

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



LA NITROGENASA DESDE EL PUNTO
DE VISTA BIOINORGANICO

ZARATE AQUINO MA. DE LOS ANGELES VICTORIA

Q U I M I C O

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS TESIS 1979
ABG M. T. ~~27~~ ~~28~~ 370
FECHA _____
REC. _____
o _____



PRESIDENTE, Profra. ALICIA BENITEZ DE ALTAMIRANO
VOCAL Profra. MA. DEL CONSUELO HIDALGO MONDRAGON
SECRETARIO Profra. MARTHA RODRIGUEZ PEREZ
• 1er. SUPLENTE Profr. GUILLERMO BARRAZA ORTEGA
• 2o. SUPLENTE Profr. EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ

FACULTAD DE QUIMICA

SUSTENTANTE:

ZARATE AQUINO MA. DE LOS ANGELES VICTORIA M. Zarate de Quino

ASESOR DEL TEMA:

PROFRA. MARTHA RODRIGUEZ PEREZ Rodriguez P

Respetuosamente:

a la memoria de mi Padre,

a mis hijos: Jesús y G. Rodrigo,

a mi Madre,

a mi esposa,

y a mis hermanos,

I N D I C E

CAPITULO I

Características de los iones metálicos biológicamente importantes.	pág. 3
Bibliografía.13

CAPITULO II

Factores que gobiernan la reactividad y estabilidad de los complejos	14
Bibliografía.	30

CAPITULO III

El molibdeno en la nitrogenasa	
Introducción.	32
El Ciclo del Nitrógeno	33
Propiedades del nitrógeno	34
Propiedades del molibdeno	35
Propiedades fisicoquímicas de la nitrogenasa	37
Requerimiento de ATP	41
Donadores electrónicos	42
Inhibidores	43
El mecanismo de la fijación del nitrógeno	44
Complejos de metales de transición con nitrógeno molecu- lar	54
Conclusiones	60
Bibliografía	62

INTRODUCCION

Se ha observado que cerca de veinte elementos son indispensables para la vida, si bien la materia viviente contiene trazas de todos los elementos a su alrededor.

Los principales constituyentes de los seres vivos -- son: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Elementos como el fósforo , azufre, cloro, sodio, potasio, magnesio y calcio son necesarios, en cantidades menores, para los seres vivos, así como trazas de manganeso, fierro, cobre, cobalto, molibdeno, bo--ro, y silicio.

El objetivo de este trabajo es presentar en los dos -- primeros capítulos las características principales por las que elementos como el calcio, cobre, cinc, molibdeno y los de la -- primera serie de transición, en forma de iones, son capaces de:

- 1) actuar como cofactores de encimas o
- 2) constituir las metaloproteínas y metaloencimas mediante diferentes tipos de uniones ya sea con proteínas o encimas, respectivamente.

En el tercer capítulo, a manera de ejemplo, se presenta una revisión de los trabajos realizados en la nitrogenasa, - en donde el molibdeno es el elemento de transición responsable de su actividad natural que es la fijación del nitrógeno atmosférico en forma de amoníaco que es una sustancia asimilable por las plantas para su nutrición.

Se ofrece una revisión de los trabajos realizados por investigadores interesados en desenmarañar el enigma que toda--vía significa la estructura de la nitrogenasa, el estado de oxiu

dación del molibdeno en la encima en su forma activa y los mecanismos de acción más probables por los que puede llevar a cabo su función tan importante.

CAPITULO I

CARACTERISTICAS DE LOS IONES METALICOS BIOLOGICAMENTE IMPORTANTES.

Los iones metálicos biológicamente importantes son, - además del Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} , los de la primera serie de transición, principalmente,

TABLA I-1

Ión	Configuración	Ión	Configuración
Ca^{2+}	$3d^0$	Fe^{2+}	$3d^6$
Sc^{2+}	$3d^1$	Co^{2+}	$3d^7$
Ti^{2+}	$3d^2$	Ni^{2+}	$3d^8$
V^{2+}	$3d^3$	Cu^{2+}	$3d^9$
Cr^{2+}	$3d^4$	Zn^{2+}	$3d^{10}$
Mn^{2+}	$3d^5$		

Tabla I-1.- Configuraciones electrónicas de - los iones metálicos de la primera serie de -- transición. Se incluyen Ca^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} .

Las diferencias en la estructura electrónica que distingue a los elementos de transición de los demás son, principalmente: estado de oxidación variable, formación de complejos y actividad catalítica.

ESTADO DE OXIDACION VARIABLE.-

Los elementos de transición tienen, usualmente, electrones de valencia en varios orbitales de diferentes energías pero comparables entre sí (por ejemplo $3d$ $4s$ $4p$) porlo que existe la posibilidad de que un número variable de electrones parti-

cipe en la unión y dé como resultado una variedad de estados de oxidación.

El estado de oxidación más alto posible está dado por el número total de electrones $N = ns + (n-1)d$.

FORMACION DE COMPLEJOS.-

Los cationes de metales de transición ejercen fuertes atracciones electrostáticas sobre moléculas o iones que contienen pares de electrones disponibles. Dichas moléculas se conocen como ligandos y los átomos individuales que poseen el par electrónico disponible se conocen como átomos donadores. El conjunto se conoce como compuesto de coordinación o complejo. El número de coordinación denota el número de átomos donadores asociados con el átomo central y la forma o estereoquímica del complejo depende de este número de coordinación.

En un complejo, la isomería depende de los distintos ligandos que entren en la esfera de coordinación.

Los isómeros configuracionales tienen la misma composición química y difieren en la permutación del ligando.

Los isómeros conformacionales difieren en los ángulos de torsión de los átomos en el mismo ligando:

1).- Diastereoisómeros.- Tienen distintas propiedades físicas y químicas y se pueden separar por cristalización fraccionada, cromatografía, etc.

2).- Isómeros ópticos.- son como imágenes reflejadas en un espejo, que no se pueden superponer y por lo tanto siempre hay dos de ellos: no puede haber menos ni más.

Los diastereoisómeros se clasifican en:

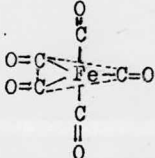
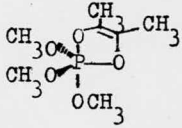
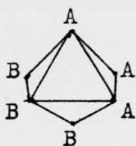
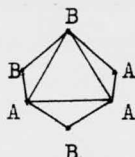
Número de Coordinación	Hibridación de Orbitales	Geometría	Ejemplos
2	sp	Lineal	HC CH, $[\text{H}_3\text{N}-\text{Ag}-\text{NH}_3]^+$
3	sp ²	Planar trigonal	H ₂ CO, CH ₃ ⁺ , BCl ₃
4	sp ³	Tetraédrica	CH ₄ , ZnCl ₄ ²⁻ , BCl ₄ ⁻ , N(CH ₃) ₄ ⁺ , Ni(CO) ₄
4	dsp ²	Planar Cuadrada	PtCl ₄ ²⁻ , CuCl ₄ ²⁻
5	dsp ³	Bipiramidal Trigonal	 
5	d ² sp ²	Piramidal Cuadrada	Fe en la desoxihemoglobina
6	d ² sp ³	Octaédrica	PF ₆ ⁻ , Co(NH ₃) ₆ ³⁺ , Mn ²⁺ en concanavalina A

FIGURA I-1

a) Isómeros geométricos.- Los cuales pueden ser "cis" o "trans". En el caso de la isomería octaédrica del tipo MA_3B_3 pueden existir: isómero facial e isómero meridional.



isómero facial



isómero meridional

b) Isómeros estructurales.- Incluyen isómeros de unión que contienen formas alternadas de coordinación del mismo elemento y ligandos isómeros, los cuales son estructuralmente distintos.

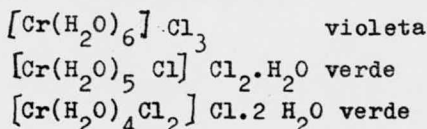
En los isómeros ópticos se encuentran:

- 1.- Enantiómeros configuracionales y
- 2.- Efectos vicinales (tipo de disimetría).

OTROS TIPOS DE ISOMERIA.-

1.- Isomería de enlace.- Se presenta en el caso de los ligandos que pueden coordinarse en más de una forma. Ejemplo: el isómero nitro $[Co(NH_3)_5NO_2]^{2+}$ y el nitrito $[Co(NH_3)_5ONO]^{2+}$.

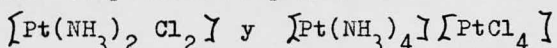
2.- Isomería de ionización.- Tienen la misma composición pero en solución dan iones distintos:



3.- Isomería de coordinación.- Aparece en los casos en que el anión y el catión son complejos y varía su distribución en las dos esferas de coordinación.

Ejemplo: $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6] [\text{Cr}(\text{CN})_6]$ o $[\text{Co}(\text{CN})_6] [\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]$
o bien cuando el mismo ión metálico se encuentra en el anión y -
en el catión:

$[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6] [\text{Cr}(\text{SCN})_6]$ y $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_4(\text{SCN})_2] [\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]$
que difieren del tamaño de la unidad representativa pero tienen
la misma composición empírica:



ACTIVIDAD CATALITICA.-

Todos los elementos de transición tienen actividad catalítica ya sea como elementos libres o como compuestos.

El poder catalítico de los metales por sí mismos surge, probablemente, del uso de sus orbitales d o de la formación de compuestos intersticiales que adsorben y activan las sustancias reaccionantes. La catálisis por compuestos metálicos resulta de su capacidad para proveer rutas de baja energía para las reacciones ya sea por el fácil cambio de oxidación o por la formación de intermediarios apropiados.

La catálisis es un fenómeno complicado y es peligroso generalizar. Es suficiente decir que los catalizadores derivados de los elementos de transición son de suma importancia en sistemas biológicos y en la industria química.

