.-I.; Lorimer, G. *J. Mol. Biol.* **1986**, *187*, 141.
- (53) Baker, T. S.; Suh, S. W.; Eisenberg, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 1037.
- (54) Suh, S. W.; Cascio, D.; Chapman, M. S.; Eisenberg, D. *J. Mol. Biol.* **1987**, *197*, 363.
- (55) Andersson, I.; Brändén, C.-I. *J. Mol. Biol.* **1984**, *172*, 363.
- (56) Andersson, I.; Tjäder, A.-C.; Cedergren-Zeppezauer, E.; Brändén, C.-I. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14088.
- (57) Barcena, J. A.; Pickersgill, R. W.; Adams, M. J.; Phillips, D. C.; Whatley, F. R. *EMBO J.* **1983**, *2*, 2363.
- (58) Johal, S.; Bourque, D. P.; Smith, W. W.; Suh, S. W.; Eisenberg, D. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8873.

- (59) Bowien, B.; Mayer, F.; Spiess, E.; Pähler, A.; Englisch, U.; Saenger, W. *Eur. J. Biochem.* **1980**, *106*, 405.
- (60) Pal, G. P.; Jakob, R.; Hahn, U.; Bowien, B.; Sängner, W. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 10768.
- (61) Nakagawa, H.; Sugimoto, M.; Kai, Y.; Harada, S.; Miki, K.; Kasai, N.; Saeki, K.; Kakuno, T.; Horio, T. *J. Mol. Biol.* **1986**, *191*, 577.
- (62) Newman, J.; Gutteridge, S. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15154.
- (63) Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Brändén, C.-I.; Lorimer, G. *EMBO J.* **1986**, *5*, 3409.
- (64) Lundqvist, T.; Schneider, G. *J. Biol. Chem.* **1989**, *263*, 3643.
- (65) Lundqvist, T.; Schneider, G. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7078.
- (66) Lundqvist, T.; Schneider, G. *Biochemistry* **1991**, *30*, 904.
- (67) Lundqvist, T.; Schneider, G. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12604.
- (68) Chapman, M. S.; Suh, S. W.; Curmi, P. M. G.; Cascio, D.; Smith, W. W.; Eisenberg, D. S. *Science* **1988**, *241*, 71.
- (69) Curmi, P. M. G.; Cascio, D.; Sweet, R. M.; Eisenberg, D.; Schreuder, H. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16980.
- (70) Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Brändén, C.-I. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 119.
- (71) Herndon, C. S.; Norton, I. L.; Hartman, F. C. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1380.
- (72) Hartman, F. C.; Soper, T. S.; Niyogi, S. K.; Mural, R. J.; Foote, R. S.; Mitra, S.; Lee, E. H.; Machanoff, R.; Larimer, W. F. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3496.
- (73) Niyogi, S. K.; Foote, R. S.; Mural, R. J.; Larimer, F. W.; Mitra, S.; Soper, T. S.; Machanoff, R.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10087.
- (74) Pauling, L. *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
- (75) Pauling, L. *Nature* **1948**, *161*, 707.
- (76) Pauling, L. *Am. Sci.* **1948**, *36*, 51.
- (77) Lorimer, G. H. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 5599.
- (78) Mizioroko, H. M. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 270.

- (79) Lu, G.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. *PROTEINS : Structure, Function, and Genetics* **1992**, *12*, 117.
- (80) Lorimer, G. H.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Biochemistry* **1976**, *15*, 529.
- (81) Lorimer, G. H. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **1981**, *32*, 349.
- (82) Belknap, W. R.; Portis Jr., A. R. *Biochemistry* **1986**, *25*, 1864.
- (83) Miziorako, H. M.; Sealy, R. C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 479.
- (84) Styring, S.; Brändén, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *832*, 113.
- (85) Styring, S.; Brändén, R. *Biochemistry* **1985**, *24*, 6011.
- (86) Pierce, J.; Reddy, G. S. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *245*, 483.
- (87) Christeller, J. T. *Biochem. J.* **1981**, *193*, 839.
- (88) Christeller, J. T.; Laing, W. A. *Biochem. J.* **1978**, *173*, 467.
- (89) Nilsson, T.; Brändén, R.; Styring, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *788*, 274.
- (90) Robinson, P. D.; Martin, M. N.; Tabita, R. F. *Biochemistry* **1979**, *18*, 4453.
- (91) Brändén, R.; Nilsson, T.; Styring, S. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4373.
- (92) Brändén, R.; Nilsson, T.; Styring, S. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4378.
- (93) Weissbach, A.; Horecker, B. L.; Hurwitz, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *76*, 3611.
- (94) Wildner, G. F.; Henkel, J. *Planta* **1979**, *169*, 223.
- (95) Jordan, D. B.; Chollet, R. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 13752.
- (96) Jordan, D. B.; Chollet, R.; Ogren, W. L. *Biochemistry* **1983**, *22*, 3410.
- (97) McCurry, S. D.; Pierce, J.; Tolbert, N. E.; Orme-Johnson, W. H. *J. Biol. Chem.* **1981**, *249*, 6623.
- (98) Portis Jr., A. R.; Salvucci, M. E.; Ogren, W. L. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 967.
- (99) Salvucci, M. E.; Portis Jr., A. R.; Ogren, W. L. *Photosynth. Res.* **1986**, *7*, 193.
- (100) Sage, R. F.; Seemann, J. R. *Plant. Physiol.* **1993**, *102*, 21.
- (101) Robinson, S. P.; Portis Jr., A. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *268*, 93.
- (102) Streusand, V. J.; Portis Jr., A. R. *Plant. Physiol.* **1987**, *85*, 152.

- (103) Shen, J. B.; Ogren, W. L. *Plant Physiol.* **1992**, *99*, 1201.
- (104) Salvucci, M. E. *Physiol. Plant.* **1989**, *77*, 164.
- (105) Portis Jr., A. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1015*, 15.
- (106) Andrews, T. J.; Lorimer, G. H. In *The biochemistry of plants.*; M. D. Hatch and N. K. Boardman, Ed.; Academic Press, Inc.: New York, 1987; Vol. 10; pp 131-218.
- (107) Saver, B. G.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5398.
- (108) Fiedler, F.; Mullhofer, G.; Trebst, A.; Rose, I. A. *Eur. J. Biochem* **1967**, *1*, 395.
- (109) Lorimer, G. H.; Gutteridge, S.; Madden, M. W. In *Plant Molecular Biology*; D. v. Wettstein and N. H. Chua, Ed.; Plenum Press: New York, 1987; pp 21-31.
- (110) Hartman, F. C.; Milanez, S.; Lee, E. H. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13968.
- (111) Lorimer, G. H.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6468.
- (112) Tapia, O.; Andres, J. *Mol. Eng.* **1992**, *2*, 37.
- (113) Van Dyke, D. E.; Schloss, J. V. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5145.
- (114) Hartman, F. C.; Lee, E. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *246*, 11784.
- (115) Mural, R. J.; Soper, T. S.; Larimer, F. W.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6501.
- (116) Soper, T. S.; Larimer, F. W.; Mural, R. J.; Lee, E. H.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8452.
- (117) Andersson, I. comunicación personal.
- (118) Periana, R. A.; Motiu-DeGrood, R.; Chiang, Y.; Hupe, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3923.
- (119) Richards, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4926.
- (120) Tapia, O.; Andrés, J.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem.* **1994**, en prensa.
- (121) Seeman, J. R.; Berry, J. A.; Freas, S. M.; Krump, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 8024.
- (122) Bahr, J. T.; Jensen, R. G. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *185*, 39.
- (123) Machler, F.; Nosberger, J. *J. Exp. Bot.* **1980**, *31*, 1485.
- (124) Perchorowicz, J. T.; Raynes, D. A.; Jensen, R. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2985.

- (125) Taylor, S. E.; Terry, N. *Plant Physiol.* **1984**, *75*, 82.
- (126) Sharkey, T. D.; Seemann, J. R.; Berry, J. A. *Plant Physiol.* **1986**, *81*, 788.
- (127) Kobza, J.; Seeman, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3815.
- (128) Berry, J. A.; Lorimer, G. H.; Pierce, J.; Seeman, J. R.; Meek, J.; Freas, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 734.
- (129) Gutteridge, S.; Parry, M. A. J.; Burton, S.; Keys, A. J.; Mudd, A.; Feeney, J.; Servaites, J. C.; Pierce, J. *Nature* **1986**, *324*, 274.
- (130) Servaites, J. C. *Plant Physiol.* **1985**, *78*, 839.
- (131) Servaites, J. C.; Parry, M. A.; Gutteridge, S.; Keys, A. J. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 1161.
- (132) Vu, J. C. V.; Allen Jr., L. H.; Bowes, G. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 843.
- (133) Mott, K. A.; Berry, J. A. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 77.
- (134) Andrews, T. J.; Hatch, M. D. *Biochem. J.* **1969**, *114*, 117.
- (135) Laing, W. A.; Christeller, J. T. *Biochem. J.* **1976**, *159*, 563.
- (136) Robinson, S. P.; Portis Jr., A. R. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 968.
- (137) Sicher, R. C.; Hatch, A. L.; Stumpf, D. K.; Jensen, R. G. *Plant Physiol.* **1981**, *68*, 252.
- (138) Edmonson, D. L.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1390.
- (139) Yokota, A.; Kitaoka, S. *Plant Cell Physiol.* **1989**, *30*, 183.
- (140) Paech, C.; Pierce, J.; McCurry, S. D.; Tolbert, N. E. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1978**, *83*, 1084.
- (141) Edmonson, D. L.; Kane, H. J.; Andrews, T. J. *FEBS Letters* **1990**, *260*, 62.
- (142) Edmonson, D. L.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1376.
- (143) Edmonson, D. A.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1390.
- (144) Calvin, M. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1876.
- (145) Sue, J. M.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5404.
- (146) Sue, J. M.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5410.
- (147) Lorimer, G. H. *Eur. J. Biochem.* **1978**, *89*, 43.

- (148) Sue, J. M.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1978**, *17*, 4041.
- (149) Rabin, B. R.; Trown, P. W. *Nature* **1964**, *202*, 1290.
- (150) Schloss, J. V.; Lorimer, G. H. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4691.
- (151) Mullhofer, G.; Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1341.
- (152) Pierce, J.; Tolbert, N. E.; Barker, R. *Biochemistry* **1980**, *19*, 934.
- (153) Lorimer, G. H.; Gutteridge, S.; Reddy, G. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9873.
- (154) Cleland, W. W. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3194.
- (155) Jaworowski, A.; Hartman, F. C.; Rose, I. A. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 6783.
- (156) Soper, T. S.; Mural, R. J.; Larimer, F. W.; Lee, E. H.; Machanoff, R.; Hartman, F. C. *Protein Eng.* **1988**, *2*, 39.
- (157) Lorimer, G. H.; Andrews, T. J.; Tolbert, N. E. *Biochemistry* **1973**, *12*, 18.
- (158) Pierce, J.; Tolbert, N. E.; Barker, R. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 509.
- (159) Hamilton, G. A. In *Molecular mechanisms of oxygen activation*; O. Hayaishi, Ed.; Academic Press: New York, 1974; pp 405-451.
- (160) *Free Radicals*; John Wiley & Sons: New York, 1973.
- (161) Kosman, D. J. In *Bioorganic chemistry*; E. E. van Tamelen, Ed.; Academic Press: New York, 1978; Vol. 2; pp 175-195.
- (162) Adam, W.; Cueto, O.; Rebollo, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 75.
- (163) Koenig, T.; Fischer, H. In *Free radicals*; J. K. Kochi, Ed.; Wiley: New York, 1973; pp 157-190.
- (164) Nelson, S. F.; Bartlett, P. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 143.
- (165) Heber, U.; Krause, G. H. *Trends Biochem. Sci.* **1980**, *5*, 32.
- (166) Andrews, T. J.; Lorimer, G. H. *FEBS Letters* **1978**, *90*, 1.
- (167) Lorimer, G. H.; Andrews, T. J. *Nature* **1973**, *248*, 359.
- (168) Lorimer, G. H.; Andrews, T. J. In *The biochemistry of plants*; M. D. Hatch and N. K. Boardman, Ed.; Academic Press: New York, 1980; Vol. 8; pp 329-374.

III. SUPERFICIES DE ENERGÍA POTENCIAL Y ESTRUCTURAS DE TRANSICIÓN

III.1 EL CONCEPTO DE SUPERFICIE DE ENERGÍA POTENCIAL

En los últimos años se ha producido un incremento considerable en el número de aplicaciones basadas en el concepto de superficie de energía potencial (SEP) en diferentes campos de la química¹. La estabilidad y estructura de las moléculas, la isomería y análisis conformacional, la espectroscopía vibracional, la fotoquímica, la reactividad química, la cinética y la dinámica moleculares pueden estudiarse una vez se ha caracterizado la SEP².

El concepto de SEP es una consecuencia de la separación de los movimientos de los núcleos y de los electrones, propuesta en 1930 por Born y Oppenheimer³, basada en la gran diferencia de masas existente entre electrones y núcleos. Según esta aproximación es posible considerar el movimiento electrónico en un campo producido por núcleos estáticos.

Esta simplificación se cumple bien en un alto porcentaje de fenómenos químicos, aunque no puede aplicarse en aquellos casos en que la energía de los estados excitados se acerca a la del estado fundamental⁴. Esto se debe a que en la región en que se mezclan los estados electrónicos hay una fuerte interacción entre los movimientos de los electrones y los de los núcleos, dado que la diferencia energética entre ambos estados electrónicos es comparable a la energía vibracional. Desde el punto de vista cuántico, en esa región el operador de energía cinética de los núcleos no puede despreciarse y hay que resolver la ecuación de Schrödinger en su totalidad⁵.

Si estudiamos un sistema formado por un electrón que se mueve en una región del espacio bajo la influencia de un potencial V (creado por un núcleo, por ejemplo), su descripción requerirá calcular la energía del sistema para cada una de las configuraciones posibles. En principio, esto es un problema mecanocuántico que requiere resolver la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo para cada configuración⁶:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V \right\} \Psi(r, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} \quad (\text{III.1})$$

donde m es la masa del electrón y r el vector de posición respecto al núcleo en un instante t . Para la resolución de esta ecuación se deben aplicar las condiciones de contorno a la función de onda. Esta ecuación suele ser escrita en forma abreviada, como:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right\} \Psi(r, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(r, t)}{\partial t} \quad (\text{III.2})$$

donde se ha utilizado el operador gradiente, ∇ , que en coordenadas cartesianas es:

$$\nabla \equiv \frac{\partial}{\partial x} i + \frac{\partial}{\partial y} j + \frac{\partial}{\partial z} k \quad (\text{III.3})$$

Si el potencial es independiente del tiempo, puede usarse la técnica de separación de variables para expresar la ecuación (III.2) en una parte espacial y una parte temporal:

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right\} \psi(r) = E\psi(r) \quad (\text{III.4})$$

$$\psi(t) = \exp(-iEt / \hbar) \quad (\text{III.5})$$

donde hemos separado la función de onda $\Psi(r,t)$ según: $\Psi(r,t) = \psi(r)\psi(t)$.

La ecuación III.4 se conoce como ecuación de Schrödinger independiente del tiempo. La ecuación dependiente del tiempo se utiliza en casos como transiciones espectroscópicas, respuestas moleculares a campos eléctricos oscilantes de alta frecuencia o estudios de dispersión. Nosotros utilizaremos la ecuación independiente del tiempo, que puede escribirse como:

$$\hat{H}\psi(r) = E\psi(r) \quad (\text{III.6})$$

donde \hat{H} es el operador Hamiltoniano.

Para sistemas polielectrónicos (con potenciales independientes del tiempo) la ecuación III.6 se escribe:

$$\hat{H}(r,R)\psi(r,R) = E\psi(r,R) \quad (\text{III.7})$$

donde r y R representan colectivamente las coordenadas de todos los electrones y núcleos, respectivamente. Aplicando la aproximación de Born-Oppenheimer se separa la función de onda espacial en un producto de dos funciones de onda.

Una de ellas representa el movimiento electrónico y depende de las posiciones de los electrones; en ella el movimiento de los núcleos corresponde a un parámetro. La segunda es función de las posiciones de los núcleos. La función de onda electrónica se obtiene resolviendo:

$$\hat{H}_e(r, R)\psi_e(r, R) = E(R)\psi_e(r, R) \quad (\text{III.8})$$

donde \hat{H}_e es el Hamiltoniano electrónico para una configuración nuclear fija y por tanto no contiene ningún término correspondiente a la energía cinética del movimiento de los núcleos:

$$\hat{H}_e(r, R) = T(r) + V(r, R) \quad (\text{III.9})$$

En la ecuación III.9 $T(r)$ y $V(r, R)$ son los operadores de energía cinética electrónica y energía potencial total, respectivamente. La energía electrónica, $E(R)$, depende solamente de la configuración nuclear. En la ecuación III.8 se encuentra implícita la aproximación adiabática, según la cual el movimiento promedio de los electrones se adapta instantáneamente al movimiento nuclear, sin que se produzcan cambios en el estado electrónico.

La ecuación III.8 se resuelve mediante métodos aproximados, bien mediante el principio variacional o bien mediante la teoría de perturbaciones. Una vez calculada la energía electrónica $E(R)$ se obtiene el valor de la energía total según la ecuación III.10:

$$V(R) = E(R) + V_{nn}(R) \quad (\text{III.10})$$

donde $V_{nn}(R)$ es la energía potencial debida a las repulsiones nucleares. Si el cálculo se repite una y otra vez cambiando las posiciones de los núcleos se obtiene un mapa de energías potenciales $V(R)$, es decir, una superficie de energía potencial (SEP). De este modo, la SEP es una función únicamente de las posiciones de los núcleos. Variándolas podemos trasladarnos desde la geometría de los reactivos hasta la de los productos y obtener una descripción de la reacción química, que puede estudiarse sobre esta superficie^{4,7-9}.

Para obtener la SEP de un sistema químico debemos obtener su energía total (excepto la energía cinética nuclear que, como ya hemos dicho, no se tiene en cuenta según la aproximación de Born-Oppenheimer) en relación con la posición de todos los núcleos, que puede expresarse en función de las coordenadas generalizadas internas q : distancias de enlace o internucleares, ángulos y ángulos dihedros. En el caso de que el sistema contenga N núcleos, el número de coordenadas internas independientes o grados de libertad que determinan completamente la SEP es $3N-6$ ($3N-5$ para un sistema lineal):

$$E(q) = E(q_1, q_2, q_3, \dots, q_{3N-6}) \quad (\text{III.11})$$

En 1930, después de que la teoría cuántica hubiera sido propuesta, Eyring y Polany mostraron la conexión existente entre las superficies de energía y las reacciones químicas, lo cual hizo posible el estudio teórico de los mecanismos de reacción¹⁰. Utilizando la teoría de London^{11,12} construyeron teóricamente superficies de energía potencial para la reacción:



En ese sistema $N=3$, con lo cual $3N-6=3$ grados de libertad; como coordenadas pueden utilizarse las dos distancias interatómicas y el ángulo que forman los tres átomos. Una representación de la energía frente a esas coordenadas daría lugar a una representación tetradimensional. Para salvar el problema, utilizaron como variables las dos distancias interatómicas, asumiendo para el ángulo un valor constante de 180° . Con ello, obtuvieron una representación tridimensional que, puesto que una coordenada no había sido representada, era en realidad una abstracción de una hipersuperficie de energía mucho más compleja. Sin embargo, para un par de valores dados de las coordenadas utilizadas como variables al representar la SEP, existe un conjunto de valores de las otras variables que hacen mínimo el valor de la energía. Usualmente se asume que las representaciones de las SEP se han realizado de este modo y así los valores de las coordenadas no representadas son aquéllos que hacen mínima la energía.

El problema del cálculo y la representación de la SEP está, por tanto, superado. Sin embargo, la forma de la SEP va a depender de cuáles sean las coordenadas que escogamos como variables¹³, ya que podemos utilizar más de una combinación de distancias, ángulos o ángulos dihedros para representar una misma estructura. Aun así, la energía de la molécula para una determinada geometría debe ser la misma, independientemente de las coordenadas que empleemos para representar la SEP correspondiente.

Peltzer y Wigner¹⁴ mostraron la importancia de la existencia de un punto de silla en la SEP y obtuvieron una expresión matemática para la velocidad de la reacción química que expresaba el paso por dicho punto de silla. Ese punto de silla se llama Estructura de Transición o Estado de Transición (ET) si posee un vector asociado que describe las fluctuaciones reactivas de la interconversión química objeto de estudio. Tanto su geometría como el valor de la energía son también independientes de las coordenadas utilizadas para representar la SEP. Estos puntos de la SEP cuya geometría y energía no dependen de las coordenadas escogidas para representarla se llaman puntos estacionarios o puntos críticos y deben cumplir una serie de condiciones matemáticas. El siguiente apartado se dedica al estudio de estas estructuras.

III.2 PUNTOS CRÍTICOS Y CAMINOS DE REACCIÓN

La estructura de una molécula puede definirse completamente especificando el número y tipo de los átomos que la componen y las relaciones geométricas entre dichos átomos¹⁵. Si la molécula se encuentra en un estado totalmente relajado, es decir, su estructura es una estructura de equilibrio, entonces su geometría corresponde a un mínimo en la SEP y está localizada en el fondo de un valle. Cualquier movimiento desde ese punto de la SEP en cualquier dirección implicará un incremento en la energía del sistema.

En una SEP puede haber más de un mínimo local y cada uno de ellos representa una estructura en equilibrio. Diferentes conformaciones moleculares, distintos isómeros estructurales o reactivos, intermedios y productos de una reacción química ocupan estos puntos de mínima energía.

En una SEP los mínimos están separados por zonas de mayor energía: utilizando un lenguaje topográfico puede decirse que entre los valles se encuentran cordilleras, crestas o picos. Desde la cima de uno de estos picos, el movimiento en cualquier dirección implica una disminución de energía, con lo cual el punto es un máximo local. En general, los máximos locales de una SEP no tienen interés químico. Sin embargo, es posible encontrar un camino de mínima energía entre dos valles, de manera que evite los máximos locales. Este camino pasaría por el punto de menor energía de la cordillera que separa ambos valles y ese punto será un mínimo en todas las direcciones excepto en una: la que une los dos mínimos locales. Debido a su forma, ese punto se llama "punto de silla de montar" o "punto de ensilladura" (saddle point), y es un punto estacionario. En ese caso, el punto de silla puede representar un ET. Pueden existir puntos de silla que sean máximos en más de una dirección; en ese caso son puntos de silla de índice n , siendo n el número de direcciones en las cuales el punto es un máximo. Sólo los puntos de silla de índice uno pueden representar ET¹³.

Matemáticamente, los puntos estacionarios se caracterizan porque las primeras derivadas de la energía respecto a todas las variables independientes o coordenadas q_i son iguales a cero:

$$\text{grad } E \equiv \left(\frac{\partial E}{\partial q_1}, \frac{\partial E}{\partial q_2}, \frac{\partial E}{\partial q_3}, \dots, \frac{\partial E}{\partial q_{3N-6}} \right) = (0, 0, \dots, 0) \equiv 0 \quad (\text{III.12})$$

La ecuación III.12 permite obtener el vector gradiente de la SEP en el punto considerado. Este vector puede interpretarse como la fuerza (cambiada de signo) que actúa sobre la configuración nuclear representada por las coordenadas q_i . Esto significa que, en un punto crítico, la fuerza que actúa sobre la configuración nuclear es igual a cero y el punto es, efectivamente, estacionario (se encuentra en equilibrio)².

Para caracterizar la naturaleza de cada punto crítico y establecer el papel que juega en la SEP es necesario conocer su curvatura. Con ese fin se calculan las segundas derivadas de la energía con respecto a todas las coordenadas. El conjunto de todas las segundas derivadas constituye una matriz cuadrada de $3N-6$ dimensiones, denominada matriz de constantes de fuerza o Hessiana⁴:

$$H = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 E}{\partial q_1^2} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_2} & \dots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_1 \partial q_{3N-6}} \\ \frac{\partial^2 E}{\partial q_2 \partial q_1} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_2^2} & \dots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_2 \partial q_{3N-6}} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \frac{\partial^2 E}{\partial q_{3N-6} \partial q_1} & \frac{\partial^2 E}{\partial q_{3N-6} \partial q_2} & \dots & \frac{\partial^2 E}{\partial q_{3N-6}^2} \end{pmatrix} \quad (\text{III.13})$$

Diagonalizando esta matriz se obtiene la matriz de constantes de fuerza diagonal y resolviendo la ecuación de valores propios III.14 las combinaciones posibles de los valores propios y vectores propios que son utilizadas para caracterizar los puntos críticos¹⁶:

$$F u_i = k_i u_i \quad (\text{III.14})$$

donde F es la matriz H diagonalizada, u_i son los vectores propios que representan los ejes principales de curvatura y k_i los valores propios que representan las curvaturas principales de la SEP a lo largo de los ejes principales de curvatura.

Los puntos críticos en la SEP que tengan al menos un valor propio igual a cero se denominan puntos críticos degenerados. El grado de degeneración de un punto crítico está determinado por el número de valores propios de la matriz F que son iguales a cero.

Si todos los valores propios son positivos, entonces el punto es un mínimo y corresponde a una estructura estable: reactivos, productos o intermedios de una reacción. Puesto que los valores propios representan las constantes de fuerza de las vibraciones normales del sistema, el hecho de que todas sean positivas implica que cualquier movimiento desde el punto considerado supone un aumento en la energía del sistema y eso caracteriza precisamente a un mínimo.

Si hay valores propios positivos y negativos (pero ninguno es cero), entonces el punto es un punto de silla de índice n , siendo n el número de valores propios negativos^{17,18}. Si sólo hay un valor propio negativo, entonces el punto de silla es de índice uno y puede representar una ET. El único valor negativo de las constantes de fuerza corresponde a la frecuencia imaginaria de la vibración normal del sistema y el vector propio asociado a dicho valor propio negativo, llamado vector de transición (VT)¹⁹, determina la dirección y simetría del camino de reacción en el punto de más alta energía del paso a través de la región del ET.

Si todos los valores propios son negativos el punto corresponde a un máximo en la SEP. En la Figura III.1 se representan puntos críticos en SEP descritas por dos coordenadas q_1 y q_2 .

La diferencia de energía entre el reactivo y el ET es la energía de activación, aunque en el cálculo deben incluirse efectos cuánticos como la energía de vibración del nivel cero²⁰ tanto en el reactivo como en el ET y el efecto túnel^{21,22}.

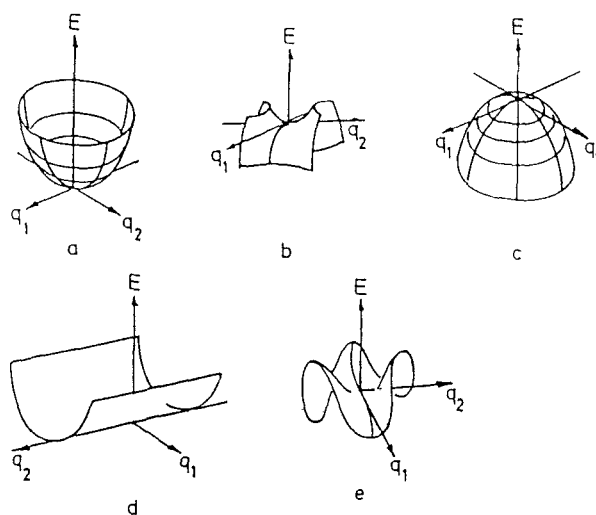


Figura III.1 Puntos críticos no degenerados (a-c) y degenerados (d,e) en una SEP tridimensional. La figura a representa un mínimo con las dos derivadas segundas diagonales positivas; b es un punto de silla de índice uno, con la segunda derivada de E respecto a q_1^2 negativa y la segunda derivada de E respecto a q_2^2 positiva; c es un máximo con ambas constantes de fuerza negativas; d es un punto crítico degenerado con la segunda derivada de E respecto a q_2 dos veces igual a cero y la otra constante de fuerza positiva; e es otro punto crítico degenerado con ambas constantes de fuerza iguales a cero. Fuente: Minkin *et al*⁴.

Aunque en los trabajos de Eyring y Polanyi se introdujo el concepto de camino de reacción¹⁰ asociándolo a la línea de mínima energía que une reactivos con productos pasando por el ET^{10,23-31}, su naturaleza sigue siendo ambigua y discutida³²⁻³⁵. Desde un punto de vista físico, el camino de reacción puede calcularse partiendo del ET y siguiendo sobre la SEP el camino de relajación de mayor pendiente hacia reactivos y productos^{19,29-31,33,36-38}. Sin embargo, dado que la forma de la SEP depende de la coordenadas elegidas para representarla, resulta obvio que el camino de reacción no será único¹³.

Matemáticamente, el camino de reacción definido como una línea de gradiente que parte del ET se obtiene de la ecuación:

$$\frac{dq_i}{ds} = N^{-1/2} \frac{\partial E}{\partial q_i} \quad (\text{III.15})$$

donde s es una longitud de arco de la curva del camino de reacción y N es el cuadrado de la norma del gradiente:

$$N = \sum_i \left(\frac{\partial E}{\partial q_i} \right)^2 \quad (\text{III.16})$$

En la ecuación III.15 las condiciones iniciales serán $q_{i0} = q_i^{\text{ET}}$. La ecuación III.12 es tensorial, y de ahí surge la invariancia de los puntos estacionarios³⁹. En cambio, la ecuación III.15 no lo es, dado que los miembros de la izquierda y la derecha no siguen las mismas leyes de transformación. Es por ello que el camino de reacción no es invariante. Para solucionar este problema se definió un camino de reacción intrínseco (IRC) que no depende del sistema de coordenadas elegido^{31,37} y es el más extensamente utilizado en la bibliografía actual. Por esta razón lo explicaremos más detalladamente.

El IRC sería el camino trazado por una partícula a la que se deja bajar lentamente desde el ET hacia reactivos y productos, de manera que en cuanto la partícula adquiere una velocidad mayor que infinitesimal es frenada y de nuevo se la deja continuar.

Matemáticamente el camino de reacción invariante se obtiene de la ecuación:

$$\frac{dq_i}{ds} = N^{-1/2} g_{ij} \frac{\partial E}{\partial q_j} \quad (\text{III.17})$$

en la que ahora

$$N = \sum_j g_{ij} \left(\frac{\partial E}{\partial q_i} \right) \left(\frac{\partial E}{\partial q_j} \right) \quad (\text{III.18})$$

y

$$g_{ij} = \sum_k \left(\frac{\partial q_i}{\partial x_k} \right) \left(\frac{\partial q_j}{\partial x_k} \right) \quad (\text{III.19})$$

siendo x_k un sistema de coordenadas cartesianas arbitrario. La ecuación III.17, introducida por Fukui *et al*⁴⁰, es tensorial y proporciona el IRC. Mediante su uso se han determinado caminos de reacción en diversas reacciones químicas^{37,41,42}.

El IRC es por definición un "camino estático" (lo cual es una contradicción) y se calcula mediante las ecuaciones clásicas del movimiento que pueden utilizarse en cualquier sistema de coordenadas y proporcionan trayectorias independientes de dicho sistema. Por tanto, el IRC es único. Debe calcularse utilizando coordenadas cartesianas ponderadas en peso. Únicamente en este sistema de coordenadas el camino de reacción de mayor pendiente coincide con el IRC.

Debe quedar claro, sin embargo, que el IRC es una aproximación, ya que las moléculas reales no tienen energía cinética infinitesimal y, por tanto, no siguen el IRC¹³. Aun así, el IRC proporciona una descripción conveniente del progreso de una reacción y juega un papel central en los cálculos de velocidades de reacción utilizando o bien la teoría variacional del estado de transición desarrollada por Truhlar y Garrett⁴³ o la teoría propuesta por Miller *et al*⁴⁴. Además permite conectar inequívocamente un punto de silla que represente un ET con los reactivos y productos asociados a él. Estos puntos críticos son invariantes y, por tanto, su localización y caracterización es el objetivo primordial cuando se estudia el mecanismo de una reacción química⁴⁵. En cambio, no debe sobrestimarse la importancia del cálculo del camino de reacción, dada su naturaleza ambigua³⁹.

Las estructuras que corresponden a mínimos en la SEP representan formas moleculares estables y, por lo tanto, estas estructuras pueden ser caracterizadas experimentalmente. Para verificar que una estructura ocupa un mínimo en la SEP debe comprobarse que en dicha estructura se cumple la ecuación III.12 (es decir, es un punto crítico) y que todos los valores propios obtenidos de la ecuación III.14 son positivos. Hay numerosos métodos que

permiten localizar los mínimos en una SEP⁴⁶⁻⁵¹. Algunos están basados sólo en el cálculo de la energía, otros requieren el cálculo del gradiente.

Los métodos que sólo calculan la energía tienen muchas aplicaciones, pero son los más lentos en alcanzar la convergencia. La aproximación más sencilla, llamada método de las iteraciones axiales o método de búsqueda secuencial de una variante¹³, consiste en ir cambiando el valor de una coordenada cada vez y hacer un ciclo de cálculos sobre las otras coordenadas. Eventualmente, mediante una serie de ciclos más o menos larga, se localiza el mínimo local en la SEP.

Un segundo método es una variante del algoritmo de Fletcher-Powell⁵². El método está basado en el empleo del gradiente, pero puede usarse calculando sólo la energía y estimando numéricamente el valor de las derivadas de la energía^{53,54}. Consiste en calcular la energía en la geometría de partida así como en los puntos que resultan de variaciones positivas y negativas de cada una de las coordenadas; con ello se obtiene la dirección de la diagonal que llevará al mínimo. Con esa diagonal se encuentra el mínimo de la SEP y se detiene el cálculo cuando, en el punto calculado, el cambio que se prevé en los valores de las coordenadas para realizar un segundo paso es suficientemente pequeño. Este método requiere generalmente menos pasos de cálculo y se obtiene una mayor convergencia; aun así el número de pasos requerido es proporcional a N^2 , siendo N el número de coordenadas¹³.

En el presente trabajo hemos utilizado métodos que requieren el cálculo del gradiente y que son, en general, más eficientes, aunque para aplicarlos es necesario que puedan calcularse analíticamente las derivadas de la energía. Algunos de los algoritmos que requieren el cálculo del gradiente son el del gradiente conjugado⁵⁵, el de Fletcher-Powell⁵², el de Davidon-Fletcher-Powell⁵⁶, el de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno⁵⁷⁻⁶⁰, el óptimamente condicionado⁶¹ o el de Murtaugh-Sargent⁶². Todos los métodos que calculan el gradiente comienzan con una estimación de las segundas derivadas de la SEP y van mejorando la estimación. Difieren unos de otros en las fórmulas utilizadas para obtener la Hessiana. Los métodos se componen de varios pasos: se calcula el gradiente en el punto de partida, en el cual se realiza una estimación de la

Hessiana y se calcula la energía; a partir de este punto inicial se obtiene el segundo punto utilizando la ecuación III.20:

$$\Delta q = -\left(\frac{\partial^2 E}{\partial q^2}\right)^{-1} \frac{\partial E}{\partial q} = -H^{-1} \text{grad } E \quad (\text{III.20})$$

donde H es la Hessiana estimada para el primer punto y $\text{grad } E$ es el gradiente calculado para el primer punto. Una vez obtenido el punto 2, se calcula allí el gradiente y se realiza una nueva estimación de la Hessiana; el punto 3 se calcula de igual modo a partir del punto 2. Se detiene el cálculo cuando el gradiente y el cambio predicho en las coordenadas son suficientemente pequeños. Estos métodos tienen la ventaja de que alcanzan el mínimo, sea cual sea la geometría de partida, aunque se gana mucho tiempo si se parte de una geometría cercana. En la Figura III.2 se representan los pasos seguidos sobre una SEP buscando un mínimo mediante métodos que calculan el gradiente.

Debe hacerse notar que si la molécula tiene un cierto grado de simetría, el gradiente pertenece a la representación totalmente simétrica de la molécula, así que los métodos basados en el gradiente son incapaces de romper la simetría y el punto encontrado puede no ser un mínimo real. En estos casos puede ser necesario distorsionar la molécula reduciendo la simetría para localizar el mínimo real¹.

Dedicaremos el siguiente apartado a la descripción de las propiedades de la ET, así como a los métodos utilizados para localizarla en una SEP.