ENERGIA DE IONIZACION.-

La energía de ionización en los elementos de la primera serie de transición aumenta conforme aumenta el número atómico, pero esta progresión no es uniforme como lo muestra la figura I-2. La caída en la curva se debe a la estabilidad especial del conjunto de orbitales d semillenos y a las interacciones de repulsión acumulativas de los pares electrónicos a partir del manganeso al cinc.

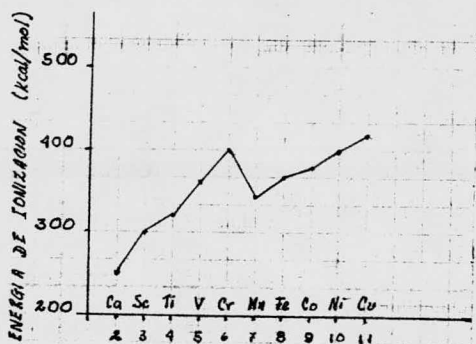


FIGURA I-2.- Energías de ionización de los metales de la primera serie de transición. Se incluyen Ca, Cu, Zn.

La energía de hidratación de los cationes divalentes mostrada en la figura I-3 no aumenta regularmente como se espera en un modelo electrostático simple. Unicamente el calcio, -- manganeso y cinc siguen este comportamiento debido a que sus -- configuraciones se aproximan a la simetría esférica.

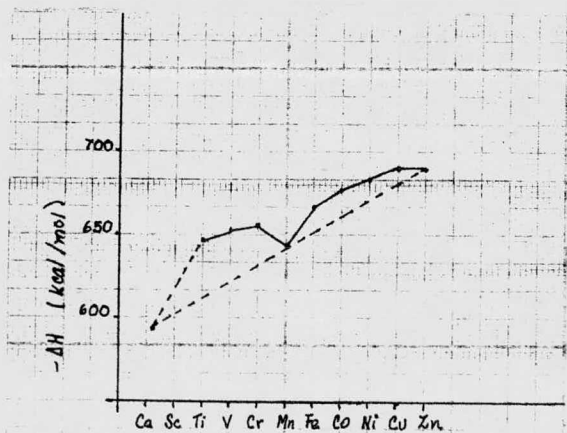
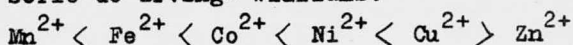


FIGURA I-3.- Calores de hidratación de los cationes divalentes de la primera serie de transición. La línea punteada es la -- conducta de un modelo electrostático simple.

La porción que va del manganeso al cinc es de gran importancia sobre todo en este estudio bioinorgánico y se ha reconocido que para muchas reacciones orgánicas no-redox, catalizadas por meta loencimas, el orden de efectividad catalítica está también dado por la serie de Irving- Williams:



CONCEPTOS DE ENLACES QUIMICOS.-

Todas las reacciones químicas y bioquímicas involu---
cran la formación y, o ruptura de una unión química.

Una unión química, según Lewis, es la compartición de un par electrónico por los dos átomos que están unidos. Sin embargo, Según Lewis, se pueden clasificar diferentes tipos de --
unión de acuerdo al origen de los electrones empleados para for
marla y a su distribución después de formada.

Enlace covalente.- Es la compartición simétrica del --
par electrónico cuando cada átomo aporta un electrón para la --
unión.

Enlace iónico.- Es la compartición asimétrica del par
electrónico que forma la unión, es decir, que uno de los dos á
tomos retiene para sí más tiempo el par electrónico.

Enlace covalente coordinado.- Es la unión de un átomo
que aporta el par electrónico con un átomo que acepta los elec
trones.

Otro concepto importante para definir tipos de unión
es el concepto ácido - base de Lewis.

Según Lewis una base es el compuesto o radical capaz
de donar un par electrónico para la formación de una unión quí
mica y un ácido es aquella especie capaz de aceptar un par elec
trónico para formar un enlace covalente.

Electronegatividad.- Según Pauling es la capacidad de

un átomo en una molécula para atraer para sí electrones. Este término es importante porque explica la existencia de la polaridad de los enlaces.

TEORIAS DE UNION QUIMICA.-

En los primeros grupos de la tabla periódica de los elementos, la unión es la compartición de pares electrónicos -- para que de esta manera los átomos alcancen una estructura estable parecida a la de un gas noble. Esto no ocurre en los elementos de transición pues alcanzarían estados de oxidación muy altos. La unión coordinada está formada por la compartición de los pares electrónicos del ligando con el metal. Dando el número correcto de ligandos, el metal tiende a alcanzar una configuración de gas noble, inclusive sin cambiar su estado de oxidación.

Las principales teorías que se han usado para explicar la unión coordinada son:

Teoría de Unión Valencia.- Supone que el enlace es -- covalente,

Teoría del Campo Cristalino.- Supone que la unión es puramente electrostática,

Teoría del Campo Ligando.- Es básicamente Teoría del Campo Cristalino pero con alguna tolerancia para una contribución covalente, y

Teoría de Orbitales Moleculares.- Permite algunas variables en las contribuciones iónicas y covalentes, pero tiene la desventaja de ser difícil de aplicarla rigurosamente.

TEORIA DE UNION - VALENCIA.-

Un enlace coordinado se considera el formado por la donación de un par de electrones disponibles del átomo donador del ligando a un orbital vacío apropiado del metal.

Hibridación de orbitales atómicos según la teoría de Unión - Valencia.- Para explicar los ángulos de unión en una molécula poliatómica se emplea el concepto de hibridación de orbitales atómicos.

La hibridación es la combinación de las funciones de onda de n orbitales atómicos independientes para generar n orbitales híbridos, que tienen la energía y la orientación promedio de los orbitales atómicos puros.

En la figura I-4 se muestran las hibridaciones de los orbitales atómicos S y p.

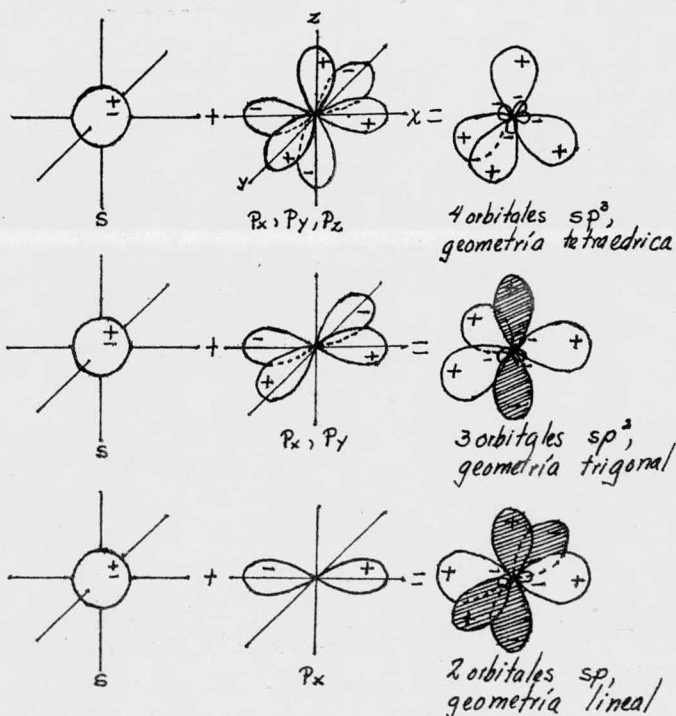


FIGURA I-4

Los pasos para formar un ión complejo pueden considerarse hipotéticamente como:

- 1.- La pérdida de electrones por el metal de acuerdo a su número de oxidación.
- 2.- La hibridación de los orbitales metálicos apropiados, que definirán la estereoquímica del complejo.
- 3.- La ocupación de los orbitales híbridos por los pares electrónicos libres de los ligandos para formar uniones sigma.

Las desventajas de la Teoría de Unión- Valencia pueden ser resumidas como sigue:

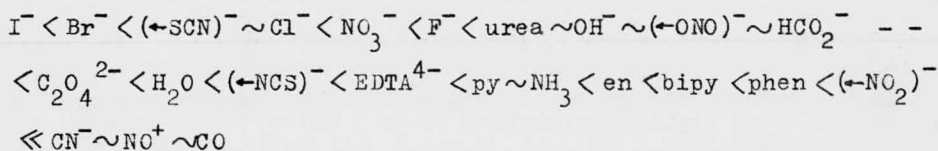
- a) describe qué ocurre, pero no explica por qué.
- b) en el caso de las configuraciones d^7 , d^8 y d^9 - - (cuando los orbitales d internos son usados para la unión) se requiere la promoción de electrones a orbitales grandemente - - inespecíficos.
- c) mientras explica las propiedades magnéticas de un complejo, no explica sus propiedades espectroscópicas.

TEORIA DEL CAMPO CRISTALINO.-

El campo electrostático de los ligandos desdobra los cinco orbitales d degenerados del ión metálico gaseoso libre en diferentes conjuntos de energía que se muestra en la figura I-5.

La magnitud de Δ (Δ_o o Δ_t) puede calcularse examinando el complejo y dependerá del metal y el ligando involucrados y también del estado de oxidación del metal.

La lista de los ligandos de acuerdo al incremento de Δ se conoce como la serie de Fajans - Tsuchida o serie Espectroquímica:



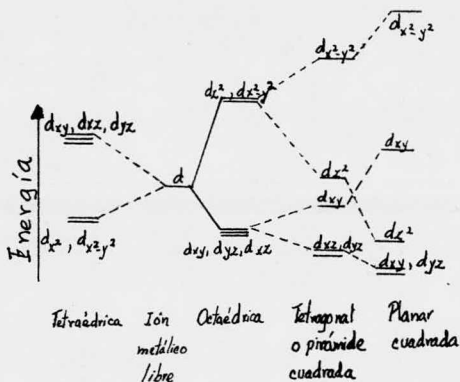


FIGURA I-5

TEORIA DE ORBITALES MOLECULARES.-

De acuerdo a esta teoría, y exclusivamente para unión σ entre el catión y los ligandos, los nueve orbitales atómicos del metal, o sea, 5d 4s y 3p se combinan con los seis orbitales de los pares electrónicos del grupo de ligandos para dar quince nuevos orbitales, los cuales son comunes a todo el núcleo. Estos orbitales se combinan y se ordenan con respecto al contenido energético según la figura I-6.