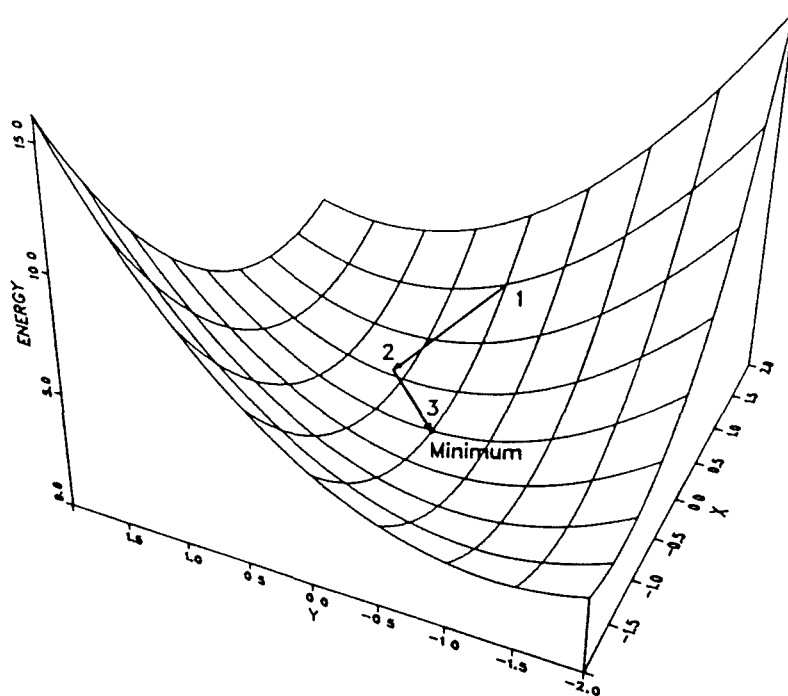


Figura III.2 Representación de etapas empleadas para buscar el mínimo en una SEP mediante métodos que calculan el gradiente. Fuente: Shaik *et al*¹³

III.3 ESTRUCTURA DE TRANSICIÓN

Como hemos indicado, el punto de menor energía que permite el paso desde los reactivos a los productos se denomina estado de transición o estructura de transición (ET). La determinación de un ET sobre la SEP que representa un sistema reactivo permite calcular los parámetros cinéticos de la reacción, mediante el uso de la teoría de las velocidades de reacción absolutas o del estado de transición. Además, la geometría de la estructura de transición predetermina la estereoquímica de los mínimos relacionados con el ET y la curvatura de la SEP en la región del ET determina la magnitud de los efectos isotópicos⁴.

Para que un punto de la SEP sea un ET, debe cumplir las siguientes condiciones³⁰:

- a) Debe ser un punto crítico, esto es, debe satisfacerse la ecuación III.12.
- b) La matriz de constantes de fuerza en ese punto debe tener un solo valor propio negativo, de acuerdo con el teorema de Murrell-Laidler²⁹.
- c) Debe ser el punto de mayor energía a lo largo del camino de mínima energía que une reactivos con productos.
- d) Debe ser el punto de menor energía que satisface las tres primeras condiciones.

III.3.1 PROPIEDADES DE LA ESTRUCTURA DE TRANSICIÓN

Excepto para SEP relativamente simples, usualmente es necesario verificar que el punto estacionario encontrado es realmente un punto de silla de índice uno (o de primer orden) y no un mínimo o un máximo local. Para ello es necesario calcular la matriz de segundas derivadas, diagonalizarla y calcular las frecuencias vibracionales asociadas a la estructura encontrada.

En mecánica cuántica el tratamiento de las vibraciones^{63,64} se restringe usualmente a la aproximación del oscilador armónico, según la cual la fuerza sobre cada núcleo es proporcional a su desplazamiento. Entonces se puede

considerar que la energía potencial es cuadrática y la ecuación del movimiento nuclear tiene una solución exacta.

Si consideramos que cada núcleo oscila el problema es un problema de osciladores acoplados. Es posible demostrar la existencia de una clase de movimiento de oscilación en la cual todas las coordenadas oscilan sinusoidalmente con una frecuencia común⁶⁵.

Los modos normales de vibración de una molécula son una representación aproximada del movimiento colectivo de los átomos en la molécula y corresponden a combinaciones lineales de desplazamientos atómicos que son independientes entre sí para un potencial cuadrático⁶⁶. Una molécula posee $3N-6$ modos normales de vibración ($3N-5$ si es lineal), siendo N el número de átomos. El conjunto de modos normales de una molécula forma un juego de coordenadas colectivas independientes, conocidas como coordenadas normales, utilizadas generalmente en la caracterización de puntos estacionarios⁶⁷.

Los modos normales se utilizan en el análisis de vibraciones moleculares y niveles de energía, en el cálculo de la función de partición vibracional y el de la energía del punto cero⁶⁸. Son particularmente importantes en el análisis de los caminos de reacción^{43,44} y en la obtención de efectos isotópicos⁶⁹.

Para calcular los modos normales puede utilizarse el formalismo de Lagrange. Se ha encontrado que la energía potencial se expresa mejor en términos de las coordenadas internas de valencia⁷⁰, mientras que para la energía cinética es mejor emplear las coordenadas cartesianas. A fin de obtener una representación común, Wilson *et al*⁶³ construyeron una transformación lineal mediante un conjunto de vectores y obtuvieron coordenadas de desplazamiento interno de valencia. La transformación entre coordenadas cartesianas e internas se representa por la matriz B o matriz de transformación, y se expresa según la ecuación:

$$R = BX \quad (\text{III.21})$$

donde R es la matriz de coordenadas internas y X la de coordenadas cartesianas. La matriz de transformación B se construye generalmente a partir de los vectores de Wilson⁶³ o modificaciones de dichos vectores⁷¹.

Es posible definir una matriz que contenga los cambios geométricos y también las masas atómicas, G , de manera que dependa de la masa y relacione las $3N-6$ coordenadas generalizadas internas con las $3N$ coordenadas cartesianas necesarias para describir el sistema molecular en un marco de referencia. G^{-1} sería la matriz de energía cinética. La definición de G puede expresarse según:

$$G = B^T M B \quad (\text{III.22})$$

donde B^T es la matriz de transformación traspuesta y M es una matriz diagonal, con elementos $\delta_{ij} M_i$ iguales a $\delta_{ij} 1/m_i$. Se pueden calcular entonces las frecuencias vibracionales conociendo la matriz de constantes de fuerza o Hessiana (H), la geometría de la molécula y las masas de los átomos, resolviendo la ecuación en valores propios de Wilson^{63,72,73}:

$$\det(HG - \epsilon I) = 0 \quad (\text{III.23})$$

donde I es la matriz unidad y HG la matriz de Wilson. Los valores propios ϵ están relacionados con las frecuencias vibracionales según la ecuación (III.24).

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\epsilon} \quad (\text{III.24})$$

Las coordenadas normales de vibración son aquellas coordenadas para las cuales la ecuación III.23 puede resolverse. Si se utilizan coordenadas ponderadas en peso, las coordenadas normales son los vectores propios de la Hessiana⁷¹.

El problema vibracional puede expresarse en términos de coordenadas internas, cartesianas o ponderadas en peso. Las matrices H y G dependerán del sistema de coordenadas escogido, pero las frecuencias vibracionales y las distorsiones geométricas descritas por las coordenadas normales son independientes de dicha elección¹³. Utilizaremos estos conceptos en el presente trabajo, como veremos en el capítulo VII.

En un punto de silla de primer orden, un valor propio de la matriz de segundas derivadas es negativo y la energía es máxima en una única dirección. Puesto que las frecuencias vibracionales son proporcionales a las raíces cuadradas de los valores propios de la matriz de constantes de fuerza (si empleamos coordenadas ponderadas en peso), entonces ese valor propio negativo llevará a la obtención de una frecuencia imaginaria. El vector propio asociado al valor propio negativo (es decir, el modo normal asociado a la frecuencia imaginaria) representa la dirección en la cual la SEP es un máximo y corresponde al vector de transición (VT). El VT también indica el camino que conduce desde el punto de silla hacia reactivos y productos.

Por tanto, para que una estructura pueda ser considerada como un ET debe tener una única frecuencia imaginaria de vibración. Si un punto en la SEP tiene dos frecuencias imaginarias, puede obtenerse un punto de silla de primer orden mediante una distorsión de la estructura seguida de una reoptimización de la geometría¹³. Esto corresponde al teorema de Murrell-Laidler²⁹.

En aquellos casos en los que las ET esperadas puedan retener ciertos elementos de simetría de los reactivos y los productos, los argumentos de la teoría de grupos de simetría pueden ayudar a formular reglas de selección de las ET^{19,74}. Estas reglas permiten descartar ciertas estructuras sin necesidad siquiera de calcular la matriz de segundas derivadas. El concepto clave para la formulación de estas reglas es el concepto de VT.

Como ya se ha indicado, el VT es el vector propio al que corresponde un único valor propio negativo en la ecuación III.14. Sin embargo, dado que las coordenadas generalizadas usadas para describir la SEP no son necesariamente ortogonales, el VT no corresponde a un vector de reacción con sentido físico y no es independiente del sistema de coordenadas elegido. Para obtener un vector de reacción independiente del sistema de coordenadas es necesario, de una manera similar a la usada en la teoría de vibraciones moleculares, diagonalizar la matriz de Wilson HG. Los ejes de curvatura y las curvaturas derivadas de HG tienen entonces un sentido físico, ya que representan los modos normales de vibración y sus correspondientes frecuencias, respectivamente. El vector propio obtenido en este caso puede ser designado como vector de reacción, dado que indica la dirección del movimiento mecánico clásico en el ET.

El VT puede ser considerado entonces como una porción corta y finita de la parte del camino de reacción que empieza en el ET. Un desplazamiento del sistema en la dirección definida por el VT disminuye su energía potencial⁴.

El VT comprende necesariamente todos los elementos de simetría de la configuración nuclear del ET, es decir, corresponde a una de las representaciones irreducibles del grupo puntual de simetría de éste.

Stanton y McIver¹⁹ formularon los siguientes teoremas tratando de regular las reglas de selección de los ET energéticamente más bajos de las reacciones químicas mediante propiedades de simetría de los VT correspondientes:

a) El VT no puede pertenecer a una representación degenerada del grupo puntual de simetría del ET.

b) El VT es asimétrico respecto a las operaciones de simetría del ET que transforman reactivos en productos.

c) El VT es simétrico respecto a las operaciones de simetría que no transforman reactivos en productos.

El uso de estas propiedades del VT permite seleccionar diversas estructuras posibles y descartar otras como ET de una reacción dada. Para ello, es necesario examinar los efectos de cada operación del grupo puntual de simetría del ET. Las estructuras que no cumplan los teoremas anteriores pueden ser descartadas.

El teorema a) es simplemente una reformulación del teorema de Murrell-Laidler²⁹ e implica que una SEP no puede tener más de una curvatura negativa en el punto del ET. El corolario más importante del teorema b) es que ninguna estructura puede representar un ET si la rotación alrededor de un eje de orden tres o superior impar transforma reactivos en productos.

Otras restricciones impuestas por la simetría hacen referencia al camino de reacción, definido como el descenso energético más pronunciado desde el ET hacia reactivos o productos (camino de mínima energía). A lo largo de todo ese camino entre los puntos críticos la simetría de la configuración nuclear debe mantenerse sin cambios^{36,37,75,76}. Las configuraciones instantáneas nucleares que aparecen a medida que la reacción avanza no pueden adquirir nuevos elementos de simetría, ya que su simetría no puede ser más alta que la de los

puntos estacionarios de los estados inicial y final. Por ello, si las configuraciones de reactivos y productos no están relacionadas por simetría, la simetría de la estructura nuclear del ET debe pertenecer a un subgrupo común de los grupos de simetría de las configuraciones de reactivos y productos². Este principio implica cinco útiles corolarios que suplementan las demandas acerca de las propiedades simétricas del ET:

a) Los ET lineales están necesariamente relacionados con estructuras lineales de reactivos y productos.

b) Los ET planos están necesariamente relacionados con estructuras planas de reactivos y productos.

c) Los ET aquirales no pueden llevar a reactivos y productos ópticamente activos.

d) Si el único elemento de simetría común de los grupos puntuales a los que pertenecen reactivos y productos es el elemento identidad, entonces el ET no tiene ninguna clase de simetría.

e) Si la distorsión de la configuración del ET a lo largo del camino de mínima energía destruye algún elemento de simetría, entonces las configuraciones de reactivos y productos son o bien idénticas o bien enantioméricas.

Es importante, sin embargo, hacer notar que estas reglas sólo son válidas cuando el camino de mínima energía es una línea continua sin puntos de bifurcación y cuando todos los puntos críticos que son parte de dicha línea son no degenerados^{77,78}. En la bibliografía se ha analizado la importancia de los puntos de bifurcación (con valores propios iguales a cero) en los caminos de reacción^{77,79-83}, así como el papel que juegan los puntos de silla de índice 2 en la reactividad química¹⁸.

III.3.2 LOCALIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE TRANSICIÓN

La búsqueda de los ET en una SEP es un problema más complejo que la determinación de los mínimos. Para resolverlo se han desarrollado numerosos métodos y algoritmos^{41,54,84-92}.

Conceptualmente, la aproximación más simple para localizar ET es encontrar una expresión analítica que permita el cálculo de la energía. Sin embargo, no hay una expresión universal que permita el mencionado cálculo; hace falta un elevado número de cálculos de la energía (y del gradiente) para obtener un ajuste aceptable de la superficie modelo y, además, la SEP encontrada puede no ser bastante aproximada en la región de la barrera energética como para proporcionar una estimación aceptable de la geometría del ET^{93,94}.

Otro método utilizado para buscar ET, el tránsito sincrónico lineal (LST)⁹⁵, implica ciertas simplificaciones relativas a la superficie: se asume que el camino de reacción es una línea recta que conecta reactivos con productos. Bajo esa suposición, el ET es la estructura de máxima energía a lo largo de esa línea recta. Como puede verse en la Figura III.3, el ET que se localiza mediante este método tiene siempre una energía mayor que la del ET real, a no ser que accidentalmente o por causa de la simetría sea cierto que el camino de reacción es recto, en cuyo caso el ET localizado coincide con el real. Para mejorar la estimación del ET se puede minimizar la energía respecto a todas las coordenadas perpendiculares a la línea recta que se ha supuesto como camino de reacción, con lo cual se obtiene una estructura de menor energía que el ET real (punto 2 en la Figura III.3). Entonces se traza la línea curva que une reactivos, el punto 2 y productos y se calcula su máximo (punto 3), que será una estructura más cercana al ET. Esta modificación del LST se conoce como tránsito sincrónico cuadrático (QST)⁹⁵. Si es necesario, el proceso puede repetirse varias veces.

Una ventaja de los métodos LST y QST es que requieren únicamente cálculos de la energía y pueden emplearse incluso cuando no es posible calcular el gradiente. Sin embargo, si el camino de reacción es muy curvado, el LST no

proporciona una buena estimación inicial de la ET y la corrección mediante el QST puede no llevar a una ET realista. Este problema puede resolverse iniciando los cálculos en estructuras cercanas al ET. Se han desarrollado diversos algoritmos que alternan la maximización sobre un camino de reacción predeterminado con la minimización en perpendicular⁹⁶⁻⁹⁹.

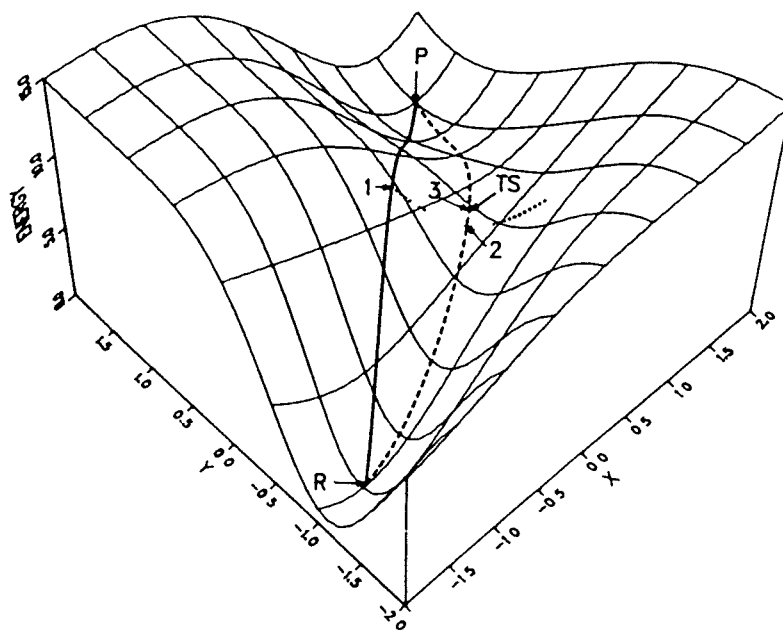
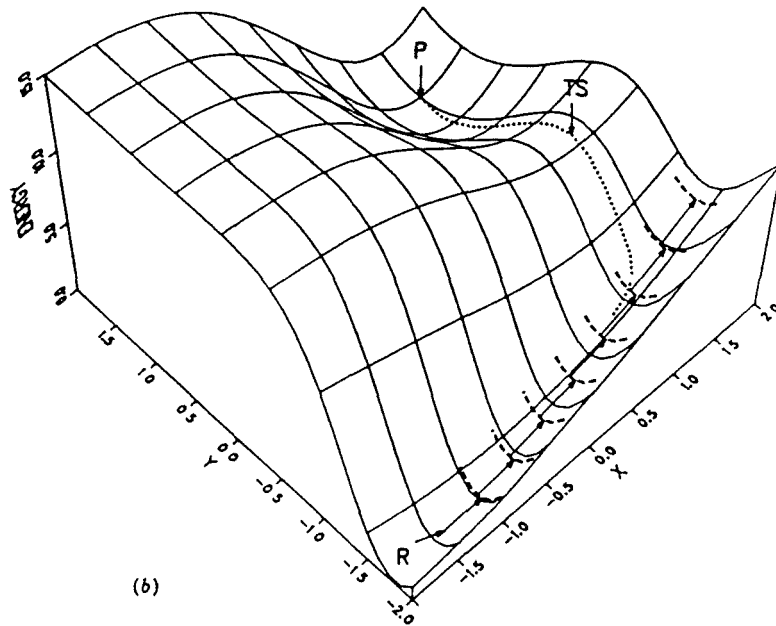
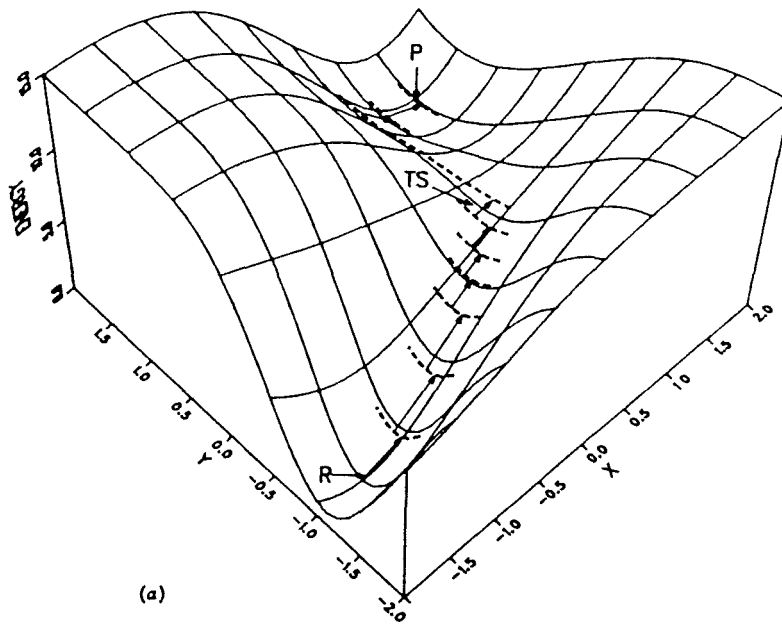


Figura III.3 Representación de los métodos LST y QST. Los puntos R, P y TS representan, respectivamente, las estructuras de los reactivos, productos y estado de transición. Fuente: Shaik *et al*¹³

En muchas reacciones la región de la SEP entre reactivos y ET, o entre ET y productos, está dominada por el cambio en una coordenada. La búsqueda del ET en estos casos se realiza mediante pequeños desplazamientos a lo largo de esa coordenada y minimizaciones respecto a las restantes coordenadas. En los casos favorables, una serie de pasos lleva a la obtención de la ET¹⁰⁰ (Figura III.4 a). Sin embargo, puede haber problemas cuando una segunda coordenada empieza a dominar: en ese caso este método puede pasar de largo la ET¹⁰¹, tal como se muestra en la Figura III.4 b.