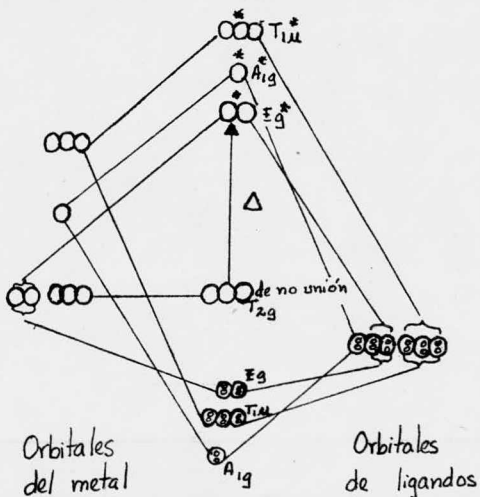


FIGURA I- 6

B I B L I O G R A F I A

Hanzlik, R.P.

Inorganic Aspects of Biological and Organic Chemistry

1a. Edición

Academic Press, Inc.

E.U.A. (1976)

Earnshaw, A. y Harrington, T.J.

The Chemistry of the Transition Elements

1a. Edición

Oxford University Press

Inglaterra (1973)

Eichhorn, G.L. Editor

Inorganic Biochemistry

Vol. 1

Elsevier Scientific Publishing Co.

Holanda (1973)

Cotton, A.F., Wilkinson, G.F.R.S.

Química Inorgánica Avanzada

Traducida por Editorial Limusa (de la 1a. Edición)

México (1974)

Larsen, E.M.

Transitional Elements

W.A. Benjamin, Inc. Editorial

E.U.A. (1965)

CAPITULO II

FACTORES QUE GOBIERNAN LA REACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS.

MECANISMOS DE INTERCAMBIO DE LIGANDOS.-

Hay una gran similitud entre los mecanismos de intercambio de ligandos en complejos y las reacciones de sustitución en moléculas orgánicas. Los mecanismos de ambos procesos se pueden agrupar en: 1) procesos asociativos (SN_2) donde en el estado de transición se forma un enlace más fuerte con el ligando entrante y se rompe el enlace con el ligando saliente y 2) procesos disociativos (SN_1) donde la cinética depende únicamente de la formación de un ión, o sea, el ataque nucleofílico no influye en la velocidad de la reacción.

Las reacciones homolíticas orgánicas son análogas -- con las reacciones metálicas redox.

COMPLEJOS METALICOS DE TRANSICION LABILES.-

Es importante diferenciar los términos termodinámicos estable e inestable de los términos cinéticos lábil e inerte. - Los primeros términos se refieren a una situación de equilibrio que involucra reactantes particulares participantes bajo condiciones específicas y los últimos se refieren a la tendencia cinética de un complejo para intercambiar ligandos. Los mecanismos disociativos son generalmente más comunes para los metales de la primera serie, o sea los complejos séis-coordinados y con dieciocho electrones.

Los mecanismos asociativos o SN_2 son más comunes para

los metales más grandes de la segunda y tercera serie, los que pueden expandir sus esferas de coordinación para complejos cuadrados planares y para complejos de metales con pocos electrones como Ti(III) y V(III).

La configuración electrónica del centro metálico (por sí misma) tiene un efecto sobre la velocidad de disociación del ligando. Complejos con niveles t_{2g} llenos o medio llenos, - - - Cr(III) y V(II), al igual que las formas de bajo spin de - - - Co(III) y Ru(II) tienden a ser extremadamente inertes. La labilidad se observa en aquellos iones que tienen menos de tres electrones d o que tienen suficientes electrones para ocupar los orbitales de antiunión eg^* .

La extrema labilidad de los sistemas de alto spin d^4 y d^9 , en Cr(II) y Cu(II) resulta de los efectos de distorsión de Jahn Teller los cuales se distribuyen equitativamente en las seis posiciones de los ligandos por las formas vibracionales de ensanchamiento metal-ligando.

Algunas técnicas modernas han hecho posible la medición de los procesos asociativos y disociativos de los ligandos. Con respecto a los iones metálicos divalentes de la primera serie se encontró una completa similitud entre las velocidades de intercambio con el disolvente y las velocidades de formación del complejo y un patrón característico en sus reactividades relativas como se muestra en la figura II-1, donde se observa que la última tendencia refleja los efectos de la energía de estabilidad del campo cristalino sobre la disociación del grupo coordinado.

Con los iones trivalentes de la primera serie el desdoblamiento del campo cristalino es más grande, como lo es la razón carga - tamaño, por lo que iones como Co(III) y Cr(III) -

pueden ser extremadamente inertes hacia la disociación e intercambio de ligandos.

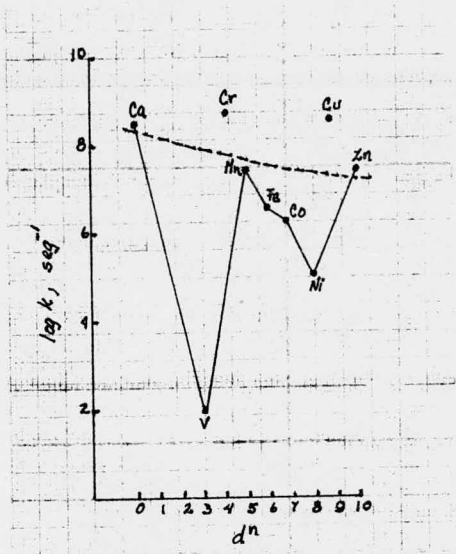


FIGURA II-1.- Velocidades aproximadas de intercambio de agua para los iones divalentes de metales de transición de la primera serie. Se incluyen Ca^{2+} , Cu^{2+} , - Zn^{2+} .

COMPLEJOS METALICOS DE TRANSICION INERTES.-

Efecto de los grupos:entrante y saliente.- Una etapa disociativa limitante de la velocidad en el proceso de intercambio de ligandos implica que los efectos de variación del grupo entrante deben ser pequeños en comparación con los efectos que produce el grupo saliente.

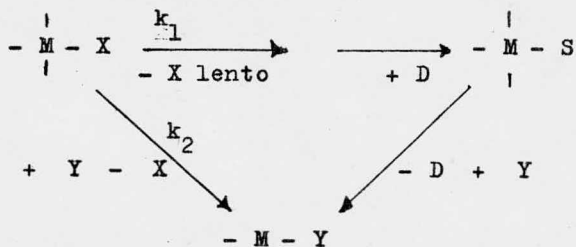
Los efectos del grupo entrante son más notables para los metales de transición de la segunda y tercera serie, los que son mucho menos lábiles que los de la primera serie. Los metales de la segunda y tercera serie son más suaves que los de la primera serie y sus velocidades de sustitución son sensibles a la suavidad del ligando entrante.

INTERCAMBIO DE LIGANDOS EN COMPLEJOS NO OCTAEDRICOS.-

Los complejos cuadrados planares intercambian ligandos vía un mecanismo asociativo que involucra un estado de transición o intermediario cinco-coordinado. Consecuentemente, la ley de velocidad para el intercambio de ligandos tiene la forma:

$$-d(\text{complejo})/dt = (k_1 + k_2[Y]) [\text{complejo}]$$

donde Y es el ligando entrante. La constante de velocidad k_1 es generalmente mucho menor que k_2 , y es una constante de velocidad de pseudo primer orden para una vía en la cual el grupo saliente es reemplazado por una molécula de disolvente, la que es desplazada por Y.



D = disolvente

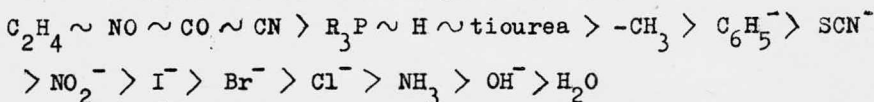
k_1 indica que esta vía es un proceso asociativo. Se deduce que el intermediario cinco-coordinado tiene geometría trigonal bipiramidal en lugar de pirámide cuadrada, ya que la primera involucra menos repulsiones estéricas entre los ligandos

y favorece la unión π metal - ligando, además las entropías de activación para sustitución cuadrada planar (k_2) son negativas y grandes.



Los efectos de un ligando sobre el intercambio o sustitución de otro son particularmente pronunciados en algunos complejos cuadrados planares y este fenómeno se conoce como Efecto Trans.

Algunos ligandos T pueden enlistarse de acuerdo a su efecto labilizante sobre un ligando trans X :



El gran efecto trans de ligandos como $-\text{H}$ y $-\text{CH}_3$ se debe en gran parte a sus extremas suavidades y a la fuerza de sus enlaces σ con metales d^8 suaves como el Pt(II) el cual en cierta forma debilita la unión del ligando trans. El gran efecto de la mayoría de los otros ligandos, puede atribuirse a la estabilización del enlace π del intermediario cinco-coordinado. Al final de la lista están los ligandos duros pequeños los cuales son los más lábiles, en los centros metálicos suaves.

Para la sustitución de ligandos en complejos tetraédricos se sugiere un intermediario cinco-coordinado debido a la entropía de activación negativa y a la cinética de segundo orden observada. En aquellos ligandos que tienen menos de dieciocho electrones en su capa de valencia y que son cuatro-coordi-

nados se favorece la vía asociativa. Para complejos cinco - coordinados con dieciocho electrones el mecanismo más adecuado es el disociativo.

SUSTITUCION EN COMPLEJOS OCTAEDRICOS.-

La mayoría de los complejos octaédricos no exhiben un efecto trans pronunciado. Esto se debe aparentemente a que las reacciones de sustitución en un centro octaédrico ocurren vía un mecanismo disociativo SN_1 .