Figuras III.4 Ilustración de un caso favorable (a) y uno desfavorable (b) en el empleo del método de hacer variar una coordenada y minimizar la energía respecto al resto de coordenadas.

Fuente: Shaik *et al*¹³

Los caminos de reacción curvados son el principal problema del método anteriormente descrito. Sin embargo, un simple cambio en la estrategia de búsqueda puede mejorar notablemente los resultados: en lugar de realizar desplazamientos sobre la SEP con respecto a una coordenada, se pueden realizar desplazamientos de una determinada longitud y calcular en qué dirección se produce el aumento más suave de la energía. Luego se sigue esa dirección (que hay que recalcular en cada paso) hasta encontrar el ET. Este método puede utilizarse mediante cálculos sólo de la energía¹⁰², o de la energía y el gradiente^{103,104}. También puede hacerse uso del vector propio de la matriz de segundas derivadas en cada paso^{17,91,105,106} o del método denominado de los gradientes extremos, que define caminos de reacción que conectan reactivos y productos a través del ET en los cuales el gradiente en cada punto es un vector propio de la Hessiana en ese punto^{107,108}. Todos estos métodos pueden ser costosos y, además, no hay garantía de que ascendiendo por la SEP se encuentre la deseada ET.

Otro método que puede emplearse para localizar ET (y también para localizar mínimos en la SEP) consiste en minimizar la norma del gradiente^{30,109,110} (ecuación III.25), dado que es un mínimo en cualquier punto crítico.

$$R = |g|^2 = \sum_i \left(\frac{\partial E}{\partial q_i} \right)^2 \quad (\text{III.25})$$

Este método es especialmente útil cuando la geometría de partida está cerca de la geometría del ET.

Por último, los métodos que calculan el gradiente pueden emplearse para localizar ET^{109,111-113}. Estos métodos utilizan funciones cuadráticas para representar las superficies de energía y localizar puntos estacionarios. Si la Hessiana tiene un valor propio negativo, el punto estacionario que se localiza es un punto de silla de índice uno, de manera que con una geometría de partida adecuada se llega directamente al punto de silla. Dicha geometría de partida debe encontrarse en la zona de la SEP que rodea al ET, llamada zona cuadrática;

en esa zona la Hessiana tiene un solo valor propio negativo. Si la geometría inicial no se encuentra en la zona cuadrática, existen algoritmos que permiten acercarla, como el método de seguir el vector propio^{17,91,105,106,114-119} o el de la aproximación racional de la función^{17,91,105,106}. Además, la estimación inicial de la Hessiana debe tener un vector propio que sea razonablemente aproximado al vector de transición. También el valor propio negativo de ese vector propio debe mantenerse negativo en el curso de la optimización final, aunque su magnitud y dirección puedan variar.

En el trabajo que presentamos hemos utilizado para acercar la geometría inicial a la zona cuadrática el método de seguir el vector propio, también llamado método de los modos propios¹²⁰, que puede emplearse tanto para localizar mínimos como ET y es usado rutinariamente por los programas de cálculo químico cuántico (ver sección V.4). La energía en un punto de configuración nuclear X puede calcularse mediante un desarrollo de Taylor conocido su valor en otro punto X₀, según:

$$E(X) = E_0 + gh + \frac{1}{2}h^T Hh + \dots \quad (\text{III.26})$$

donde h, H, g y E₀ son, respectivamente, el desplazamiento necesario para ir del punto X₀ al punto estacionario más próximo (X), la Hessiana, el vector gradiente y la energía, todos ellos en X₀. X=X₀+h y h^T es el traspuesto del vector h.

Truncando la expresión III.26 en el término cuadrático en h y aplicando la condición estacionaria, dE/dh=0, se obtiene:

$$h = -H^{-1}g \quad (\text{III.27})$$

que puede escribirse, en términos de vectores propios y valores propios de la Hessiana, como:

$$h = -\sum_i \frac{F_i V_i}{b_i} \quad (\text{III.28})$$

donde F_i es la componente del gradiente g a lo largo del vector propio V_i y b_i es el correspondiente valor propio. El cambio energético asociado a este cambio de coordenadas viene dado por:

$$\Delta E = -\sum_i \frac{F_i^2}{2b_i} \quad (\text{III.29})$$

En la ecuación III.29 los valores propios positivos darán lugar a una disminución de energía, mientras que los negativos producirán un incremento de energía. La ecuación III.28, propuesta originalmente por Hilderbrandt¹¹⁴, fue posteriormente modificada^{17,105,106,115} según:

$$h = \sum_i \frac{F_i V_i}{\lambda_i - b_i} \quad (\text{III.30})$$

donde λ_i son los multiplicadores de Lagrange¹⁰⁵ o parámetros de desplazamiento^{17,106}. Con este cambio, la ecuación III.29 se escribe:

$$\Delta E = \sum_i \frac{(\lambda_i - \frac{1}{2}b_i)F_i^2}{(\lambda_i - b_i)^2} \quad (\text{III.31})$$

En la ecuación III.31 $\lambda_i - 1/2b_i < 0$ para los modos que van a ser minimizados y $\lambda_i - 1/2b_i > 0$ para los que serán maximizados. Los parámetros de desplazamiento se obtienen, según la formulación propuesta por Wales¹¹⁷, de:

$$\lambda_i = \frac{1}{2} \left(b_i \pm \sqrt{b_i^2 + 4F_i^2} \right) \quad (\text{III.32})$$

La elección de los parámetros de desplazamiento determina diversos algoritmos dentro del método de seguir el vector propio^{17,117}. Recientemente¹²⁰ se ha propuesto que si el valor propio b_i es negativo para el modo propio escogido para la maximización, y por tanto la energía aumenta como se requiere, entonces λ_i se toma igual a cero; en caso contrario se toma como la raíz positiva de la ecuación III.32 para invertir el movimiento. De igual modo, si el valor

propio es positivo para un modo propio escogido para la minimización, disminuyendo la energía como se requiere, λ_i se toma igual a cero; en caso contrario se toma $\lambda_i = 2b_i$ para invertir la dirección del movimiento.

En la presente memoria describimos diversas ET para las reacciones químicas catalizadas por la enzima Rubisco. Hemos utilizado para localizarlas la técnica del espacio de control y el espacio complementario, propuesta por nuestro grupo^{99,121}, que describiremos en el apartado IV.3 de la presente memoria.

Referencias

- (1) Durán, M.; Bertrán, J. *Reports in Molecular Theory* **1990**, *1*, 57.
- (2) Mezey, P. G. *Potential energy hypersurfaces*; Elsevier: Amsterdam, 1987.
- (3) Born, M.; Oppenheimer, J. R. *Ann. Physik* **1927**, *84*, 457.
- (4) Minkin, V. I.; Simkin, B. Y.; Minyaev, R. M. *Quantum Chemistry of Organic Compounds*; Springer-Verlag: New York, 1990.
- (5) Davidson, E. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 397.
- (6) Hinchliffe, A. *Computational quantum chemistry*; John Wiley & Sons: Chichester, 1988.
- (7) Jug, K. *Theor. Chim. Acta* **1980**, *54*, 263.
- (8) Shafer, L. *J. Mol. Struct., THEOCHEM* **1983**, *100*, 1.
- (9) Havlas, Z.; Zaradnik, J. *Int. J. Quantum Chem.* **1984**, *26*, 607.
- (10) Eyring, H.; Polanyi, M. *Z. Phys. Chem. Abt. B.* **1931**, *12*, 279.
- (11) Heitler, W.; London, F. *Z. Physik* **1927**, *44*, 455.
- (12) London, F. *Z. Electrochem* **1929**, *35*, 552.
- (13) Shaik, S. S.; Schlegel, H. B.; Wolfe, S. *Theoretical aspects of physical organic chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1992.
- (14) Peltzer, H.; Wigner, E. *Z. Phys. Chem., Abt. B.* **1932**, *15*, 445.
- (15) Eliel, E. L. *Stereochemistry of carbon compounds*; McGraw-Hill: New York, 1962.
- (16) Kraka, E.; Dunning Jr., T. H. *Advances in molecular electronic structure theory: the calculations and characterization of molecular potential energy surfaces*; JAI Press, Inc.: Greenwich, C. N., 1989.
- (17) Banerjee, A.; Adams, N.; Simons, J.; Shepard, R. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 52.
- (18) Heidrich, D.; Quapp, W. *Theor. Chim. Acta.* **1986**, *70*, 89.
- (19) Stanton, R. W.; McIver Jr., J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3632.
- (20) Melander, L. *Isotope effects on reaction rates*; The Ronald Press Company: New York, 1960.
- (21) Bell, R. P. *The tunnel effect in chemistry*; Chapman and Hall: London, 1980.

- (22) Khairutdinov, R. F.; Zamaraev, K. I.; Zhdanov, V. P. *Electron tunneling in chemistry*; Elsevier: Amsterdam, 1989; Vol. 30.
- (23) Eyring, H.; Lin, S. H.; Lin, S. M. *Basic chemical kinetics*; John Wiley & Sons: New York, 1980.
- (24) Glasstone, K. J.; Laidler, K. J.; Eyring, H. *The Theory of Rate Processes*; McGraw-Hill: New York, 1941.
- (25) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1966**, *45*, 4493.
- (26) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1966**, *45*, 4500.
- (27) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2610.
- (28) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2617.
- (29) Murrell, J. N.; Laidler, K. J. *Trans. Faraday Soc.* **1968**, 371.
- (30) McIver Jr., J. W.; Komornicki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2625.
- (31) Fukui, K. *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 4161.
- (32) Minyaev, R. M. *Int. J. Quantum Chem.* **1994**, *49*, 105.
- (33) Truhlar, D. G.; Steckler, R.; Gordon, M. S. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 217.
- (34) Minyaev, R. M. *Zh. Struct. Khim. (Russia)* **1991**, *32*, 127.
- (35) Bone, R. G. A.; Rowlands, T. W.; Handy, N. C.; Stone, A. J. *Mol. Phys.* **1991**, *72*, 33.
- (36) Pechukas, P. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 1516.
- (37) Fukui, K. *Acc. Chem. Res.* **1981**, *14*, 363.
- (38) Fukui, K. In *Applied quantum chemistry*; V. H. Smith Jr., H. R. Shaefer III and K. Morokuma, Ed.; D. Reidel: Dordrecht, 1986.
- (39) Basilevsky, M. V. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1983**, *103*, 139.
- (40) Fukui, K.; Kato, S.; Fujimoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1.
- (41) Müller, K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 1.
- (42) Morokuma, K.; Kato, S. In *Potential energy surfaces and dynamic calculations*; D. G. Truhlar, Ed.; Plenum Press: New York, 1981; pp 243-264.
- (43) Truhlar, D. G.; Garrett, B. C. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 440.
- (44) Miller, W. H.; Handy, N. C.; Adams, J. E. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 99.
- (45) Basilevsky, M. V. *Chem. Phys.* **1982**, *67*, 337.
- (46) Fletcher, R. *Practical methods of optimization*; John Wiley & Sons: New York, 1981.

- (47) Scales, L. E. *Introduction to non-linear optimization*; MacMillan: Basingstole, 1985.
- (48) Bunday, B. D. *Basic optimization methods*; Edward Arnold Press: 1984.
- (49) Schlegel, H. B. *Adv. Chem. Phys.* **1987**, *67*, 249.
- (50) Schlegel, H. B. In *New theoretical concepts for understanding organic reactions*; J. Bertrán and I. G. Csizmadia, Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989; pp 33-53.
- (51) Head, J. C.; Zerner, M. C. *Adv. Quantum Chem.* **1989**, *20*, 239.
- (52) Fletcher, R.; Powell, M. J. D. *Comput. J.* **1963**, *6*, 163.
- (53) Binkley, J. S. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 5142.
- (54) Baker, J. J. *Comput. Chem.* **1987**, *8*, 563.
- (55) Fletcher, R.; Reeves, C. M. *Comput. J.* **1964**, *7*, 149.
- (56) Davidon, W. "Argonne National Laboratory Report ANL-5990," Argonne, IL,
- (57) Broyden, C. G. *J. Inst. Math. Appl.* **1970**, *6*, 76.
- (58) Fletcher, R. *Comput. J.* **1970**, *13*, 317.
- (59) Goldfarb, D. *Math. Comp.* **1970**, *24*, 23.
- (60) Shanno, D. F. *Math. Comp.* **1970**, *24*, 647.
- (61) Davidon, W. C. *Math. Programming.* **1975**, *9*, 1.
- (62) Murtaugh, B. A.; Sargent, R. W. H. *Comput. J.* **1972**, *13*, 185.
- (63) Wilson, E. B.; Decius, J. C.; Cross, P. C. *Molecular Vibrations*; Dover Publishers: New York, 1980.
- (64) Califano, S. *Vibrational states*; Wiley-Interscience: New York, 1976.
- (65) Slater, J. C.; Frank, N. H. *Mechanics*; McGraw-Hill: New York, 1947.
- (66) Atkins, P. W. *Quanta. A handbook of concepts.*; Segunda ed.; Oxford University Press: Oxford, 1991.
- (67) Salem, L. *Electrons in chemical reactions*; Wiley-Interscience: New York, 1982.
- (68) Flanigan, M. C.; Komornicki, A.; McIver Jr., J. W. In *Modern Theoretical Chemistry*; G. A. Segal, Ed.; Plenum Press: New York, 1977; Vol. 8.
- (69) Huskey, W. P.; Schowen, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5704.

- (70) McIntosh, D. F.; Michaelian, K. H.; Peterson, M. R. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1289.
- (71) Levine, I. N. *Molecular spectroscopy*; John Wiley & Sons: New York, 1975.
- (72) Colthup, N. B.; Daly, L. H.; Wiberley, S. E. *Introduction to infrared and raman spectroscopy*; Segunda ed.; Academic Press: New York, 1975.
- (73) Steele, D. *Theory of vibrational spectroscopy*; W. B. Saunders Comp.: Toronto, 1971.
- (74) McIver Jr., J. W. *Acc. Chem. Res.* **1974**, *7*, 72.
- (75) Pearson, R. G. *Symmetry rules for chemical reactions. Orbital topology and elementary processes.*; John Wiley & Sons: New York, 1976.
- (76) Rodger, A.; Schipper, P. E. *Chem. Phys.* **1986**, *107*, 329.
- (77) Valtazanos, P.; Ruedenberg, K. *Theoret. Chim. Acta* **1986**, *69*, 281.
- (78) Valtazanos, P.; Elbert, S. T.; Ruedenberg, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3147.
- (79) Bosch, E.; Moreno, M.; Lluch, J. M.; Bertrán, J. *Chem. Phys. Letters* **1989**, *160*, 543.
- (80) Baker, J.; Gill, M. W. *J. Comput. Chem.* **1988**, *9*, 466.
- (81) Basilevsky, M. V. *Theor. Chim. Acta* **1987**, *72*, 63.
- (82) Malone, S.; Hegarty, A. F.; Nguyen, M. T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1988**, 477.
- (83) Kraus, W. A.; DePristo, A. E. *Theoret. Chim. Acta* **1986**, *69*, 309.
- (84) Lluch, J. M.; Bertrán, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1982**, 1419.
- (85) Pulay, P.; Saebo, S. *Theoret. Chim. Acta* **1986**, *69*, 357.
- (86) Head, J. D.; Weiner, B.; Zerner, M. C. *Int. J. Quantum Chem.* **1988**, *33*, 177.
- (87) Jensen, H. J. A.; Jörgensen, P.; Helgaker, T. *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 3917.
- (88) Schlick, T.; Overton, M. *J. Comput. Chem.* **1987**, *9*, 1025.
- (89) Grubb, A.; Sharma, C. S. *Chem. Phys. Letters* **1987**, *133*, 154.
- (90) Bell, S.; Crighton, J. S. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 2464.
- (91) Baker, J. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 385.
- (92) Smith, C. M. *Int. J. Quantum Chem.* **1990**, *37*, 773.

- (93) Sana, M. *Int. J. Quantum Chem.* **1981**, *21*, 139.
- (94) Comeau, D. C.; Zellmer, R. J.; Shavitt, I. In *Geometrical derivatives of energy surfaces and molecular properties.*; P. Jorgensen and J. Simons, Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1986; Vol. C166.
- (95) Halgren, T. A.; Lipscomb, W. N. *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *49*, 225.
- (96) Scharfenberg, P. *J. Comp. Chem.* **1982**, *3*, 277.
- (97) Balint, I.; Ban, M. I. *Theor. Chim. Acta* **1983**, *63*, 255.
- (98) Jensen, A. *Theor. Chim Acta* **1983**, *63*, 269.
- (99) Tapia, O.; Andrés, J. *Chem. Phys. Letters* **1984**, *109*, 471.
- (100) Rothman, M. J.; Lohr Jr., L. L. *Chem. Phys. Letters* **1980**, *70*, 405.
- (101) Burkert, U.; Allinger, N. L. *J. Comp. Chem.* **1982**, *3*, 40.
- (102) Müller, K.; Brown, L. D. *Theor. Chim Acta* **1979**, *53*, 75.
- (103) Basilevsky, M. V.; Shamov, A. G. *Chem. Phys.* **1980**, *60*, 347.
- (104) Dewar, M. J. S.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1984**, *80*, 227.
- (105) Cerjan, C. J.; Miller, W. H. *J. Chem. Phys.* **1981**, *75*, 2800.
- (106) Simons, J.; Jorgensen, P.; Taylor, H.; Ozment, J. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2745.
- (107) Hoffmann, D. K.; Nord, R. S.; Ruedenberg, K. *Theor. Chim. Acta* **1986**, *69*, 265.
- (108) Jorgensen, P.; Jensen, H. J. A.; Helgaker, T. *Theor. Chim. Acta* **1988**, *73*, 55.
- (109) Poppinger, D. *Chem. Phys. Letters* **1975**, *35*, 550.
- (110) Komornicki, A.; Ishida, K.; Morokuma, K.; Dietchfield, R.; Conrad, M. *Chem. Phys. Letters* **1977**, *45*, 595.
- (111) Schlegel, H. B. *J. Comput. Chem.* **1982**, *3*, 214.
- (112) Bell, S.; Crighton, J.; Fletcher, R. *Chem. Phys. Letters* **1981**, *82*, 122.
- (113) McKelvey, J. M.; Hamilton, J. F. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 579.
- (114) Hilderbrandt, R. L. *Comput. Chem.* **1977**, *1*, 179.
- (115) Nichols, J. A.; Taylor, H.; Schmidt, P. P.; Simons, J. *J. Chem. Phys.* **1990**, *92*, 340.
- (116) Simons, J.; Nichols, J. *Int. J. Quantum Chem., Quantum Chem. Symp. No. 24* **1990**, 263.

- (117) Wales, D. J. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86*, 3505.
- (118) Wales, D. J.; Berry, R. S. *J. Chem. Phys.* **1990**, *90*, 4283.
- (119) Wales, D. J. *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 7002.
- (120) Tsai, C. J.; Jordan, K. D. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 11227.
- (121) Andrés, J.; Cárdenas, R.; Silla, E.; Tapia, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 666.

IV. TEORÍA DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA

Las enzimas son eficientes catalizadores que juegan un papel esencial en los sistemas biológicos¹⁻³ y que además catalizan *in vitro* una serie de importantes procesos químicos.

El estudio de la catálisis enzimática ha puesto de manifiesto diversos fenómenos mecanísticos⁴⁻⁸, dando lugar a nuevos métodos sintéticos^{3,5,9,10}, al aislamiento de nuevas enzimas en la naturaleza¹¹ y al descubrimiento de una nueva química selectiva^{12,13}.

Las primeras observaciones de la actividad enzimática se remontan a 1833, cuando se hicieron observaciones de la hidrólisis natural del almidón de patata¹⁴. Sin embargo, la existencia de catalizadores biológicos no fue aceptada debido a la concepción vitalista, según la cual la actividad observada era una propiedad inseparable de las células vivas. Pasteur, entre otros, compartía este punto de

vista. Otros autores, sin embargo, sostenían que las enzimas eran productos químicos y no sustancias vivas. A finales del siglo pasado Emil Fisher realizó una serie de trabajos experimentales sobre la estereoselectividad de las enzimas, enunciando el famoso símil de la llave y la cerradura¹⁵. Según esa idea, la enzima acomoda específicamente al sustrato en el centro activo, igual como una llave encaja en su cerradura, y de ese modo distingue un sustrato particular entre otras sustancias con formas similares.

El comienzo de este siglo marcó los primeros pasos en la utilización de las enzimas en procesos de síntesis¹⁶. En la década de 1930 a 1940 se desarrolló la química física orgánica como disciplina e inmediatamente se vieron las posibilidades que abría su conexión con la enzimología¹⁷. En esa década se produjo un rápido desarrollo en la aplicación de la cinética a la elucidación de mecanismos de reacción de un modo sistemático^{18,19}.

También en 1930 puede situarse el origen de las modernas teorías sobre la actividad de las enzimas. Haldane publicó un tratado²⁰ en el que introdujo la idea de que el complejo formado entre la enzima y el sustrato requiere una cierta energía adicional antes de formarse y sugirió que el símil propuesto por Fisher debía reformularse en el sentido de que el sustrato (la llave) no encaja perfectamente en la enzima (la cerradura), sino que se ve distorsionada hacia la geometría del producto.

Esta idea se vió reforzada por la aplicación de la teoría del estado de transición (TET)²¹ a los procesos enzimáticos. Basándose en ella, Pauling formuló su famoso postulado²²⁻²⁴ según el cual la enzima enlaza fuertemente al ET de la reacción química, estabilizándolo y acelerando la reacción. De este modo, la deformación que la enzima causa en el sustrato tiene como fin acercar su geometría a la geometría del ET. Más tarde, Jencks^{25,26}, Fersht²⁷ y Schowen²⁸ realizaron extensos estudios de los aspectos cinéticos y estructurales de la actividad enzimática.

Koshland²⁹ mejoró el modelo de la llave y la cerradura introduciendo la hipótesis de que la enzima, a su vez, también se ve modulada por cambios estructurales cuando el sustrato se une a ella. Así, la enzima existe en un estado inactivo, con los grupos necesarios para la catálisis situados en posiciones no propicias para la interacción con el sustrato. La unión con él proporciona la fuerza

conductora que provoca cambios conformacionales en ambos y hace posible la catálisis. Siguiendo esta línea, Warshel³⁰, ha sugerido que las enzimas son tan grandes para disponer de suficiente flexibilidad y energía con vistas a poder llevar a cabo los cambios conformacionales necesarios sin que aparezca tensión en su estructura.

Recientemente se ha incrementado el interés en la actividad de las enzimas debido a la producción de anticuerpos catalíticamente activos³¹⁻³⁵, diseñados para simular el estado de transición de la reacción química a catalizar (estados de transición análogos)³⁶⁻³⁸. Según han demostrado experimentalmente Lerner y Schultz³⁹, una forma práctica de abordar el diseño y obtención de catalizadores es utilizar anticuerpos construidos a partir de los ET de la reacción química. Actualmente se conocen alrededor de 50 ejemplos de reacciones químicas catalizadas por anticuerpos que inducen a compuestos que imitan al ET de la transformación química^{39,40}. Tanto el diseño de drogas, dirigido a la síntesis de ET análogos para utilizarlos como substratos inhibidores de las enzimas que controlan el proceso bioquímico, como el diseño de catalizadores sintéticos para procesos químicos específicos, se consiguen a través del conocimiento de la estructura de transición, de tal manera que se construye su complemento estructural. De hecho, la obtención de ET análogos se ha convertido en una de las tareas más importantes de la industria farmacológica⁴¹⁻⁴³ y aporta datos fundamentales para la comprensión del fenómeno catalítico en general⁴⁴. Este concepto es ampliamente utilizado en el análisis de los resultados obtenidos en el estudio del mecanismo molecular de las reacciones catalizadas por la Rubisco, como veremos en el capítulo VII. En la Figura IV.1 presentamos de modo esquemático el empleo de los ET análogos como inhibidores y como plantillas moleculares en la construcción de catalizadores.

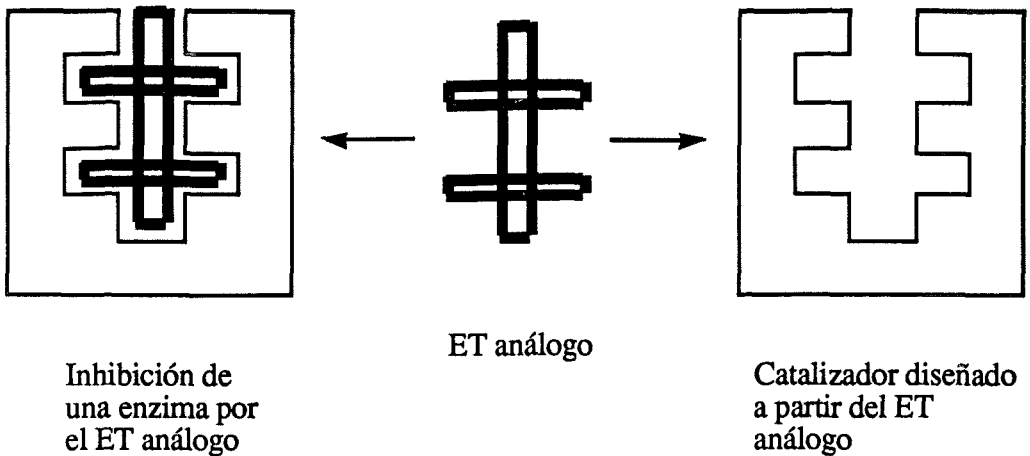


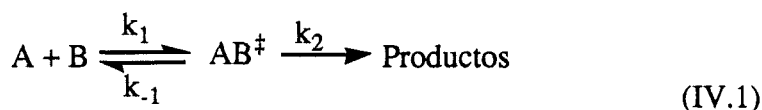
Figura IV.1 Representación esquemática del empleo de ET análogos como inhibidores y como plantillas moleculares en la construcción de catalizadores.

En el campo de la bioquímica se ha extendido el concepto de abzima: una vez elegida la reacción química y predicha la estructura exacta del ET, se puede construir un ET análogo en el laboratorio. Si se inyecta éste en un ratón, el sistema inmunológico del ratón puede reaccionar creando un anticuerpo contra él⁴⁵. Proporcionando el ET análogo lo más parecido al real, los científicos pueden usar el anticuerpo para catalizar la reacción química de la misma forma que una enzima podría hacerlo. Entonces, el anticuerpo catalíticamente activo es la abzima.

Todos estos casos presuponen un conocimiento de la estructura y propiedades del ET de la reacción química a ser catalizada. La descripción de la actividad enzimática se entiende hoy en día en estos términos, y suele hablarse de la estabilización del ET como causa fundamental de la catálisis. Los fundamentos de esa descripción son la TET y el postulado de Pauling, que presentaremos en los siguientes apartados de la presente memoria.

IV.1 TEORÍA DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

La TET, también llamada teoría del complejo activado o teoría de las velocidades absolutas⁴⁶, se basa en la suposición de la existencia de una estructura, la del ET, que se encuentra en equilibrio con los reactivos⁴⁷:



La velocidad de la reacción, v , viene dada por $k[A][B]$ y es la velocidad a la que el ET (AB^\ddagger) se disocia para dar los productos. Se asume que la disociación del ET tiene poca influencia en el equilibrio entre los reactivos y el ET, para el cual se define una constante de equilibrio K^\ddagger , de la que se deduce el valor de la concentración de AB^\ddagger según:

$$[AB^\ddagger] = K^\ddagger[A][B] \quad (\text{IV.2})$$

Sin embargo, en la región que ocupa el ET en la SEP, es evidente que el sistema cambia desde un estado en el cual el equilibrio está más desplazado hacia los reactivos (antes del punto ocupado por el ET) hasta otro estado en el cual el sistema evoluciona rápidamente hacia los productos (después de dicho punto). De modo que puede definirse una fracción f del sistema que está abocado a la formación de productos⁴⁸. Según la IUPAC⁴⁹ el ET ocupa el punto en el cual $f=0.5$.

En la ecuación IV.1 se aplica la aproximación del estado estacionario, según la cual la concentración del ET es pequeña y se mantiene constante, con lo cual se tiene que la velocidad de formación y la de descomposición del ET son iguales, es decir:

$$k_1[A][B] = k_{-1}[AB^\ddagger] + k_2[AB^\ddagger] \quad (\text{IV.3})$$

de donde se deduce que:

$$[AB^\ddagger] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [A][B] \quad (\text{IV.4})$$

y puesto que la velocidad de la reacción es la velocidad de formación de productos, esto es, $v = k_2[AB^\ddagger]$, se tiene:

$$v = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} [A][B] \quad (\text{IV.5})$$

Por tanto, la k observada experimentalmente es:

$$k = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (\text{IV.6})$$

El ET es un punto de equilibrio precario. De hecho, en la dirección en la cual el ET es un máximo, existen estructuras a cada lado del ET de menor energía y cualquier movimiento molecular en esa dirección produce una caída por la pendiente energética hacia reactivos o hacia productos; en otras palabras, el modo vibracional del ET que corresponde con la dirección del VT puede considerarse como un modo traslacional. Puesto que la energía vibracional viene dada por $E = k_B T$, donde k_B es la constante de Boltzmann, y aplicando la ecuación de Planck, $E = h\nu$, se tiene que la frecuencia para la disociación del ET es:

$$\nu^\ddagger = \frac{k_B T}{h} \quad (\text{IV.7})$$

Esta frecuencia es la misma para la disociación del ET en cualquier sentido, por lo cual $k_{-1} = k_2 = \nu^\ddagger$. Con ello, la ecuación (IV.6) puede escribirse:

$$k = \frac{1}{2} \nu^\ddagger \left(\frac{k_1}{k_{-1}} \right) \quad (\text{IV.8})$$

El término k_1/k_{-1} es equivalente a la constante de equilibrio K^\ddagger , por lo cual:

$$k = \frac{1}{2} v^\ddagger K^\ddagger = \frac{1}{2} \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right) \quad (\text{IV.9})$$

donde se ha aplicado para K^\ddagger la relación termodinámica usual. De hecho, éste no es un verdadero equilibrio: a medida que los átomos se mueven hacia la estructura del ET su movimiento puede fácilmente llevarlos a través de la barrera energética y hacerles caer en el valle de los productos. Esto puede ocurrir totalmente, o sólo de modo parcial, así que el factor 1/2 de la ecuación IV.9 debe reemplazarse por un parámetro variable, κ , llamado coeficiente de transmisión, que mide la proporción de moléculas llevadas a través de la barrera. La ecuación resultante es la ecuación de Eyring:

$$k = \kappa v^\ddagger K^\ddagger = \kappa \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp\left(-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT} \right) \quad (\text{IV.10})$$

El coeficiente de transmisión κ incluye diferentes factores de corrección, como efecto túnel, corrección de reversibilidad a través de la barrera o efectos de fricción con el solvente⁵⁰. Su valor se encuentra entre 0.1 y 1 para reacciones a temperatura ordinaria en solución, aunque puede diferir mucho de estos valores en algunos casos⁵¹. Su cálculo preciso sigue siendo objeto de investigación^{52,53}.

En la ecuación IV.9 se ha sustituido K^\ddagger por la relación termodinámica usual con la energía libre de Gibbs. También puede emplearse la termodinámica estadística para obtener la expresión de K^\ddagger en términos de las funciones moleculares de partición por unidad de volumen, con lo cual la ecuación de Eyring se escribe:

$$k = \kappa \left(\frac{k_B T}{h} \right) \frac{q_\ddagger}{q_A q_B} \exp\left(-\frac{\Delta E_a^\ddagger}{k_B T} \right) \quad (\text{IV.11})$$

donde q_{\ddagger} es la función de partición para todos los grados de libertad del ET excepto el traslacional, q_A y q_B son las funciones de partición de los reactivos y ΔE_a^{\ddagger} es la diferencia entre las energías del punto cero de reactivos y ET⁴⁷.

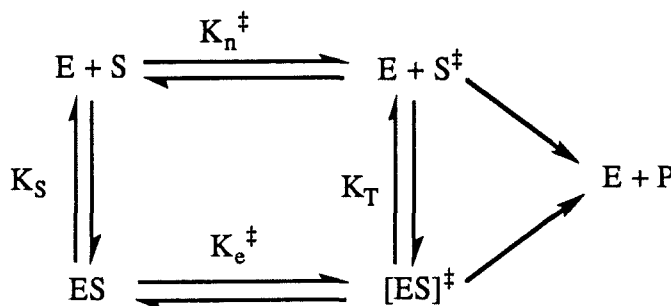
Como hemos visto, la TET es una aproximación que se basa en ciertas suposiciones, como el equilibrio entre reactivos y ET o la hipótesis del estado estacionario⁵⁰. Pese a ello funciona muy bien, tal como se ha comprobado mediante la comparación de los resultados teóricamente obtenidos mediante su uso con datos experimentales o resultados teóricos más rigurosos^{50,52,54}. Durante sus 50 años de historia ha ido modificándose y mejorándose⁵⁵⁻⁵⁷ y hoy en día se acepta como conceptualmente correcta.

La TET es una de las más importantes herramientas que permiten una comprensión profunda de las reacciones químicas. En particular las reacciones enzimáticas, en las que el mecanismo catalítico ocurre en el centro activo de la proteína, pueden interpretarse ventajosamente desde el punto de vista de la TET, como una interacción entre la enzima y el sustrato. La conformación geométrica y electrónica del sustrato es similar a la del ET, tal como Pauling postuló en su teoría de catálisis enzimática²²⁻²⁴, a la que dedicamos el apartado siguiente.

IV.2 POSTULADO DE PAULING

Tal como mostró Kurz⁵⁸ y, más detalladamente, Wolfenden⁵⁹⁻⁶¹ y Lienhard^{62,63}, la TET puede aplicarse a la catálisis enzimática utilizando el concepto de ciclo termodinámico. Con ello se obtiene, en términos cuantitativos, el postulado de Pauling.

Un ciclo termodinámico apropiado para aplicar la TET a la catálisis enzimática se presenta en el Esquema IV.1:



Esquema IV.1 Ciclo termodinámico que relaciona la unión del sustrato y del ET a la enzima. E: enzima; S: sustrato; P: producto. El ET se señala con el superíndice usual. El camino superior representa la reacción no catalizada y el inferior la catalizada por la enzima.

Si comparamos las constantes de velocidad para el proceso elemental no catalizado, k_n , y para el proceso catalizado por la enzima, k_e , aplicando la ecuación IV.10, primera igualdad, se obtiene:

$$\frac{k_e}{k_n} = \frac{\kappa_e v_e K_e^\ddagger}{\kappa_n v_n K_n^\ddagger} \quad (\text{IV.12})$$

Utilizando el ciclo termodinámico se puede igualar el cociente entre las constantes de formación de los ET al cociente entre las constantes de disociación para el sustrato, K_S y para el ET, K_T , con lo que se tiene:

$$\frac{k_e}{k_n} = \frac{\kappa_e \nu_e K_S}{\kappa_n \nu_n K_T} \quad (\text{IV.13})$$

El valor k_e/k_n es extraordinariamente grande para las enzimas típicas: no son extraños incrementos de la velocidad de la reacción⁶⁴ del orden de 10^{10} a 10^{14} e incluso se han observado aumentos mayores^{65,66}.

Aunque el factor $\kappa_e \nu_e / \kappa_n \nu_n$ del miembro de la derecha de la ecuación IV.13 puede tomar valores muy distintos de la unidad, para el grado de aproximación utilizado puede escribirse que:

$$\frac{k_e}{k_n} \approx \frac{K_S}{K_T} \quad (\text{IV.14})$$

Este es el resultado central: K_S resulta mucho mayor que K_T , esto es, el sustrato se disocia de la enzima con mucha más facilidad que el ET, por un factor aproximadamente igual al aumento de la velocidad de la reacción por la enzima.