HIDROLISIS BAJO CONDICIONES ACIDAS.-

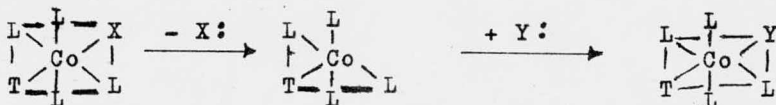
En los centros metálicos las bases conjugadas de ácidos fuertes como el Cl^- , SO_4^{2-} o p-toluensulfonato son buenos grupos salientes. Las bases conjugadas de ácidos débiles tales como OH^- , F^- , NO_2^- , N_3^- , CN^- , CO_3^{2-} , $CH_3CO_2^-$ no son buenos grupos salientes de dichos centros metálicos, pero su reactividad se puede mejorar considerablemente con un catalizador ácido.

Esto se puede demostrar por medio de la siguiente ecuación:

$$-d(\text{complejo})/dt = (k_0 + k [H^+]) [\text{complejo}]$$

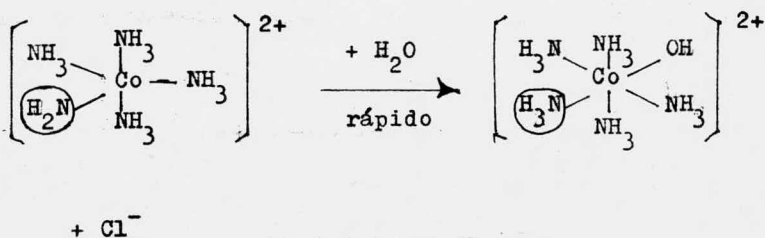
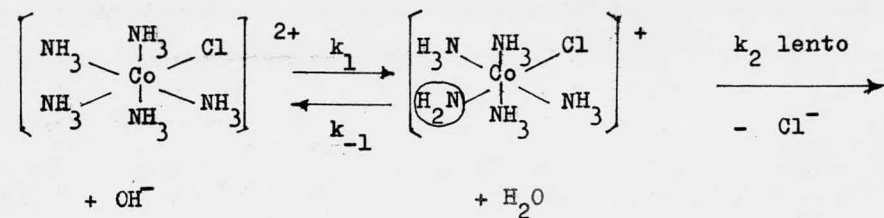
que indica la presencia de las vías, ya sea catalizada por un ácido o independiente del ácido.

Debido a que al final de la reacción de hidrólisis ácida hay una retención de la configuración, se sugiere que la reacción procede vía un intermediario cinco - coordinado cuadrado piramidal:



HIDROLISIS BAJO CONDICIONES BASICAS.-

El mecanismo estequiométrico más adecuado para el caso del pentamino cloro cobalto (III) es:

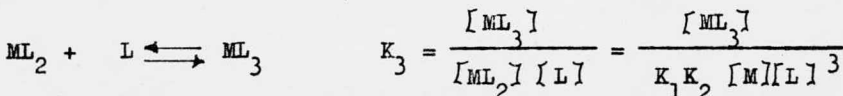
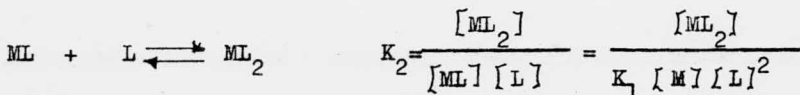


En este mecanismo se nota la formación de una base conjugada del ligando amino. La labilización del grupo saliente refleja un enlace debilitado debido al carácter fuerte de los enlaces σ y π del donador del grupo trans amido.

FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS METALICOS.-

Para nuestros propósitos usaremos como una medida de estabilidad la constante de equilibrio para la formación de un complejo dado = K.

Sin embargo los equilibrios de complejación metálica suceden en serie y las constantes de equilibrio pueden ser:



Para tales equilibrios es común usar constantes de equilibrio acumulativas β :

$$\beta_1 = K_1 = \frac{[ML]}{[M][L]}, \quad \beta_2 = K_1 K_2 = \frac{[ML_2]}{[M][L]^2}$$

$$\beta_n = K_1 K_2 \dots K_n = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n}$$

Debido a que M y L suelen ser especies cargadas, K es sensible a la fuerza iónica del medio. Para mantener una fuerza iónica constante se usa un electrolito inocuo como una sal.

Los valores sucesivos de K decrecen generalmente conforme aumenta n, especialmente para ligandos con carga negativa, los cuales no son buenos enlazantes π .

PROPIEDADES DEL ION METALICO.-

En cierto grado, la estabilidad del complejo también está determinada por el ión metálico en particular. Esto suele explicarse en términos de los efectos carga - radio y las compatibilidades duro - suave de las combinaciones específicas metal - ligando.

Se debe recordar que los valores de energía de estabi-

lización del campo cristalino son un poco más pequeños que las entalpías de complejación observadas para muchos iones de la primera serie, que el carácter covalente parcial es importante en muchos enlaces, que la geometría preferida de algunos metales no siempre es octaédrica y que la entalpía y entropía de la solvatación del ligando puede jugar un papel significativo en los equilibrios de complejación.

PROPIEDADES DE LOS LIGANDOS.-

Una de las propiedades más importantes de los ligandos es su capacidad de complejamiento metálico (su pK_a), o sea su capacidad de complejamiento protónico. Para un ión metálico dado puede establecerse una buena correlación del K con el pK_a del ligando:

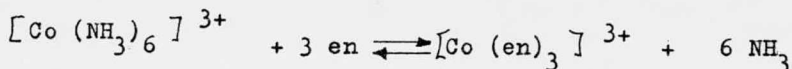
$$\log K = a (pK_a) + b$$

La cantidad actual del metal complejado está determinada por las concentraciones relativas de los iones metálicos e hidrógeno que compiten por el ligando. La efectividad relativa del ión metálico y del ión hidrógeno en esta competencia se mide por medio de a , y sus valores están comprendidos entre: $0.5 \leq a \leq 1.5$. Para ligandos como hidruros, alquilo y monóxido de carbono esta correlación es poco importante y el enlace π y la suavidad metálica son factores más significativos.

EL EFECTO QUELATO.-

En muchos complejos hay uno o más ligandos que se unen a una o más posiciones de coordinación, o sea son ligandos quelantes. Los complejos de ligandos quelantes son en general termodinámicamente más estables que aquellos con un número equivalente de ligandos monodentados, este efecto especial se denomina efecto quelato.

Normalmente el efecto quelato es producido por el aumento en la entropía de un sistema, es decir, existe la formación de un sistema quelatado, al aumentar el número de partículas, la entropía favorece la formación, ejemplo:



Puede haber factores secundarios que favorezcan la estabilización de un sistema quelatado, como lo es una ligadura sencilla sobre una rígida (doble o triple) o la deslocalización electrónica.

El efecto quelato es amplificado en el caso de ligandos polidentados formando anillos con un átomo de metal sencilla

EFFECTOS MUTUOS METAL - LIGANDO EN LA ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS.-

Para determinar la fuerza de una interacción dada metal - ligando, es importante considerar su compatibilidad mutua en términos: suavidad y dureza. Este parámetro está relacionado cualitativamente con la razón carga - tamaño del ión, en la que los iones grandes de baja carga iónica tienen campos electrostáticos alrededor de ellos fácilmente polarizables o deformables (suaves), mientras que los iones altamente cargados con campos electrostáticos relativamente intensos son duros.

De acuerdo a la regla los iones metálicos duros tienden a unirse a los ligandos duros y viceversa; algunas fases de la conducta de sistemas metálicos en química y biología han sido explicados.

D U R O S	INTERMEDIOS	S U A V E S
-----------	-------------	-------------

IONES METALICOS

H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+	Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Tl^+
Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+}	Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}	Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pd^{2+} , Pt^{2+}
Mn^{2+} , Al^{3+} , Sc^{3+} , Ga^{3+}	Sn^{2+} , Sb^{3+} , Bi^{3+}	Pt^{4+} , Tl^{3+}
In^{3+} , La^{3+} , Gd^{3+} , Lu^{3+}		
Cr^{3+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Si^{4+}		
Ti^{4+} , Sn^{4+} , WO^{4+} , VO^{2+}		

L I G A N D O S

H_2O , OH^- , F^- , Cl^-	$C_6H_5NH_2$, C_5H_5N	R_2S , RS^- , I^-
$CH_3CO_2^-$, PO_4^{3-} , SO_4^{2-}	N_3^- , Br^- , NO_2^-	SCN^- , $S_2O_3^{2-}$
CO_3^{2-} , ClO_4^- , NO_3^-	SO_3^{2-} , N_2	R_3P , $(RO)_3P$, R_3As
ROH , R_2O , NH_3		CN^- , RCN , CO
RNH_2 , N_2H_4		H^- , R^- , C_2H_4

TABLA II - 1.- Clasificación de iones metálicos y ligandos por el criterio duro - suave

Na^+	-donadores de oxígeno neutro, éteres -- terminales, carbonilos peptídicos, po- siblemente una pequeña carga negativa en el sitio.
K^+	-sitios grandes de donadores neutros, - posiblemente una carga negativa en el sitio.
Mg^{2+}	-donadores de nitrógeno básico (duros) > oxianiones duros (carboxilato, fos- fato, fenoles y catecoles)
Ca^{2+}	-oxianiones duros > donadores de nitró- geno.
Mn^{2+}	-similar al Mg^{2+} aunque el Mn^{2+} suele - tener geometría octaédrica.
Fe^{2+}	- -SH > -NH ₂ > -SCH ₃ > carboxilatos
Fe^{3+}	- -OH de serina, fosfato, hidroxamato, hidróxido
Cu^+	-donadores suaves, -SH > -NH ₂ >> otros
Cu^{2+}	-imidazol y aminas, péptidos
Zn^{2+}	-imidazol, -SH > carboxilatos

TABLA II - 2.- Sitios de unión preferidos por algunos metales -
biológicamente importantes.