Las implicaciones de la ecuación IV.14 y sus variantes han sido extensivamente analizadas e interpretadas^{59-64,66-70}. Algunas de las conclusiones que se derivan de dichos estudios son las siguientes:

a) el principio de la unión del ET a la enzima no es una teoría independiente sino que se deriva de la TET y de la termodinámica⁶⁹.

b) Cualquier molécula de estructura similar a la geometría del ET se unirá a la enzima mucho más intensamente que el propio sustrato. Centenares de estos ET análogos han sido estudiados^{66,69}. Algunos son antibióticos naturales; muchos se diseñan deliberadamente para investigar el mecanismo de una enzima determinada; otros resultan de los intentos de sintetizar potentes inhibidores de las enzimas para usarlos como drogas o medicamentos⁷¹.

c) Reordenando la ecuación IV.13 se obtiene:

$$\frac{k_{cat}}{K_S} = k_n \left(\frac{\kappa_e \nu_e}{\kappa_n \nu_n} \right) \left(\frac{1}{K_T} \right) \quad (\text{IV.15})$$

donde se ha identificado k_e con k_{cat} . En el término de la izquierda se tiene la constante de velocidad de segundo orden usual para la reacción de la enzima libre y el sustrato para dar enzima libre y producto, que no puede ser mayor que el límite controlado por difusión⁷², es decir, que unos $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De modo que una enzima perfecta tendrá un valor de K_T reducido, es decir, habrá reforzado la unión del ET hasta el límite. Albery y Knowles⁷³ realizaron un detallado análisis de cómo la eficacia de las enzimas podría haber sido optimizada mediante la evolución.

d) La existencia de un complejo enzima-sustrato (ES) se postula de acuerdo con los resultados de saturación por el sustrato en experimentos cinéticos de estado estacionario. Probablemente, el complejo ES representa la unión de moléculas de sustrato en estados precedentes al ET⁵¹ más que de moléculas de sustrato en su estado fundamental.

e) La unión del ET a la enzima es un fenómeno cooperativo, consecuencia de interacciones individuales entre grupos o átomos del ET y grupos o átomos del centro activo de la enzima, de modo que la interferencia en una de estas interacciones afectará de modo adverso a las otras. Los experimentos de mutagénesis dirigida reflejan esta propiedad perturbando la estructura de la enzima⁷⁴.

f) Como en cualquier molécula que posee enlaces sobre el eje de los cuales la rotación está permitida, en las moléculas de enzima se producen cambios conformacionales e isomerizaciones en el curso de la catálisis⁷⁵. Esto es debido a la necesidad de la enzima de adaptarse a los propios cambios que se producen en el sustrato a medida que la catálisis avanza. Esta línea de razonamiento también explica por qué en el complejo ES el sustrato puede estar unido a la enzima en una conformación distinta a la que tendría en solución de manera que se permita una mayor interacción con la enzima en el ET⁷⁶. Otra razón para esperar una conformación flexible en las enzimas es el hecho de que algunas reacciones tienen más de un ET, correspondientes a diferentes etapas en el proceso químico global que catalizan, como es el caso de la Rubisco. Además, como algunos autores han apuntado recientemente, el estado de transición puede entenderse no como una única entidad física, sino más bien una serie de especies en la vecindad del punto

de silla de la SEP (donde la estructura corresponde con la estructura de transición), con geometrías y energías ligeramente diferentes⁷⁷.

g) El efecto túnel puede jugar un papel en los procesos catalizados por enzimas, aunque hasta la fecha no se ha encontrado que en general afecte apreciablemente a los resultados obtenidos sin tenerlo en cuenta⁷⁸. Sin embargo, las correcciones que implica el efecto túnel sí son esenciales al analizar las implicaciones mecánicas de estudios de efectos isotópicos^{79,80}.

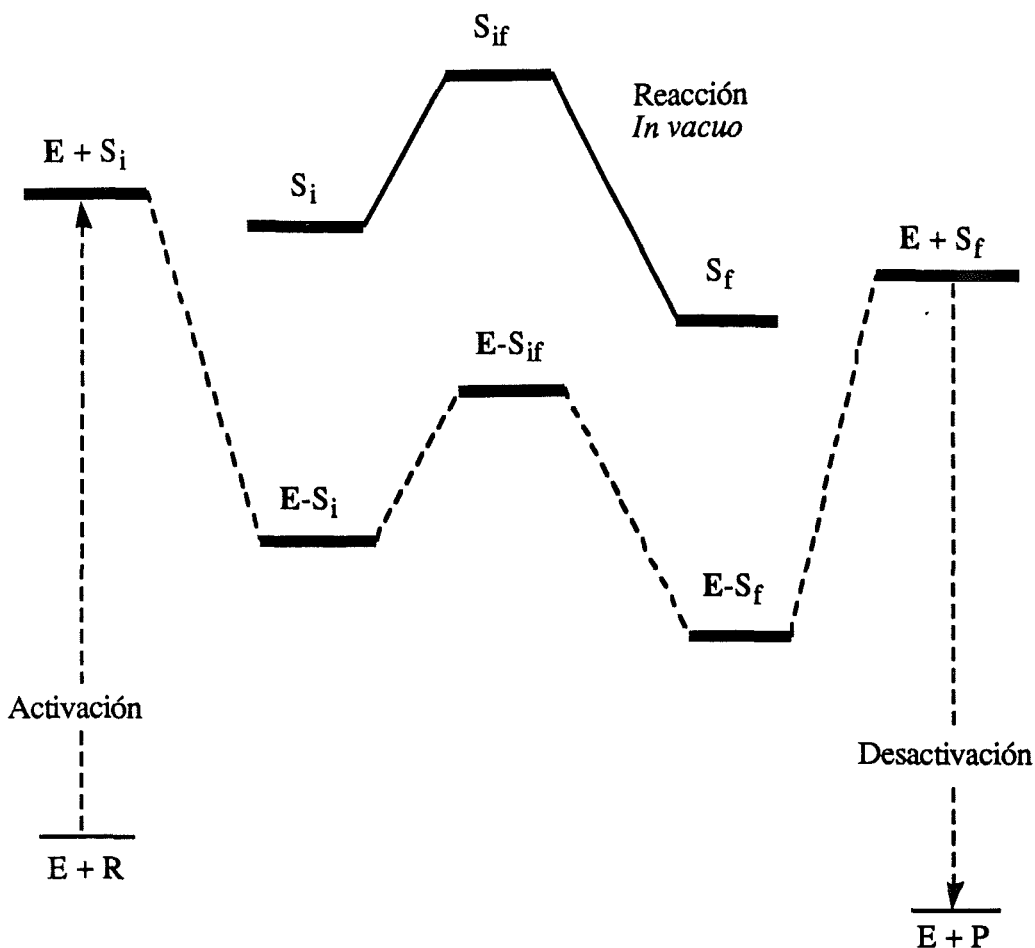
IV.3 CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y ESTRUCTURAS DE TRANSICIÓN *IN VACUO*

En este apartado se presenta una teoría de la catálisis enzimática elaborada por nuestro grupo^{81,82} a partir de estudios teóricos de los mecanismos de diferentes enzimas. A este respecto, como veremos en el capítulo de resultados, el estudio del mecanismo de la Rubisco ha sido especialmente ilustrativo.

El fenómeno de la catálisis enzimática puede describirse desde la perspectiva proporcionada por las especies reaccionantes *in vacuo*. En el Esquema IV.2 se presenta una descripción del proceso catalítico.

El primer paso corresponde a los reactivos (R) que son deformados hasta una configuración cercana a la del ET, que podemos denominar complejo precursor S_i . Por su parte la enzima también cambia su conformación inactiva inicial (E) hasta la conformación en la cual es activa (E). En ambos casos debe hacerse trabajo sobre R y E, con lo cual la energía del sistema aumenta. En la reacción *in vacuo* el camino continúa desde S_i a través del ET (S_{if}) hasta el complejo sucesor (S_f). Los productos (P) pueden formarse desde este punto mediante un proceso de relajación. La energía de activación, medida desde el nivel E + R, viene dada por la diferencia energética entre S_{if} y el estado de referencia.

En el caso del proceso catalizado por enzimas, el trabajo necesario para cambiar las conformaciones de R y E se obtiene de una fracción de la energía desprendida al formarse el complejo E- S_i . El resto de la energía desprendida al formarse dicho complejo lo estabiliza. Si asumimos, para una mayor simplicidad, una estabilización uniforme para las estructuras intermedias a las que denominamos, en conjunto, complejo activado, entonces el camino entre S_i y S_f será paralelo tal como se indica en el Esquema IV.2. Por tanto, el incremento en la velocidad de la reacción cuando está catalizada por enzimas es una función directa del exceso de energía desprendida al formarse el complejo enzima-complejo activado. Esta energía define un efecto catalítico primario.



Esquema IV.2 Representación energética de una interconversión química vía precursor (S_i), $ET(S_{if})$ y sucesor (S_f) que tiene lugar *in vacuo* y en un medio (E) que proporciona una estabilización a las especies intermedias. El medio puede representar un solvente pasivo o el centro activo de una enzima.

Debe hacerse notar que, en la aproximación de una estabilización uniforme de los intermedios, la enzima no une la estructura del ET mejor que cualquier otra estructura del complejo activado.

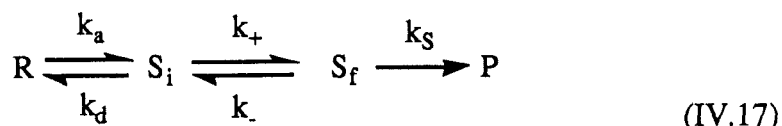
Si la estabilización no es uniforme para todas las estructuras del complejo activado, debido a grupos específicos en la enzima, puede cambiar la forma del camino entre S_i y S_f . Sin embargo, la estabilización del ET no será mayor que la estabilización más grande efectuada sobre cualquiera de las otras estructuras del

complejo activado. Si llamamos $\delta E(S_i)$ a la energía de interacción del precursor con el entorno e igualmente $\delta E(S_f)$ a la del sucesor, entonces puede estimarse $\delta E(S_{if})$ por:

$$\delta E(S_{if}) = \lambda^{TS} \delta E(S_i) + (1 - \lambda^{TS}) \delta E(S_f) \quad (\text{IV.16})$$

donde λ^{TS} es el grado de avance arbitrariamente normalizado correspondiente al ET en el complejo activado. Esta estabilización diferenciada puede contribuir a equilibrar los estados energéticos internos del complejo activado^{83,84}.

El ET puede alcanzarse directamente mediante excitación del precursor (S_i) o del sucesor (S_f) a lo largo de la dirección de curvatura negativa. Para ello, el tiempo de vida para la disociación de S_i en reactivos debe ser mayor que el tiempo característico para el tránsito de la barrera. De este modo, el paso de interconversión química es unimolecular. Desde un punto de vista mecanístico puede describirse según:



Un análisis en la aproximación del estado estacionario de estos tres pasos conduce a la siguiente expresión para la constante de velocidad observada:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_a} + \left(\frac{1}{K_r k_+} \right) \left(1 + \frac{k_-}{k_s} \right) \quad (\text{IV.18})$$

donde $K_r = k_a/k_d$ es la constante de equilibrio entre reactivos y complejo precursor.

En las condiciones termodinámicas de equilibrio entre R y S_i se cumple generalmente que $k_d \gg k_+$ y que $k_s \gg k_-$. Entonces la ecuación IV.18 se reduce a:

$$k_{obs} \approx K_r k_+ \quad (\text{IV.19})$$

La ecuación IV.19 pone de manifiesto que, aunque el complejo activado pueda ser energéticamente modificado como un todo en diferentes medios, la velocidad observada puede aumentarse simplemente cambiando el valor de la constante de equilibrio K_r . Dado que una enzima estabiliza el complejo S_i , aumentará proporcionalmente K_r y, por tanto, la velocidad observada de la reacción.

Existe una creencia general de que los efectos del solvente son tan importantes que los cálculos realizados *in vacuo* no sirven para analizar propiedades de sistemas en fases condensadas, como por ejemplo en sistemas enzimáticos. Este prejuicio es contradictorio con nuestros resultados, como se verá en el capítulo correspondiente de la presente memoria, y con la naturaleza misma del ET.

Puesto que en el ET y en el VT se encuentra la información de las fluctuaciones reactivas del paso químico que se estudia, es evidente que *si la reacción procede a través del mismo mecanismo molecular* en solución o en el centro activo de una enzima, el ET *in vacuo* debe ser invariante respecto a los efectos de solventes pasivos o a las interacciones con la proteína en el centro activo^{81,82}. Esta invariancia debe entenderse en términos de estructura y fluctuaciones a lo largo de la dirección reactiva. El diagrama energético variará como consecuencia de las diferentes interacciones de reactivos, complejo activado y productos con el medio pero, si no participan en la reacción grupos de la enzima o moléculas de solvente, la estructura y fluctuaciones del ET calculados *in vacuo* son invariantes fundamentales. El camino que une los reactivos con el complejo activado y éste con los productos, en cambio, está totalmente determinado por el medio. Por tanto, es de esperar que las propiedades electrónicas y las configuraciones de reactivos y productos estén fuertemente moduladas por la enzima. El postulado de Pauling puede ser ampliado en el sentido de que la enzima es complementaria a la estructura y fluctuaciones del complejo activado, entendido como la serie de estructuras en las que se describe y se encierra la información de la transformación química *in vacuo*.

El postulado de la invariancia del estado de transición permite deducir un corolario referido a la evolución de las enzimas: dado que el ET es un invariante, entonces las enzimas se han adaptado, a lo largo de la evolución, para ser

complementarias en estructura y fluctuaciones a los ET *in vacuo* de las reacciones que catalizan. En otras palabras, es el punto de silla de índice uno quien ha influenciado la estructura de las enzimas y no al revés.

En el capítulo VII de esta tesis doctoral presentaremos los ET para las reacciones que la Rubisco cataliza, calculados *in vacuo*, y veremos cómo su geometría es complementaria al centro activo y similar a la de los ET análogos. Esto no es un caso aislado: se han obtenido resultados similares en otras enzimas^{82,85-88}.

IV.3.1 COORDENADA DE INTERCONVERSIÓN QUÍMICA

En la presente memoria caracterizamos ET correspondientes a tres reacciones químicas catalizadas por la enzima Rubisco. En la etapa de enolización un átomo de hidrógeno se intercambia entre un centro dador (un átomo de carbono) y uno aceptor (un átomo de oxígeno; ver apartado VII.2). Para este proceso, puede definirse la coordenada de interconversión química como el desplazamiento relativo de la partícula que se traslada sobre la línea que une los centros dador y aceptor. Si denominamos D al centro dador y A al aceptor, siendo T el átomo de hidrógeno que se traslada, se obtiene siempre la distancia entre los centros D y A según:

$$\chi^+ = |(R_A - R_D)| \quad (\text{IV.20})$$

donde R_A y R_D son, respectivamente, los vectores de posición de A y D. Así mismo, definimos una variable simétrica elíptica como:

$$\rho = \frac{(|R_{DT}| + |R_{AT}|)}{\chi^+} \quad (\text{IV.21})$$

siendo R_{DT} y R_{AT} , respectivamente, los vectores de posición de T respecto de D y de A. La coordenada de interconversión, indicativa del grado de avance de T desde D hasta A viene dada por:

$$\chi^- = \frac{(|R_{DT}| - |R_{AT}|)}{\chi^+} \quad (\text{IV.22})$$

La zona reactiva está definida por $-1 < \chi^- < 1$. Cuando T está unida a D la coordenada de interconversión es negativa, mientras que cuando T está unida a A es positiva. Esta definición de la coordenada de interconversión está normalizada. Por razones prácticas, en los cálculos que describiremos en el apartado VII.2 utilizaremos una coordenada de interconversión no normalizada, así como una variable simétrica elíptica diferente. Las definiciones correspondientes se darán en el mencionado apartado.

En las otras dos reacciones químicas estudiadas, las moléculas de CO₂ en la carboxilación o de O₂ en la oxigenación, T, se adicionan sobre un átomo de carbono, A, que actúa como centro aceptor. En este caso la definición de la coordenada de interconversión es diferente. Nosotros hemos escogido una combinación de coordenadas que representan la distancia entre A y T, definidas según:

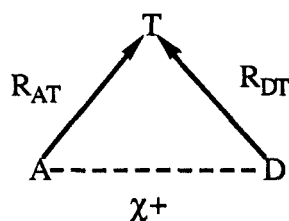
$$\chi^+ = R_{CT} n_{CA} \quad (\text{IV.23})$$

$$\chi^- = \sqrt{(R_{AT} n_{AT})^2 - (R_{AT} n_{CA})^2} \quad (\text{IV.24})$$

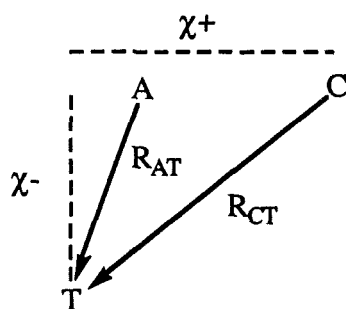
En estas ecuaciones, C representa el átomo de carbono C3 unido al carbono aceptor C2 por un doble enlace. R_{CT} es el vector de posición de T respecto de C, n_{CA} es un vector unitario en la línea que va de C a A, R_{AT} es el vector de posición de T respecto de A y n_{AT} es un vector unitario en la línea que va de A a T. En el Esquema IV.3 se representan todas estas coordenadas.

Puesto que el ET es un punto estacionario su geometría no dependerá del sistema de coordenadas escogido para calcularlo. Sin embargo, una elección adecuada de la coordenada de interconversión facilita su localización.

En los apartados correspondientes del capítulo VII presentamos más detalladamente la definición de la coordenada de interconversión empleada al estudiar cada una de las reacciones químicas catalizadas por la enzima Rubisco.



(a)



(b)

Esquema IV.3 Representación de las coordenadas de interconversión química en un proceso en el que un grupo (T) se transfiere entre dos centros (D y A) (proceso de enolización, (a)), y en los procesos de carboxilación y oxigenación (b) catalizados por la enzima Rubisco.

IV.3.2 COMPLEJOS PRECURSOR Y SUCESOR

En la Figura IV.2 se representa el cruzamiento entre los estados diabáticos de reactivos y productos. En ella se muestra el ET junto con el precursor S_i y el sucesor S_f que se obtienen fijando el valor de χ^+ del ET y dejando optimizar la coordenada χ^- . Los conceptos de complejo precursor (S_i) y sucesor (S_f), ampliamente usados en la teoría de transferencia térmica de electrones elaborada por Marcus^{89,90}, se introducen para describir el paso de interconversión química. Sus estructuras están determinadas por la geometría del punto de silla de índice 1

de la SEP y pertenecen a su zona cuadrática, es decir, poseen una curvatura negativa a lo largo de la dirección del VT o están en la cercanía de los puntos de inflexión. Una vez en el valle de los reactivos se obtiene el complejo de interacción CI1, que corresponde a los reactivos deformados. Similarmente, en el valle de los productos se obtiene el complejo de interacción CI2 que corresponde a los productos deformados.

En el caso de una reacción S_N^2 : $X^- + CH_3Y \rightarrow XCH_3 + Y^-$, estos complejos de interacción son mínimos y corresponden a complejos de interacción ion-dipolo que producen una deformación estructural de los reactivos⁹¹. En nuestro esquema, los complejos precursor y el sucesor se obtendrían fijando la distancia entre X-Y en el ET, χ^+ , y descendiendo hacia los valles de los reactivos y productos, con lo que se llegaría al precursor y al sucesor, respectivamente.

Si llamamos $|i\rangle$ al estado mecanocuántico diabático asociado con los reactivos y $|f\rangle$ al correspondiente a los productos, tomando el concepto de estado mecanocuántico en su sentido más amplio y, por tanto, sin que se encuentre implícita la separación de Born-Oppenheimer, el estado precursor corresponderá a una excitación metaestable de $|i\rangle$ y el sucesor a una excitación metaestable de $|f\rangle$. En un proceso químico en el que una partícula X se intercambia entre un centro dador, D, y uno aceptor, A, para un valor grande y fijo de χ^+ (definida en la ecuación IV.20), el desplazamiento a lo largo de la coordenada χ^- (ecuación IV.22) en el estado de los reactivos corresponde a una disociación del enlace D-X, mientras que en el estado de los productos una disminución de χ^- corresponde a la disociación del enlace A-X. Cada perfil energético tiene un mínimo a las distancias de equilibrio de los enlaces D-X y A-X, respectivamente. Las superficies de ambos estados se cruzan en una serie de puntos que describen una línea, a la que denominamos $E_c(\chi^+, \chi^-)$, que tiene un mínimo debido al hecho de que las curvas se cruzan cada vez a menores energías. Vamos a designar las coordenadas de este mínimo como $\chi^{+\#}$ y $\chi^{-\#}$. Por construcción, en los puntos de cruce las geometrías globales de reactivos y productos son iguales. La proyección de $E_c(\chi^+, \chi^-)$ sobre el plano (χ^+, χ^-) corresponde a la intersección de una hipersuperficie que separa los valles de los reactivos y de los productos. Este tipo de cruzamientos de curvas ya fue descrito por Evans y Polanyi⁹². Por supuesto, si las geometrías internas no son iguales el cruzamiento será sólo aparente.

Si los parámetros geométricos internos del dador y el aceptor se optimizan en los puntos de cruzamiento, entonces en el mínimo de $E_c(\chi^+, \chi^-)$ las geometrías de D y A diferirán de las obtenidas en los estados fundamentales del dador y el aceptor. El perfil energético en función de la coordenada de interconversión χ^- para las geometrías de D y A optimizadas en el punto $(\chi^{+\#}, \chi^{-\#})$ tiene un mínimo a lo largo de ambas direcciones hacia los valles de reactivos y productos. Las energías y geometrías de estos puntos estacionarios constreñidos definen el complejo precursor (en el valle de reactivos) y el sucesor (en el de productos).

La interconversión química sucederá cuando el sistema pierda la memoria del estado precursor y adquiera la del sucesor, en un efecto puramente mecanocuántico que se hace posible si existe un acoplamiento mecanocuántico entre ambos estados. Este acoplamiento es máximo en el punto de cruce y tiene lugar sólo a lo largo de la excitación de la coordenada χ^- . En este sentido, la coordenada de interconversión química es la coordenada de reacción.

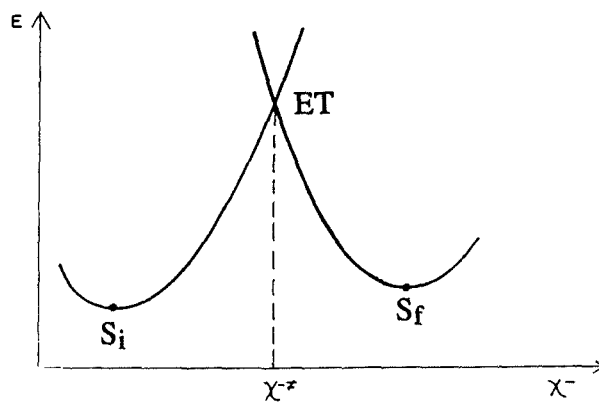
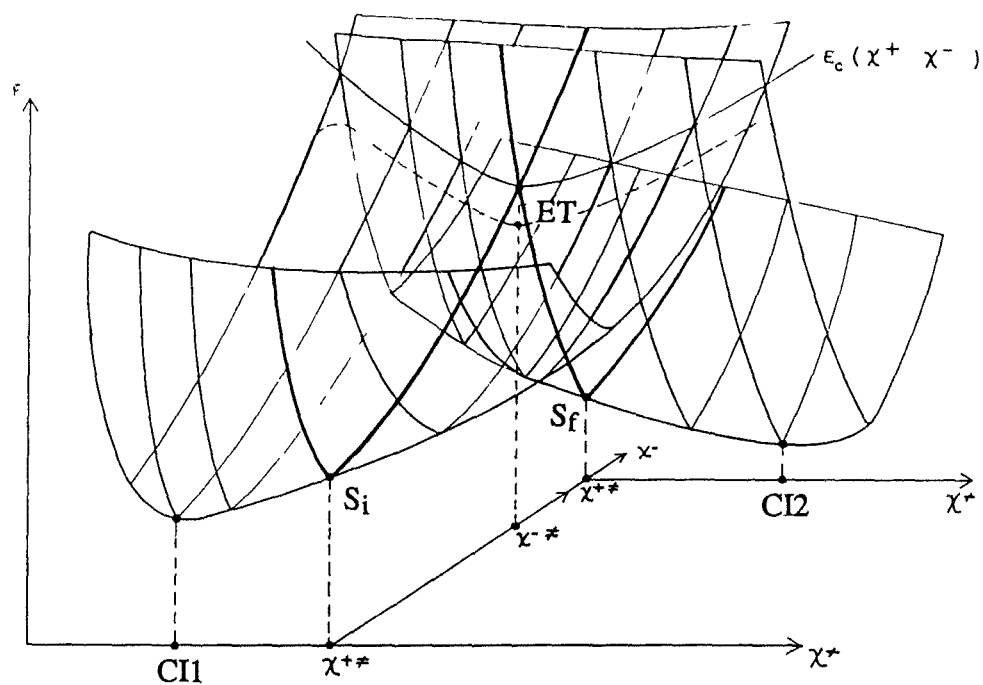


Figura IV.2 Representación del cruce entre los estados diabáticos pertenecientes a los valles de reactivos y productos. Mediante líneas discontinuas se muestran los perfiles adiabáticos. En la práctica, el punto de silla de orden uno (ET) es el que puede calcularse mediante técnicas de computación. Para construir las geometrías de los complejos precursores y sucesores, el sistema adiabático se minimiza con respecto a χ^- .

IV.3.3 ESPACIO ACTIVO Y CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE TRANSICIÓN

El esquema teórico adiabático puede describirse como una separación local de la matriz de Hessian (H) en dos subespacios, proyectada sobre las variables geométricas internas. El procedimiento debe entenderse como una construcción local, ya que las longitudes de enlace, ángulos y ángulos dihedros no pueden formar un sistema de coordenadas para la configuración espacial total^{93,94}. Así, para un punto de silla de índice uno, las variables que tienen asociadas componentes distintas de cero en el vector propio asociado con el único valor propio negativo definen el espacio de control, H_{cc} . Las otras forman el espacio complementario H_{mm} :

$$H = \begin{vmatrix} H_{cc} & H_{cm} \\ H_{mc} & H_{mm} \end{vmatrix} \quad (\text{IV.25})$$

Los elementos H_{cm} y H_{mc} son las derivadas cruzadas de la energía potencial respecto a las coordenadas que pertenecen a los subespacios de control y complementario. Una separación correcta implica que deben ser despreciables respecto a los elementos H_{cc} . En los casos prácticos esto se comprueba numéricamente buscando el número mínimo de coordenadas internas que proporcionan un único valor propio negativo y un VT que describa la interconversión química.

Las coordenadas que experimentan grandes cambios son consideradas en el subespacio de control. En este subespacio se encontrarán las coordenadas asociadas con los enlaces que se forman y se rompen en el proceso químico y que, por tanto, controlan el desarrollo de la reacción. El resto de las coordenadas que definen el sistema se encuentran asociadas a fragmentos moleculares que no experimentan apenas variación en la transformación desde reactivos hasta productos y forman el espacio complementario. De esta manera, el espacio de control está formado por las variables geométricas que participan de forma significativa en el vector de transición. Dentro de este subespacio se escoge una coordenada o una combinación de varias (las que mayores cambios experimentan

en el proceso) como la coordenada de interconversión química, que estará directamente relacionada con los enlaces que se rompen y se forman y jugará el papel de coordenada de reacción.

Con esta separación del espacio, una vez definida la coordenada de interconversión química χ^- , puede escribirse para el funcional de la energía la expresión siguiente:

$$V(\chi^-) = \min_{q_1, \dots, q_{n-1}} [E(q_1, q_2, \dots, q_{n-1}, \chi^-)] \quad (\text{IV.26})$$

que corresponde con la proyección sobre el plano (E, χ^-) y conecta los complejos precursor y sucesor vía el ET; E es la energía potencial. El procedimiento de optimización se realiza por pasos utilizando un funcional auxiliar que, en el caso de un espacio de control que tiene $m < n$ variables puede escribirse como:

$$Q(\chi^-) = \min_{q_1, \dots, q_{m-2}, \chi^+} [E(q_1, \dots, q_{m-2}, \chi^+, \chi^-, q_{m+1}(\chi^-), \dots, q_n(\chi^-))] \quad (\text{IV.27})$$

donde $q_{m+1}(\chi^-), \dots, q_n(\chi^-)$, son los valores de equilibrio en el espacio complementario para un valor dado de la variable χ^- . Representan, por ejemplo, distancias de equilibrio, ángulos y ángulos dihedros de fragmentos moleculares no directamente relacionados en el proceso de interconversión química. La matriz Z se define de modo conveniente de manera que las coordenadas χ^+ y χ^- aparezcan explícitamente. En general, se cumple que $Q(\chi^-)$ es mayor que $V(\chi^-)$ en valor absoluto. Una vez realizada la optimización, las coordenadas del espacio complementario para el ET tienen asociada una fuerza cero sobre los átomos, con lo cual se tiene que:

$$Q(\chi^{-TS}) = V(\chi^{TS}) \quad (\text{IV.28})$$

Por lo tanto, la localización del ET con el empleo del funcional aproximado Q asegura que el punto estacionario encontrado es el mismo que el que se encuentra con el funcional completo V.

La elección de la coordenada de interconversión química es esencial para obtener un camino de reacción continuo y que pase por el ET. Con ese fin, χ^- debe cumplir las siguientes condiciones:

a) debe variar siempre en el mismo sentido desde el valor que tiene en los reactivos al valor que tiene en los productos, de manera que su valor en los reactivos debe diferir significativamente de su valor en los productos. Es decir:

$$\chi^{-R} < \chi^{-ET} < \chi^{-P} \quad \text{o bien} \quad \chi^{-R} > \chi^{-ET} > \chi^{-P} \quad (\text{IV.29})$$

b) debe estar formada por una combinación de las variables geométricas que más varían en el transcurso de la reacción y que representan a los enlaces que se forman y se rompen en ella y debe ser la componente mayoritaria del vector de transición;

c) el desplazamiento a lo largo del eje definido por la coordenada de interconversión química ha de reflejar todas las variaciones que se producen en los grados de libertad que experimentan cambios sustanciales en sus constantes de fuerza. Por tanto, la coordenada de interconversión química es la coordenada de máxima información sobre la que se puede observar el transcurso de la reacción;

d) su dirección debe simular físicamente el movimiento de vibración que debe realizar el sistema en el ET cuando se produce el paso desde reactivos a productos;

e) el espacio de control debe estar formado por un número suficiente de variables que aseguren un único valor propio en la matriz de constantes de fuerza.

Una vez que se ha encontrado el ET, se analizan sus propiedades, con el objetivo de verificar que dicha estructura corresponde, efectivamente, con el verdadero estado de transición (ver sección III.3.1) y que se ha llevado a cabo una correcta separación de las variables en los dos subespacios. Este método es el que hemos empleado en la presente Tesis Doctoral.

Referencias

- (1) Whitesides, G. M.; Wong, C. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 617.
- (2) Aitken, D. J.; Alijah, R.; Onyiriuka, S. O.; Suckling, C. J.; Wood, H. C. S.; Zhu, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 597.
- (3) Jones, J. B. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3351.
- (4) Klibanov, A. M. *Trends. Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141.
- (5) Klibanov, A. M. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114.
- (6) Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, P. A.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094.
- (7) Kitaguchi, H.; Itoh, I.; Ono, M. *Chem. Lett.* **1990**, 1203.
- (8) Sakurai, T.; Margolin, A. L.; Rusell, A. J.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7236.
- (9) Chen, C. S.; Sih, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695.
- (10) Yamada, H.; Shimizu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 622.
- (11) Taylor, S. J. C.; Ribbons, D. W.; Slawin, A. M. Z.; Widdowson, D. A.; Williams, D. J. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 6391.
- (12) Corey, E. J.; Imai, N.; Zhang, H. G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 728.
- (13) Gao, Y.; Hanson, R. M.; Kluender, J. M.; Ko, S. Y.; Masumune, K.; Shraples, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- (14) Suckling, C. J. In *Enzyme chemistry. Impact and applications*; C. J. Suckling, Ed.; Chapman and Hall: London, 1990; pp 1-7.
- (15) Fisher, E. *Chem. Ber.* **1894**, *27*, 2985.
- (16) Hoesh, K. *Chem. Ber.* **1921**, *54*, 375.
- (17) Kluger, R. In *Enzyme chemistry. Impact and applications*; C. J. Suckling, Ed.; Chapman and Hall: London, 1990; pp 8-49.
- (18) Ingold, C. K. *Structure and mechanism in organic chemistry*; Cornell university Press: Ithaca, N. Y., 1953.
- (19) Hammett, L. P. *Physical organic chemistry*; McGraw-Hill: New York, 1970.

- (20) Haldane, J. B. S. *Enzymes*; Longmans Green; reimprimido por MIT Press, Cambridge, 1965: London, 1930.
- (21) Eyring, H. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 107.
- (22) Pauling, L. *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
- (23) Pauling, L. *Nature* **1948**, *161*, 707.
- (24) Pauling, L. *Am. Sci.* **1948**, *36*, 51.
- (25) Jencks, W. P. *Binding energy, specificity, and enzymic catalysis: The Circe Effect*; John Wiley & Sons: 1975; Vol. 43.
- (26) Jencks, W. P. *Catalysis in chemistry and enzymology*; Dover Publications Inc.: New York, 1987.
- (27) Fersht, A. *Enzyme Structure and Mechanism*; W. H. Freeman and Co.: New York, 1984.
- (28) Showen, R. L. In *Transition states of biochemical processes*; R. D. Gandour and R. L. Showen, Ed.; Plenum Press: New York, 1978; pp 77-114.
- (29) Koshland, D. E. *Biol. Rev.* **1953**, *28*, 416.
- (30) Warshel, A. *Biochemistry* **1981**, *20*, 3167.
- (31) Tramontano, A.; Janda, K. D.; Lerner, R. A. *Science* **1988**, *234*, 1566.
- (32) Schultz, P. G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 1283.
- (33) Khalaf, A. I.; Proctor, G. R.; Suckling, C. J.; Bence, L. H.; Irvine, J. J.; Stimson, W. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 1475.
- (34) Lerner, R. L.; Tramontano, A. *Trends Biochem. Sci.* **1987**, *12*, 427.
- (35) Khalaf, A. I.; Proctor, G. R.; Suckling, C. J.; Bence, L. H.; Irvine, J. J.; Stimson, W. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**, 1465.
- (36) Schultz, P. G.; Lerner, R. A. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 391.
- (37) Danishefsky, S. *Science* **1993**, *259*, 469.
- (38) Janda, K. D.; Shevlin, C. G.; Lerner, R. A. *Science* **1993**, *259*, 490.
- (39) Lerner, R. A.; Benkovic, S. J.; Schultz, P. G. *Science* **1991**, *252*, 659.
- (40) Stewart, J. D.; Liotta, L. J.; Benkovic, S. J. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 396.
- (41) Rich, D. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 263.
- (42) Thaisrivongsa, S.; Pals, D.; Kroll, L. T.; Turner, S. R.; Han, F. S. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 976.

- (43) Luly, J. R.; BaMaung, N.; Soderquist, J.; Fung, A. K.; Stein, H.; Hollis, D. K.; Marcotte, P. A.; Egan, D. A.; Bopp, B.; Ilmar, M.; Bolis, G.; Greer, J.; Perun, T. J.; Plattner, J. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2264.
- (44) Stewart, J. D.; Benkovic, S. J. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 213.
- (45) Newell, J. *New Scientist* **1990**, *125*, 38.
- (46) Shaik, S. S.; Schlegel, H. B.; Wolfe, S. *Theoretical aspects of physical organic chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1992.
- (47) Hirst, D. M. *A computational approach to chemistry*; Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1990.
- (48) Albery, W. J. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1993**, *28*, 139.
- (49) Gold, V. *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 1281.
- (50) Kreevoy, M. M.; Truhlar, D. G. In *Techniques of chemistry*; C. F. Bernasconi, Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1986; Vol. 6; pp 14-87.
- (51) Kraut, J. *Science* **1988**, *242*, 533.
- (52) Truhlar, D. G.; Hase, W. L.; Hynes, J. T. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 2664.
- (53) Tucker, S. C.; Truhlar, D. G. In *New theoretical concepts for understanding organic reactions*; J. Bertrán and I. G. Csizmadia, Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1989; Vol. C267; pp 291-346.
- (54) Johnston, H. S. *Gas phase reaction rate theory*; Ronald Press: New York, 1966.
- (55) Truhlar, D. G.; Garrett, B. C. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 440.
- (56) Miller, W. H. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 174.
- (57) Voth, G. A. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 8365.
- (58) Kurz, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 987.
- (59) Wolfenden, R. *Nature* **1969**, *223*, 704.
- (60) Wolfenden, R. *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 10.
- (61) Wolfenden, R. *Mol. Cell. Biochem.* **1974**, *3*, 207.
- (62) Lienhard, G. E. *Annu. Rep. Med. Chem.* **1972**, *7*, 249.
- (63) Lienhard, G. E. *Science* **1973**, *180*, 149.
- (64) Jencks, W. P. In *Advances in enzymology and other related areas of molecular biology*; A. Meister, Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1975; Vol. 43; pp 219-410.

- (65) Koshland Jr., D. E.; Neet, K. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1968**, *37*, 359.
- (66) Wolfenden, R.; Frick, L. In *Enzyme mechanisms*; M. I. Page and A. Williams, Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 1987; pp 97-122.
- (67) Kraut, J. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 331.
- (68) Schray, K.; Klinman, J. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *57*, 641.
- (69) Wolfenden, R. *Annu. Rev. Biophys.* **1976**, *5*, 271.
- (70) Wolfenden, R.; Frick, L. *J. Protein Chem.* **1986**, *5*, 147.
- (71) Edwards, P. D.; Hesp, B.; Trainor, D. A.; Willard, A. K. In *Enzyme chemistry. Impact and applications*; Segunda ed.; C. J. Suckling, Ed.; Chapman and Hall: London, 1990; pp 171-226.
- (72) Fersht, A. *Enzyme structure and mechanism*; Segunda ed.; W. H. Freeman & Co.: New York, 1985.
- (73) Albery, W. J.; Knowles, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 285.
- (74) Carter, P.; Wells, J. A. *Nature* **1988**, *332*, 564.
- (75) Bernhard, S. A. In *Chemical approaches to understanding enzyme catalysis*; B. S. Green, Y. Ashani and D. Chipman, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1982; pp 237-252.
- (76) Birkoft, J. J.; Banaszak, L. J. In *Peptide and protein reviews*; M. T. W. Hearn, Ed.; Dekker: New York, 1984; Vol. 4; pp 1-46.
- (77) Williams, I. H. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 277.
- (78) Hwang, J. K.; Chu, Z. T.; Yadav, A.; Warshel, A. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 8445.
- (79) Daggett, V.; Schröder, S.; Kollman, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8926.
- (80) Warshel, A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 230.
- (81) Tapia, O.; Jacob, O.; Colonna, F. *Theor. Chim. Acta* **1993**, *85*, 217.
- (82) Tapia, O.; Andrés, J.; Cárdenas, R. *Chem. Phys. Letters* **1992**, *189*, 395.
- (83) Knowles, J. R.; Albery, W. J. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5627.
- (84) Knowles, J. R.; Albery, W. J. *Acc. Chem. Res.* **1977**, *10*, 105.