MECANISMOS DE TRANSFERENCIA ELECTRONICA PARA METALES.-

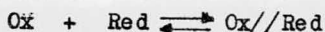
Básicamente hay dos tipos de mecanismos de transferencia electrónica, : mecanismos de esfera externa y mecanismos de esfera interna. En base a esta clasificación, las reacciones redox son divididas para su estudio en reacciones de autointercambio entre dos diferentes estados de oxidación del mismo metal y reacciones redox entre complejos con centros metálicos distintos.

REACCIONES EN LA ESFERA EXTERNA.-

El tipo más simple de reacciones redox es la reacción de autointercambio de la esfera externa, la cual puede ser representada en términos de contacto entre nubes electrónicas externas de los complejos reaccionantes. Cuando ocurre el contacto, el electrón "brinca" de un orbital de un complejo reductor a un orbital de un complejo oxidante.

Las etapas elementales involucradas en el mecanismo de la esfera externa son:

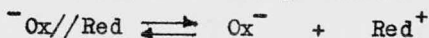
a) Formación de un complejo precursor:



b) Activación química del precursor, transferencia electrónica y relajación del complejo sucesor:



c) Disociación de los productos formados:



Cualquier cambio en el estado de oxidación debe acompañarse con un cambio apropiado en la esfera de coordinación. Si la esfera de coordinación no se ajusta siguiendo un cambio redox, el complejo resultante no estará en la forma más estable.

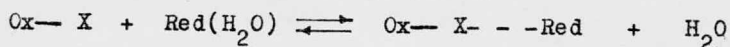
REACCIONES EN LA ESFERA INTERNA.-

En mecanismo de esfera interna es aquel en el cual un

reductor y un oxidante distribuyen un ligando en su esfera de -- coordinación primaria o interna, el electrón es transferido a -- través de un grupo puenteante.

Las etapas elementales de un mecanismo de esfera inter na generalizado (en solución acuosa), puede ser representado -- por:

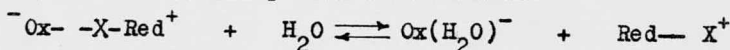
a) Formación de un complejo precursor:



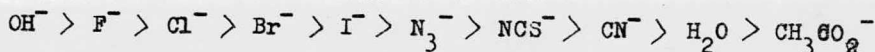
b) Activación del complejo precursor y transferencia electrónica:



c) Separación de los productos formados:



Varios aniones y grupos puentean con eficiencia dis-- tinta, generalmente en el siguiente orden:



INTERACCIONES METAL-PROTEINA.-

Las interacciones protefna - ión metálico difieren ne-- cesariamente de aquellas con aminoácidos y péptidos chicos, por-- que la conformación de la cadena peptídica puede bloquear las -- reacciones en los sitios potenciales de unión al metal o puede colocar cadenas laterales de aminoácidos que estén distantes de una posición adecuada para formar quelatos.

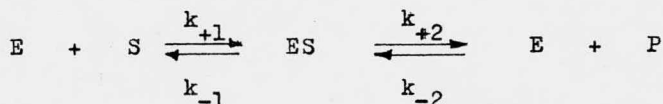
Las interacciones que son asimétricas con relación a -- la estructura proteínica total, pueden desarrollar sitios hidro-- fílicos sobre la protefna y sustancias externas. El sitio redox,

usualmente el centro metálico, o centros metálicos, puede localizarse asimétricamente en la proteína.

La posible influencia de los efectos alostéricos sobre la reactividad de la metaloproteína y sus mecanismos, pueden ser vistas en la variedad de ppciones las cuales deben ser incorporadas selectivamente en una encima para el control y regulación de los procesos metabólicos (activadores y moderadores).

Algunas catálisis encimáticas pueden requerir la presencia del sustrato y cofactores para una actividad máxima.

La ecuación de Michaelis - Menten es la ecuación de velocidad para las reacciones catalizadas por encima que sólo actúan sobre un sustrato:



EFEECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA.-

La mayoría de las encimas poseen un pH característico en el que su actividad es máxima.

El pH óptimo de una encima no es necesariamente idéntico al pH de su entorno intracelular normal. Este hecho sugiere que la relación pH - actividad de una encima puede constituir un factor en el control intracelular de su actividad.

La velocidad de las reacciones catalizadas por encimas se incrementa en general con la temperatura, dentro del intervalo en el que la encima es estable y permanece activa.

La aparente temperatura óptima es la resultante de dos procesos:

- 1) el incremento habitual de la velocidad de reacción

con la temperatura y

2) el incremento en la velocidad de desnaturalización térmica de la encima al sobrepasar una temperatura crítica, 55 - 60°C.

INHIBICION DE LAS ENCIMAS.-

Es la anulación de la actividad de una encima o del -- complejo encima - sustrato por un metabolito específico.

B I B L I O G R A F I A

Hanzlik, R.P.

Inorganic Aspects of Biological and Organic Chemistry

1a. Edición

Academic Press, Inc. E.U.A. (1976)

Bennet, L.E. en "Progress in Inorganic Chemistry"

(Lippard, S.J. Editor).

Vol. 18

John Wiley & Sons

E.U.A. (1973)

Lehninger, A.L.

Bioquímica

2a. Edición traducida

Ediciones Omega, S.A.

Barcelona (1978)

Breslow, E. en Inorganic Biochemistry

(Eichhorn, G.L. Editor)

Vol. 1

Capítulo VII

Elsevier Scientific Publishing Co.

Holanda (1973)

Huheey, J.E.

Inorganic Chemistry

Harper & Row P. E.U.A. (1972)

Purcell, K.F. y Kotz, J.C.

Inorganic Chemistry

W.B. Saunders Co.

E.U.A. (1977)

~~EL MOLIBDENO EN LA NITROGENASA~~

INTRODUCCION.-

Como es bien sabido, el nitrógeno es necesario para la vida.

Probablemente el ambiente inadecuado para asimilar nitrógeno, N_2 , motivó la evolución de los sistemas encimáticos para efectuar la reducción del nitrógeno atmosférico y obtener amoníaco para la nutrición de las plantas.

El proceso es complejo y se realiza en algunas bacterias, algas azules, levaduras (20) y en asociaciones simbióticas leguminosas - bacterias (21) en condiciones ambientales. El nitrógeno resiste totalmente un ataque químico ordinario, a menos que se usen condiciones severas de temperatura y presión.

En la fijación biológica, una encima que contiene molibdeno y fierro, la nitrogenasa, reduce el nitrógeno a amoníaco. Este sistema biológico sobrepasa cualquier sistema sintético en eficiencia catalítica.

En este capítulo se presentan: el mecanismo de acción de la fijación biológica del nitrógeno, utilizando las características naturales de la nitrogenasa, la química del nitrógeno y del molibdeno y las características y mecanismos de la fijación abiológica del nitrógeno.

1

EL CICLO DEL NITROGENO.-

La fijación biológica del nitrógeno es de central importancia en la manutención de un balance positivo de nitrógeno sobre la Tierra. La figura III-1 muestra un ciclo de nitrógeno simplificado e indica que los agente fijadores de nitrógeno simbióticos o asimbióticos lo reducen del aire para mantener el crecimiento de los organismos en los medios terrestre y acuático.

La fijación biológica del nitrógeno regresa el nitrógeno fijado al ciclo terrestre para reemplazar el perdido al abonar las tierras, por desnitrificación, lixiviación y erosión.

Las bacterias son los organismos dominantes, entre los autónomos fijadores de nitrógeno, en el suelo; mientras que las algas azul-verdosas parecen tener el papel fundamental en el medio acuático (1).

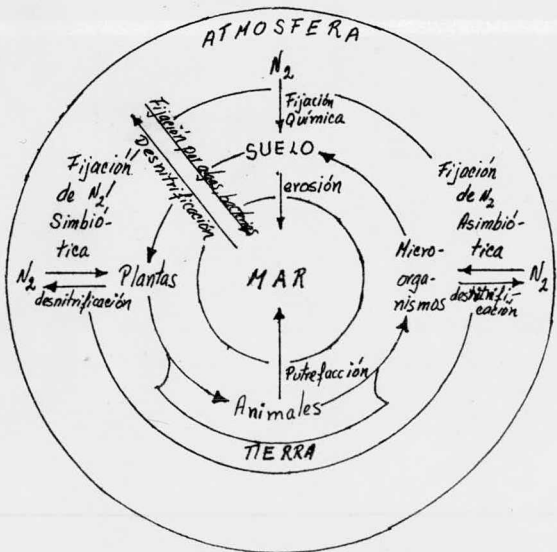


FIGURA III-1

A.-Agentes nitrógeno-fijadores simbióticos.

- 1.- Plantas leguminosas + bacterias de los nódulos de raíces (cacahuete, soya, trébol, etc.)
- 2.- Plantas no-leguminosas, angiospermas (Aliso, cambrón, ---
ceanothus, etc.)

B.- Agentes nitrógeno-fijadores no-simbióticos.

- 1.- Algas azul-verdosas (nostoc, anabaena, calothrix, etc.)
 - 2.- Levaduras (rhodotorula sp)
 - 3.- Bacterias
 - a.- Aeróbicas (azotobacter, beijerinckia, etc)
 - b.- Facultativas (bacillus, klebsiella, etc.)
 - c.- Anaeróbicas
 - No-fotosintéticas (clostridium, desulfovibrio, methanobacterium)
 - Fotosintéticas (rhodospirillum, chromatium, chlorobium)
-

TABLA III - 1.- Agentes biológicos que fijan nitrógeno.(1).