- (85) Tapia, O.; Cárdenas, R.; Andrés, J.; Colonna-Cesari, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4046.
- (86) Tapia, O.; Cárdenas, R.; Andrés, J.; Krechl, J.; Campillo, M.; Colonna-Cesari, F. *Int. J. Quantum. Chem.* **1991**, *39*, 767.
- (87) Andrés, J.; Safont, V. S.; Martins, J. B. L.; Beltrán, A.; Moliner, V. J. *Mol. Struct. THEOCHEM* **1994**, en prensa.
- (88) Andrés, J.; Moliner, V.; Safont, V. S. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, en prensa.
- (89) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2610.
- (90) Bolton, J. R.; Archer, M. D. In *Electron Transfer in Inorganic, Organic, and Biological Systems*; J. R. Bolton, N. Mataga and G. McLendon, Ed.; American Chemical Society: 1991; pp 7-23.
- (91) Hu, W.-P.; Truhlar, D. G. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1049.
- (92) Evans, M. G.; Polanyi, M. *Disc. Faraday Soc.* **1937**, 11.
- (93) Mezey, P. G. *Theoret.Chim.Acta (Berl.)* **1980**, *54*, 95.
- (94) Mezey, P. G. In *Computational theoretical organic chemistry*; I. G. Csizmadia and R. Daudel, Ed.; 1981; pp 101-128.

V. MÉTODOS TEÓRICOS

De acuerdo con los postulados de la mecánica cuántica, resolviendo la ecuación de Schrödinger para una molécula se obtendría toda la información respecto a ella. Sin embargo, la ecuación de Schrödinger sólo puede resolverse exactamente para un número muy limitado de sistemas simples y el uso de la mecánica cuántica para obtener una descripción de la molécula está basado en un cierto número de aproximaciones.

Como hemos indicado en el capítulo III, las dos primeras aproximaciones que se aplican son:

a) se considera que el potencial es independiente del tiempo, con lo cual se obtiene la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ecuación III.4). Esta ecuación no puede resolverse exactamente para sistemas multielectrónicos, con lo que es necesaria la utilización de una segunda aproximación:

b) se considera por separado el movimiento electrónico y el movimiento nuclear (aproximación de Born-Oppenheimer o adiabática), con lo que se

obtiene la ecuación de Schrödinger electrónica independiente del tiempo (ecuación III.8). Pero ésta tampoco puede resolverse exactamente, de modo que hay que utilizar métodos que permitan obtener soluciones aproximadas. La elección del método mecanocuántico adecuado sigue siendo motivo de controversias^{1 4}.

Existe un gran número de teorías mecanocuánticas que permiten el cálculo de propiedades y estructuras moleculares, aunque los métodos más utilizados⁵ de la química cuántica están basados en la teoría de orbitales moleculares⁶. En ellos basaremos los cálculos que presentamos en esta Tesis Doctoral.

La forma de la SEP que representa un sistema reactivo puede depender del método utilizado para calcular la energía del sistema y, por lo tanto, las conclusiones teóricas respecto al mecanismo de la reacción, o reacciones, pueden ser diferentes según el tipo de aproximaciones utilizadas en los cálculos. En principio, la utilización de una base extendida en cálculos no empíricos que tengan en cuenta la correlación electrónica y las correcciones para los efectos relativísticos proporcionaría las predicciones teóricas más exactas. Pero, a efectos prácticos, ese tipo de cálculos están limitados a sistemas que contengan como mucho tres o cuatro átomos pesados (elementos del segundo periodo del sistema periódico o mayores). De modo que, en la práctica, nos enfrentamos a la siguiente disyuntiva: elegir un método de cálculo riguroso aplicable a sistemas muy limitados o elegir métodos aproximados que pueden aplicarse a sistemas más grandes.

Sea cual sea el método elegido, deben satisfacerse algunos requerimientos antes de que los resultados obtenidos en los cálculos puedan ser correctamente interpretados. El método utilizado debe reproducir: a) las energías relativas de reactivos y productos de una reacción; b) la curvatura de la SEP en las zonas de los puntos estacionarios que correspondan a reactivos, productos y ET y c) las características geométricas de los tres. Muchos de los métodos químico cuánticos modernos, especialmente los semiempíricos, se han diseñado con el fin específico de calcular algunas propiedades particulares de sistemas moleculares, con lo que resultan adecuados para reproducir sólo uno o dos de los requerimientos mencionados. Por esa razón, las conclusiones obtenidas mediante

estos métodos respecto a los mecanismos de las reacciones químicas deben ser analizados con cuidado.

La teoría y los desarrollos matemáticos empleados en los diferentes esquemas de cálculo utilizados en química cuántica se han estudiado con gran detalle en diversos libros⁷⁻¹³ y artículos monográficos¹⁴⁻¹⁶. En el presente capítulo de esta memoria presentaremos brevemente los diferentes métodos de cálculo que utilizamos, clasificándolos en dos: el método *ab initio* y los diferentes métodos semiempíricos. Ambos están basados en la teoría de orbitales moleculares y permiten calcular la energía de un sistema en función de su geometría. La principal diferencia entre ellos es que los semiempíricos utilizan extensamente datos experimentales para descartar o asignar términos de las ecuaciones matemáticas que utilizan, mientras que el *ab initio* realiza los cálculos completos mediante técnicas numéricas o analíticas y la precisión con que dichos cálculos se realizan está limitada sólo por el programa y el ordenador utilizados.

En los cálculos de estructuras de transición que se presentan en el capítulo VII (apartados VII.2 y siguientes) el objetivo es el cálculo de la geometría y por tanto de la estructura de dicho ET, así como la obtención del VT asociado. Como han demostrado Levy y Perdew¹⁷, los cálculos *ab initio* reproducen los parámetros geométricos con un nivel de exactitud aceptable que no se ve sustancialmente incrementado con la inclusión de correlación electrónica o el empleo de funciones de onda multideterminantes. En cambio, en los cálculos del apartado VII.1 se pretende calcular la energía y, consecuentemente, se ha incluido la correlación electrónica y se han empleado funciones de onda multideterminantes.

V.1 MÉTODOS *AB INITIO*

Como ya hemos dicho, tanto los métodos *ab initio* como los semiempíricos están basados en la teoría de orbitales moleculares. Esta teoría es una aproximación que utiliza funciones monoeléctricas u orbitales para obtener la función de onda.

La función de onda completa para un electrón es el producto del orbital molecular por la función de spin, $\psi(x,y,z)\alpha(\xi)$ o $\psi(x,y,z)\beta(\xi)$. Ese producto es un spin-orbital, $\chi(x,y,z,\xi)$. Para un sistema de N electrones, la función de onda completa será una función de todas las coordenadas. Si llamamos \mathbf{x} a las cuatro coordenadas (las tres cartesianas y la de spin) de las que es función cada spin-orbital, entonces la función de onda de un sistema de N electrones será $\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)$. Esta función de onda debe ser antisimétrica respecto al intercambio de las coordenadas \mathbf{x} de dos electrones cualesquiera; esto es consecuencia del principio de exclusión de Pauli¹⁸:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_N) = -\Psi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_N) \quad (\text{V.1})$$

Para cumplir esta condición, la función de onda completa se escribe en forma de determinante:

$$\Psi = [(2n)!]^{-1/2} \begin{vmatrix} \psi_1(1)\alpha(1) & \psi_1(1)\beta(1) & \dots & \psi_n(1)\beta(1) \\ \psi_1(2)\alpha(2) & \psi_1(2)\beta(2) & \dots & \psi_n(2)\beta(2) \\ \psi_1(3)\alpha(3) & \psi_1(3)\beta(3) & \dots & \psi_n(3)\beta(3) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \psi_1(2n)\alpha(2n) & \psi_1(2n)\beta(2n) & \dots & \psi_n(2n)\beta(2n) \end{vmatrix} \quad (\text{V.2})$$

El determinante V.2 se conoce como determinante de Slater^{19,20}. En la ecuación V.2, $2n=N$, donde N es el número de electrones y, por tanto, n el número de orbitales moleculares ocupados. Es decir, esta ecuación sirve para construir funciones de onda de sistemas polielectronicos que tengan un número

par de electrones y la capa cerrada (todos los electrones emparejados con spines antiparalelos).

En las aplicaciones prácticas se impone una restricción más, según la cual los orbitales moleculares individuales se expresan como combinaciones lineales de funciones monoeléctricas, llamadas funciones de base:

$$\psi_i = \sum_{\mu=1}^n c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (\text{V.3})$$

donde $c_{\mu i}$ son los coeficientes de expansión de los orbitales moleculares. En versiones cualitativas de la teoría de orbitales moleculares se utilizan los orbitales atómicos como funciones de base. Este tratamiento se conoce como teoría de combinaciones lineales de orbitales atómicos (CLOA). Sin embargo, en tratamientos más generales se emplean funciones apropiadamente definidas como funciones de base, asociadas con los núcleos y con las propiedades simétricas de los orbitales atómicos. De estas funciones de base, dos clases han sido utilizadas ampliamente: los orbitales tipo Slater (STO) proporcionan una razonable descripción de los orbitales atómicos con valores de ξ estándar recomendados por Slater²¹, sin embargo su uso está limitado porque no son muy apropiadas para los cálculos numéricos. Los orbitales tipo gaussian (GTO), introducidos por Boys²², aunque representan peor los orbitales atómicos que los STO, tienen la ventaja de que todas las integrales de los cálculos pueden evaluarse analíticamente sin necesidad de realizar una integración numérica.

Una tercera posibilidad es utilizar combinaciones lineales de funciones gaussianas para obtener las funciones de base. En ese caso, las funciones de base obtenidas se llaman gaussianas contraídas y las funciones que se emplean para hacer la combinación lineal se llaman gaussianas primitivas.

Para fijar los coeficientes de expansión se utiliza la teoría de Hartree-Fock, basada en el método variacional de la mecánica cuántica²³. Si Φ es una función antisimétrica y normalizada de las coordenadas electrónicas, puede obtenerse la energía correspondiente mediante la integral:

$$E' = \int \Phi^* \hat{H} \Phi d\tau \quad (\text{V.4})$$

Puede demostrarse que $E' > E$, la energía que se obtendría si Φ fuera Ψ , la función de onda exacta. Entonces se selecciona un conjunto de coeficientes de expansión y se minimiza el valor de E' respecto a ellos, según las ecuaciones variacionales:

$$\frac{\partial E'}{\partial c_\mu} = 0 \quad (\text{V.5})$$

La ecuación V.5 lleva a una serie de ecuaciones algebraicas para $c_{\mu i}$, que fueron derivadas por Roothaan²⁴ y por Hall²⁵ de forma independiente de la función de onda de capa cerrada representada por la ecuación V.2. Las ecuaciones de Roothaan-Hall son:

$$\sum_{v=1}^N (F_{\mu v} - \epsilon_i S_{\mu v}) c_{v i} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, N \quad (\text{V.6})$$

donde ϵ_i es la energía monoeléctronica del orbital molecular ψ_i , $S_{\mu\nu}$ son elementos de una matriz cuadrada N-dimensional llamada matriz de solapamiento y $F_{\mu\nu}$ son elementos de otra matriz cuadrada N-dimensional, la matriz de Fock:

$$S_{\mu\nu} = \int \phi_\mu^*(1) \phi_\nu(1) dx_1 dy_1 dz_1 \quad (\text{V.7})$$

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^{core} + \sum_{\lambda=1}^N \sum_{\sigma=1}^N P_{\lambda\sigma} [(\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\lambda|\nu\sigma)] \quad (\text{V.8})$$

En la ecuación V.8 $H_{\mu\nu}^{core}$ es una matriz que representa la energía de un electrón en un campo de núcleos. Sus elementos son:

$$H_{\mu\nu}^{core} = \int \phi_\mu^*(1) \hat{H}^{core}(1) \phi_\nu(1) dx_1 dy_1 dz_1$$

$$\hat{H}^{core}(1) = -\frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + \frac{\partial^2}{\partial y_1^2} + \frac{\partial^2}{\partial z_1^2} \right) - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad (\text{V.9})$$

En V.9 Z_A es el número atómico del átomo A y la suma se extiende a todos los átomos. Las cantidades $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ que aparecen en V.8 son integrales de repulsión bielectrónicas:

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \iint \phi_\mu^*(1)\phi_\nu(1)\left(\frac{1}{r_{12}}\right)\phi_\lambda^*(2)\phi_\sigma(2)dx_1dy_1dz_1dx_2dy_2dz_2 \quad (\text{V.10})$$

Estas integrales están multiplicadas por los elementos de la matriz de densidad monoeléctrica, $P_{\lambda\sigma}$:

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_{i=1}^{oc} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (\text{V.11})$$

La suma se realiza sólo sobre los orbitales moleculares ocupados. El factor 2 indica que dos electrones ocupan cada orbital molecular.

La energía electrónica se calcula según:

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N P_{\mu\nu} (F_{\mu\nu} + H_{\mu\nu}^{core}) \quad (\text{V.12})$$

que, sumada a la energía de repulsión internuclear, dada en V.13, proporciona la energía total.

$$E_m = \sum_A^M \sum_B^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad \forall A < B \quad (\text{V.13})$$

Las ecuaciones de Roothaan-Hall (ecuaciones V.6) no son lineales, dado que la matriz de Fock depende de los coeficientes de los orbitales moleculares, $c_{\mu i}$ a través de la matriz de densidad (ecuación V.11). Su solución necesariamente pasa por un proceso iterativo. Así, puesto que los orbitales moleculares resultantes se derivan de su propio potencial efectivo, la técnica se denomina frecuentemente teoría del campo autoconsistente (SCF).

V.1.1 FUNCIONES DE ONDA SCF

Los tipos de funciones de onda SCF, también conocidas como Hartree-Fock, son tres:

a) Hartree-Fock restringido (RHF)²⁴ de capa cerrada, representada por la ecuación V.2 a la que se aplican las ecuaciones que hemos indicado para el cálculo de la energía y los coeficientes. Todos los orbitales están doblemente ocupados y, por tanto, los spin-orbitales alfa son los mismos que los spin-orbitales beta (ver Figura V.1):

$$\Psi = |\psi_1^2 \psi_2^2 \psi_3^2 \dots \psi_n^2| \quad (\text{V.14})$$

b) Hartree-Fock no restringido (UHF)²⁶ de capa abierta. Se supone que en el sistema todos los orbitales están ocupados por un sólo electrón, de modo que los spin-orbitales alfa son distintos de los spin-orbitales beta (Figura V.1):

$$\Psi = |\psi_1^\alpha \psi_2^\beta \psi_3^\alpha \psi_4^\beta \dots \psi_n^\beta| \quad (\text{V.15})$$

c) Hartree-Fock restringido de capa abierta (ROHF)²⁷. Se supone que algunos orbitales están ocupados por dos electrones y otros sólo por uno, siempre con el mismo spin (Figura V.1):

$$\Psi = |\psi_1^2 \psi_2^2 \dots \psi_n^2 \psi_{n+1}^\alpha \dots \psi_m^\alpha| \quad (\text{V.16})$$

Dependiendo del problema que se quiera resolver, se utilizará la función de onda que mejor describa al sistema.

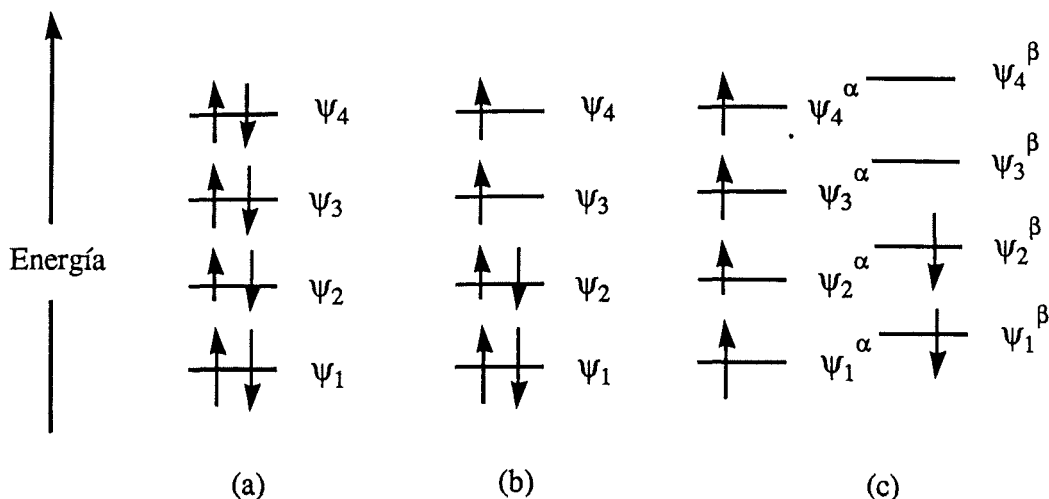


Figura V.1 Diagrama de configuración electrónica para: (a) un sistema de capa cerrada, descrito por una función de onda RHF; (b) un sistema de capa abierta, descrito por una función de onda ROHF; (c) un sistema de capa abierta, descrito por una función de onda UHF.

Los sistemas de capa abierta no son correctamente descritos mediante la utilización de un sólo determinante de Slater (ecuación V.2), sino que requieren el empleo de varios determinantes, que se combinarían linealmente para obtener la función de onda:

$$\Psi = b_1\Psi_1 + b_2\Psi_2 + \dots \quad (\text{V.17})$$

con todas las posibles distribuciones de los electrones desemparejados sobre la zona de orbitales parcialmente ocupados. Sin embargo, en el caso de radicales y de los estados de más baja energía de sistemas con multiplicidad $(p-q+1)$, donde p y q son el número de electrones con espines α y β , respectivamente, y $p > q$, la función de onda puede expresarse con un buen grado de aproximación mediante un sólo determinante.

Como hemos visto, la extensión a sistemas de capa abierta del método Hartree-Fock puede hacerse de dos maneras: la teoría ROHF y la UHF. En la primera, los coeficientes $c_{\mu i}$ siguen estando definidos mediante la ecuación V.3 y sus valores óptimos se obtienen también de las condiciones variacionales. Sin embargo, los detalles son más complicados dado que se aplican diferentes