PROPIEDADES DEL NITROGENO.-

La química del dinitrógeno está dominada por su extraordinaria estabilidad cinética y termodinámica (2), de donde que es el más inerte de las moléculas diatómicas comunes. La razón de ésto radica en su estructura electrónica. Está claro que el triple enlace nitrógeno-nitrógeno es excesivamente fuerte (225 kcal/mol). La energía de ionización del dinitrógeno también es elevada (15.58 eV, 367 kcal/mol). Esto sugiere que la

energía de activación para una oxidación simple es prohibitiva. La longitud de enlace (1.098 Å) es muy corta y refleja la fuerza de la unión. La frecuencia de alargamiento nitrógeno-nitrógeno, es más alta que la de cualquier otra molécula diatómica(3).

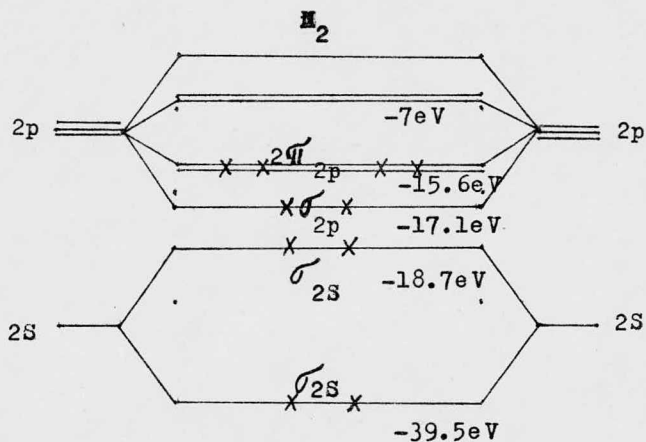


FIGURA III-2 (3)

En la figura III-2, los catorce electrones de la molécula quedan acomodados así: cuatro electrones en los orbitales σ_{1s} y σ_{1s}^* . Los siguientes cuatro en σ_{2s} y σ_{2s}^* que tampoco contribuyen al enlace neto. Los restantes seis electrones forman un enlace σ y dos enlaces π :

$$N_2 = K K \sigma_{2s}^2 \sigma_{2s}^{*2} \sigma_{2p_x}^2 2 \pi_{2p}^4$$

PROPIEDADES DEL MOLIBDENO.-

El molibdeno es el único entre los elementos de la segunda y tercera serie de transición que juega un papel importante en algunas reacciones bioquímicas (4). Sus estados de oxidación formales van de -2 a +6 con una química muy amplia dentro de los estados 0, 2, 3, 4, 5 y 6.

Los números de coordinación abarcan de 4 a 8 y virtualmente se conocen compuestos mononucleares y polinucleares o en todos los estados de oxidación.

El Mo(VI) es el único estado de oxidación que es estable a la oxidación del aire en solución acuosa, sin embargo, en ausencia de aire, los estados de oxidación de Mo(III) a Mo(V) pueden estabilizarse en medio acuoso, combinándolos con ligandos adecuados como $[\text{MoCl}_6]^{3-}$ y $[\text{Mo}(\text{CN})_6]^{4-}$. Los complejos de Mo(V) y Mo(VI) son complejos de los oxocaciones MoO^{3+} y MoO^{2+} respectivamente. El estudio de estos iones es complicado debido a su gran facilidad para hidrolizarse.

El ión MoO^{2+} es un típico catión duro y un cambio a MoO^{3+} implica un cambio a carácter suave ya que el MoO^{3+} forma complejos más estables con ligandos con azufre así como ligandos con oxígenos aniónicos.

Los compuestos de Mo(V) tienden a la dimerización, esto se debe a que los electrones d y los orbitales con pocos electrones d parecen estar fuertemente expuestos a los ligandos. El equilibrio entre los monómeros paramagnéticos y el dímero diamagnético puede controlar el balance entre los estados de oxidación. Tal control es esencial si las enzimas de molibdeno funcionan como agentes que transfieren electrones ya que las rutas de baja activación energética para transferir electrones entre las moléculas se llevan a cabo únicamente cuando los potenciales redox de los componentes del proceso están balanceados correctamente. Tal equilibrio depende en gran medida del disolvente. Esto se puede ilustrar con la estabilización específica del Mo(IV) por el ión cianuro; la estabilidad del Mo(VI) con relación al Mo(III) con el hidróxido como ligando y las estabildades similares del Mo(III) y Mo(V) con cloruro y tiocianato(5).

Los potenciales de oxidación estimados para Mo(V)/Mo(III) a pH neutro (de -0.6 a -1.0 V) los colocan entre los potenciales de los sistemas biológicos. La habilidad del ácido mercaptoacético ($E^{\circ} \sim -0.30$ V) para reducir el Mo(V) a Mo(III) ilustra como el potencial redox de un par de molibdeno lo introduce en el rango biológico por la estabilización preferencial de un estado de oxidación más bajo, pues los estados de oxidación más bajos se estabilizarán preferentemente con ligandos con carácter π -aceptor, y los ligandos tiol resultan ser los ligandos más adecuados de este tipo.

La extrema sensibilidad de la nitrogenasa hacia el oxígeno, el efecto inhibitorio del monóxido de carbono y la necesidad de llevar a cabo la transferencia de seis electrones a la molécula de nitrógeno hacen suponer que el molibdeno, en la encima reducida, está en un estado de oxidación bajo, probablemente Mo(III) (4) y (6).

PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA NITROGENASA.-

La nitrogenasa está formada por dos proteínas: una Fe-Sproteína y una Mo-Fe-proteína. La primera es una proteína de bajo peso molecular (45 000 - 65 000), consiste en dos subunidades aparentemente idénticas y conteniendo cuatro átomos de fierro y cuatro sulfuros ácido-lábiles por mol. La Mo-Fe proteína tiene dos átomos de molibdeno por mol así como entre dieciocho y treinta y seis átomos de fierro y una cantidad comparable de azufre ácido-lábil. Su peso molecular es aproximadamente de 210 000 y se han reportado cuatro subunidades idénticas o de dos tipos distintos (con dos de cada tipo), (4), (22).

La extremada sensibilidad de la Fe- proteína es un gran obstáculo en su purificación. Las Fe- proteínas de A. vi-

nelandii y de *C. pasteurianum* son lábiles al frío y pierden su actividad rápidamente a temperaturas abajo de 5°C.

La Fe- proteína contiene una alta proporción (aproximadamente el 20%) de residuos de aminoácidos ácidos y son dos veces más abundantes que los residuos básicos. Las formas oxidadas de estas proteínas no tienen señal EPR. Cuando se le adicionan Mg^{2+} y ATP a las proteínas reducidas, la simetría cambia de una rómbica a una de tipo axial y, presumiblemente, se altera la simetría del cromóforo Fe-S a una configuración forzada - (7).

La Fe-proteína pierde su actividad completamente en cinco minutos cuando se expone al aire a temperatura ambiente (8).

La actividad específica de las Fe-proteínas de azotobacter es de 460 y 530 nmoles de nitrógeno reducido/min.mg proteína (2).

Las actividades específicas de las Mo-Fe-proteínas de azotobacter y clostridial son similares, aproximadamente 350 -- nmoles de nitrógeno reducido/min. mg de proteína, indicando un número de recambio de 50 nmoles de nitrógeno reducido/min.mol de molibdeno. Se sugiere que la Mo-Fe-proteína es dímera en base a su contenido de molibdeno y es de carácter ácido (2).

El espectro EPR sugiere un sistema $S = 3/2$ y el Mo -- (III) es un candidato adecuado para este sistema (4).

Ninguna de las dos proteínas de la nitrogenasa separadas muestran actividad, pero las Mo-Fe-proteínas y Fe-proteínas de distintos organismos se pueden combinar para reducir sistemas que fijan nitrógeno en presencia de ATP y un reductor. También se ha observado que la nitrogenasa del *Clostridium pasteurianum*

es inhibida por la presencia de la Mo-Fe-proteína de *A. vinelandii* pero no se ve afectada por la Fe-proteína de *A. vinelandii*, y la Fe-proteína de *C. pasteurianum* inhibe a la nitrogenasa de *A. vinelandii*. Ambas inhibiciones resultan de la formación del complejo inactivo nitrogenasa- *A. vinelandii*- Mo-Fe-proteína y dos moléculas de Fe-proteína de *C. pasteurianum*.

El resultado sugiere que la Fe-proteína de cada organismo compite por el mismo o mismos sitios sobre la Mo-Fe-proteína de *A. vinelandii* (9), (23).

Recientemente (10) se ha reportado el aislamiento de una sustancia que contiene fierro y molibdeno a partir de la Mo-Fe-proteína de la nitrogenasa. Los espectros EPR y Mössbauer de esta sustancia llamada fierro-molibdeno-cofactor (FeMoCo) indican que contiene ocho átomos de fierro y seis iones sulfuro ácido-lábiles por átomo de molibdeno. El componente I de *C. pasteurianum* no se acopla completamente al componente II de *A. vinelandii*. Sin embargo, el FeMoCo del componente I de *C. pasteurianum* activa al componente I inactivo de *A. vinelandii*; al parecer, la incapacidad de los componentes de *A. vinelandii* y *C. pasteurianum* para complementarse entre sí no se debe a diferencias en sus respectivos FeMoCos.

El FeMoCo es extremadamente sensible al oxígeno. La mínima exposición al aire lo inactiva. Otra propiedad del FeMoCo es la de reducir al acetileno (37).

Hay dos posibilidades para la distribución de los dos átomos de molibdeno en el componente I:

a) una molécula de FeMoCo contiene dos átomos de molibdeno y una molécula de FeMoCo está presente en cada componente I activo o

b) una molécula de FeMoCo contiene un átomo de molibdeno y dos moléculas de FeMoCo están presentes por cada componente I activo (11).

Se sugiere que no todo el hierro del componente I se encuentra en la forma de centros Fe-S, sino que algunos átomos de hierro están presentes en una forma distinta y que estos átomos de hierro forman parte del FeMoCo.

La caracterización y estructura del FeMoCo ayudará a entender el mecanismo catalítico de la fijación del nitrógeno, la importancia del molibdeno en el sitio activo de la nitrogenasa y el papel de los ligandos unidos al molibdeno en la transferencia de electrones y protones.

La nitrogenasa es catalíticamente activa cuando están presentes las dos proteínas, un agente reductor, ATP y Mg^{2+} . -- Bajo estas condiciones el dinitrógeno, el acetileno y otros sustratos son reducidos, figura III-3:

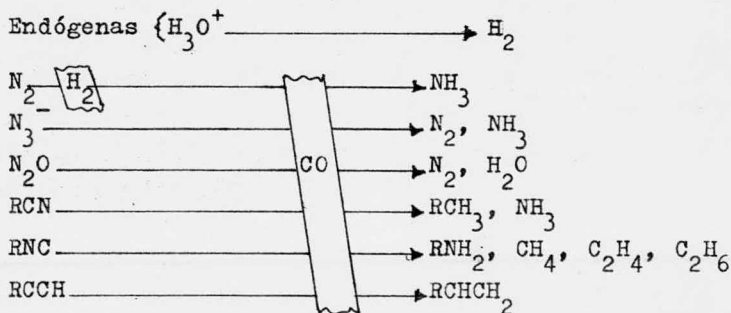
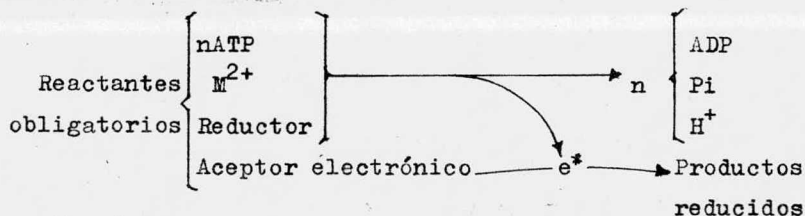


figura III-3

En ausencia de nitrógeno o cuando la concentración de éste disminuye, se libera hidrógeno. La reducción de acetileno, depende del ATP, al igual que la fijación del nitrógeno, esta reacción es completamente espereoespecífica dando únicamente cis- $C_2H_2D_2$ (4), por lo que se le considera como una medida válida de la fijación del nitrógeno.

REQUERIMIENTO DE ATP.-

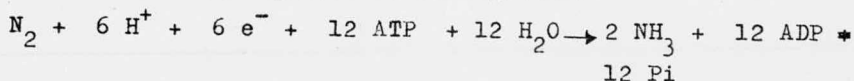
El ATP es un requerimiento absoluto para la fijación biológica del nitrógeno, los otros nucleótido fosfatos son inefectivos.

La nitrogenasa actúa como ATPasa durante la fijación del nitrógeno y según Hageman y Burris (12), la transferencia electrónica de la Fe-proteína hacia la Mo-Fe-proteína va acompañada por la hidrólisis del ATP y por lo tanto, dicha hidrólisis no está involucrada directamente con la reducción de sustratos.

En trabajos experimentales es común usar fosfato creatina y quinasa creatina para convertir el ADP formado otra vez en ATP para que no se acumulen niveles inhibitorios de ADP (1).

Hay desacuerdo en el requerimiento de ATP, pero la mayoría de los investigadores aceptan un valor de cuatro moléculas de ATP por cada par electrónico transferido. Se han reportado valores más altos y más bajos, dependiendo del pH, la temperatura y la razón de las proteínas componentes de la nitrogenasa (un exceso de Mo-Fe-proteína incrementa el requerimiento de ATP) (13). Los valores observados también dependen de la pureza y preparación de la nitrogenasa (1).

La reacción global es la siguiente:



Se ha observado que el complejo Mg-ATP se une específicamente a la Fe-proteína (14), esta unión no está influenciada por la Mo-Fe-proteína.

El complejo Fe-proteína reducida-Mg-ATP, adquiere un potencial muy bajo, - 490 mV y la capacidad única de reducir a la Mo-Fe-proteína.

El mecanismo por el cual se utiliza esta energía " in vivo" no es claro debido a la presencia de hidrogenasas que regulan el consumo o desarrollo de hidrógeno en presencia de nitrógeno.

La pérdida de energía en forma de ATP y poder reductor, en consecuencia, atribuido al desprendimiento de hidrógeno puede ser tan alta como del 40 al 60% del flujo energético total a través de la nitrogenasa.

DONADORES ELECTRONICOS.-

Los reductores naturales de la nitrogenasa son las ferredoxinas y/o las flavodoxinas (24), (25).

Las ferredoxinas de las bacterias nitrógeno-fijadoras tienen potenciales redox abajo de -390 mV. La ferredoxina de un organismo mostrará generalmente actividad frente a la nitrogenasa de otro organismo.(15).

Las flavodoxinas tienen tres estados de oxidación; el par hidroquinona-semiquinona de la flavodoxina de *A. Chroococcum* es la especie activa donadora de electrones para su nitrogenasa. En organismos anaeróbicos, el piruvato metabolizado por el sistema fosforoclastico suministra ferredoxina reducida y ATP.

"In vitro", pueden usarse los cloroplastos que han sido tratados con calentamiento para inactivar el fotosistema II como reductores para la nitrogenasa, vía una ferredoxina o fla-

flavodoxina.

Los colorantes de viológeno reducidos o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ reducen a la nitrogenasa directa y ampliamente cuando se usan "in vitro" (7), (26).

INHIBIDORES.-

Hay muchos compuestos que bloquean la fijación de nitrógeno al bloquear el metabolismo energético del organismo, pero pocos de éstos son de interés en el estudio del mecanismo de la fijación del nitrógeno (1).

Los sustratos de la nitrogenasa, distintos del nitrógeno, son inhibidores ya que compiten con el nitrógeno por los electrones.

TABLA III-2.- Inhibición de las reacciones de la nitrogenasa en *Azotobacter vinelandii* (14).

SUSTRATO	INHIBIDOR							
	N_2	N_3^-	C_2H_2	HCN	N_2O	H_2	CO	CH_3NC
N_2	-	NC	NC	NC	C	C	NC	NC
N_3^-	-	-	NC	C	-	NI	NC	C
C_2H_2	C	NC	-	NC	NC	NI	NC	-
HCN	I	C	E	-	E	E	NC	-
H^+	I	I	I	I	I	NI	NI	I

Simbolos.- C.- inhibición competitiva; NC.- inhibición no competitiva; NI.- no inhibe; I.- inhibe; E.- eleva la producción.

El hidrógeno es un inhibidor competitivo, específico de la fijación del nitrógeno. Aparentemente, el hidrógeno y el nitrógeno se acoplan en el mismo sitio de la nitrogenasa. El hidrógeno no exhibe inhibición contra la reducción, por la nitro-

genasa, de la azida, acetileno, cianuro o protones y no inhibe - la hidrólisis del ATP.

El efecto del hidrógeno es completamente reversible y su constante de inhibición (K_{is}) para la fijación de nitrógeno - en *A. vinelandii* es 0.112 atm.

No obstante el hecho de que el acetileno, la azida, el cianuro, y el metilisocianuro son reducidos por la nitrogenasa y utilizan electrones de la misma fuente para la reducción del nitrógeno son inhibidores no competitivos. El monóxido de carbono y el óxido nitroso no son reducidos por la nitrogenasa pero son potentes inhibidores de la nitrogenasa; la K_{is} para el monóxido de carbono 1.14×10^{-4} atm. El monóxido de carbono es un inhibidor no competitivo y el óxido nitroso parece ser competitivo con respecto al nitrógeno.

Es evidente que existan diferencias sutiles en la unión de los distintos sustratos de la nitrogenasa, esto sucede - porque hay sitios múltiples o porque los sustratos, por si mismos alteran el sitio activo. Parecen haber sitios distintos o modificados para : (a)= nitrógeno, hidrógeno, óxido de dinitrógeno, óxido nitroso; (b)= monóxido de carbono; (c) acetileno; (d)- cianuro, metilisocianuro, azida; y (e) desprendimiento de hidrógeno. (29).

El oxígeno es un inhibidor no competitivo de la reducción de nitrógeno y de la hidrólisis de ATP. Tal inhibición - es reversible. (1), (2), (3), (7), (14).

El mecanismo de la Fijación del nitrógeno .-

Aún se conoce muy poco acerca del mecanismo de reacción y de la naturaleza del sitio activo pero, sin embargo, han surgido ciertas fases que hacen interesante estudiar la ruta mecanística que la Naturaleza ha desarrollado para la reacción.

Con las mediciones en los cambios en los espectros EPR, relacionados con la unión con el ATP, la oxidación-reducción de la nitrogenasa y sus componentes y la interacción de los mismos se aportan evidencias experimentales de la secuencia más probable de dicho mecanismo (28).

De acuerdo con la información de la literatura, la ruta más probable obedece la siguiente secuencia:

(1) El ATP - Mg se une a la Fe-proteína reducida (no hay datos que juzguen si la Fe-proteína oxidada se une al ATP). Este enlace va acompañado de una señal marcada en el espectro EPR, la que implica un potencial de activación muy bajo (1), (7) y (27).

(2).- La Fe-proteína transfiere los electrones a la Mo-Fe-proteína y al mismo tiempo ocurre la hidrólisis del ATP.

(3).- La Fe-proteína se disocia de la Mo-Fe-proteína después de cada electrón transferido.

(4).- El sustrato se une a la forma activa EPR de la Mo-Fe-proteína.

Basados en estos tres últimos puntos, Hageman y Burris (1978) proponen un cambio en la nomenclatura de los componentes de la nitrogenasa, denominando nitrogenasa a la Mo-Fe-proteína, pues ésta es responsable únicamente de la reducción de los sustratos y nitrogenasa reductasa a la Fe-proteína, ya que ésta sirve únicamente para transferir electrones a la nitrogenasa.

(5).- En el estado basal, el espectro EPR de la Mo-Fe-proteína desciende en un 90% con respecto a la especie totalmente reducida indicando que el complejo Mg-ATP- Fe-proteína reducida transfiere electrones a la Mo-Fe-proteína.

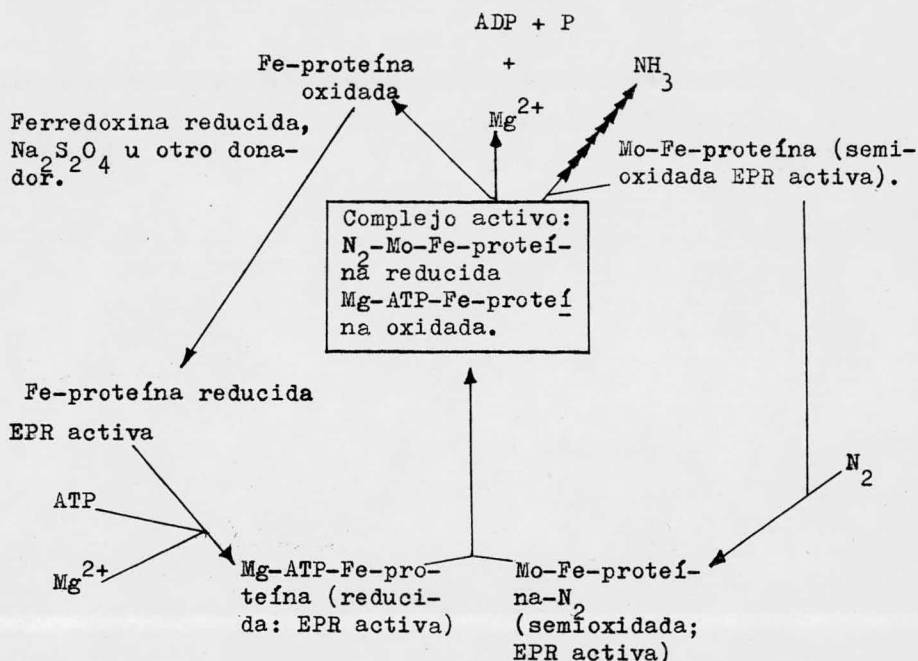


Figura III-4.- Representación esquemática de la reducción del nitrógeno por la nitrogenasa. Las flechas múltiples antes del amoníaco indican que los seis electrones se transfieren por etapas antes de que se forma el producto (7).

El mecanismo más simple requeriría tres adiciones sucesivas de dos equivalentes reductores para que se produjera primeramente una di-imina ($\text{NH} = \text{NH}$), después hidrazina ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$) y finalmente amoníaco. Estos productos estarían presentes durante la reacción enzimática en forma neutra, protonada o aniónica,

libres o coordinados a uno o dos metales iónicos. El amoníaco y la hidrazina son compuestos estables, sin embargo la di-imina es muy inestable.

Termodinámicamente la reducción total de nitrógeno a amoníaco por el hidrógeno es favorable; la formación de hidrazina libre es desfavorable y la de la di-imina es extremadamente desfavorable (2), figura III-5.

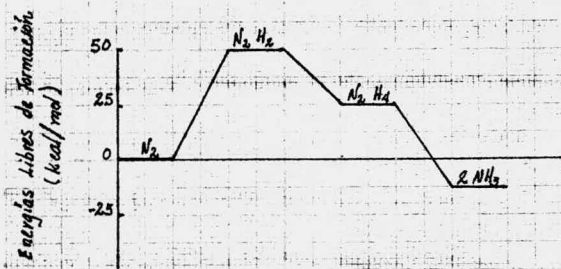


Figura III-5

El problema real en la fijación reductiva del nitrógeno por los microorganismos es rodear o evitar la adición altamente endotérmica de los dos primeros electrones.

La naturaleza tuvo que escoger entre:

1.- usar una ruta mecanísticamente simple que involucraría a la di-imina pero tendría una termodinámica desfavorable

2.- idear una ruta más complicada que evitara la formación de intermediarios parecidos a la di-imina en estructura electrónica y con propiedades termodinámicas favorables.

Schrauzer y colaboradores, (16) al (19), han observado,

por medio de sus modelos de estudio de la nitrogenasa, que es -- probable la formación de la di-imina. Pero ésta no es un sustrato para su modelo de estudio. La di-imina se descompone en nitrógeno e hidrazina la cual sí es reducida catalíticamente, figura III-6.

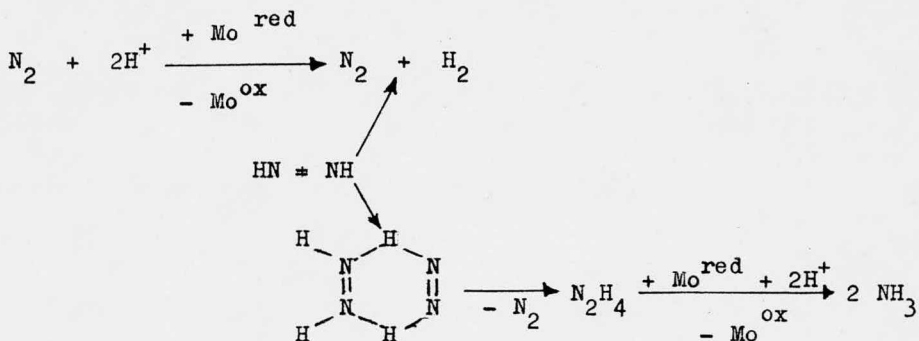


FIGURA III-6

Se han propuesto otros mecanismos, uno de ellos propone nitruros metálicos como intermediarios (3):

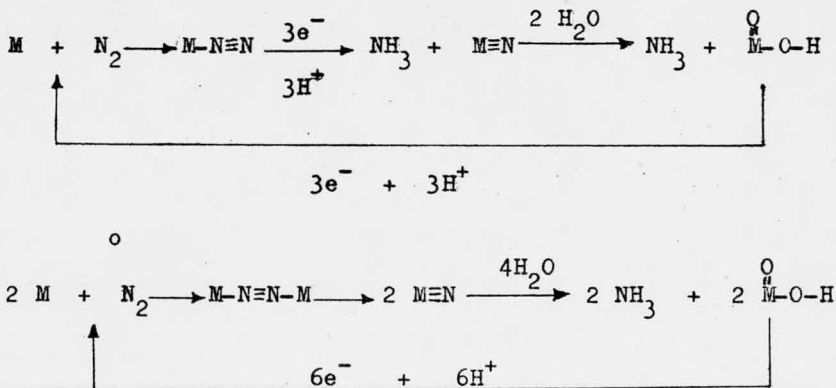


FIGURA III-7

Sin embargo necesitan un potencial reductor muy bajo.

Otros mecanismos proponen rutas evitando la formación de la di-imina y la hidrazina, estabilizando al diazeno por medio de un metal y un enlace de hidrógeno (2):

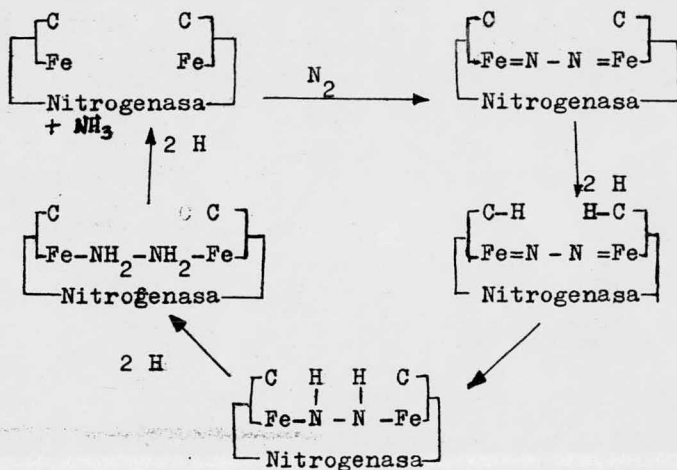


FIGURA III-8

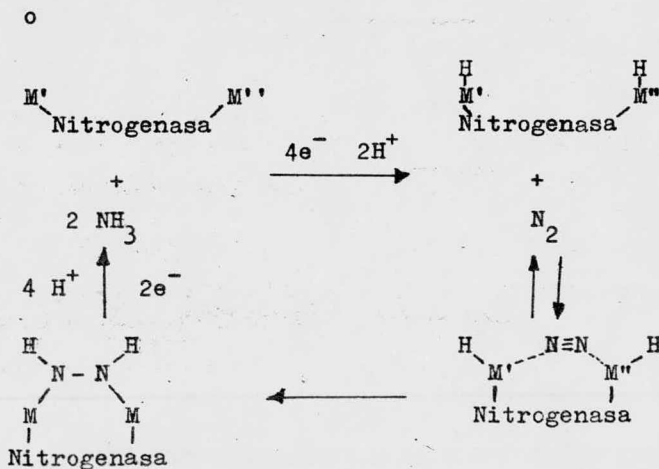


FIGURA III-9

En este último se evita la formación del diazeno como intermediario por medio de la adición de cuatro electrones de un hidruro dinuclear a un complejo de dinitrógeno dinuclear, sin embargo, no se ha detectado a la hidrazina como un producto de la fijación biológica del nitrógeno (2), (16) al (19).

Otra teoría propone (30) que la fijación del nitrógeno ocurre en un sitio Mo-S-Fe después de la reducción ATP-inducida:

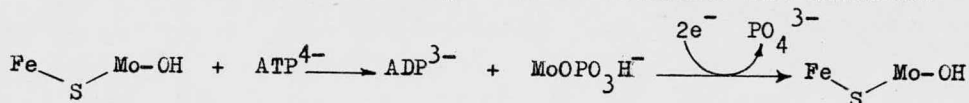


FIGURA III-10

En este sitio el fierro es preparado para la entrada del nitrógeno debido a su reducción a Fe^+ .

Se sugiere un sitio como en la figura III-10 para la coordinación del nitrógeno al fierro. En seguida puede ocurrir la adición del Mo-H al sistema π de N-N-Fe. Se sugieren dos reducciones subsecuentes que resultan en una hidrazina puente (2), (31):

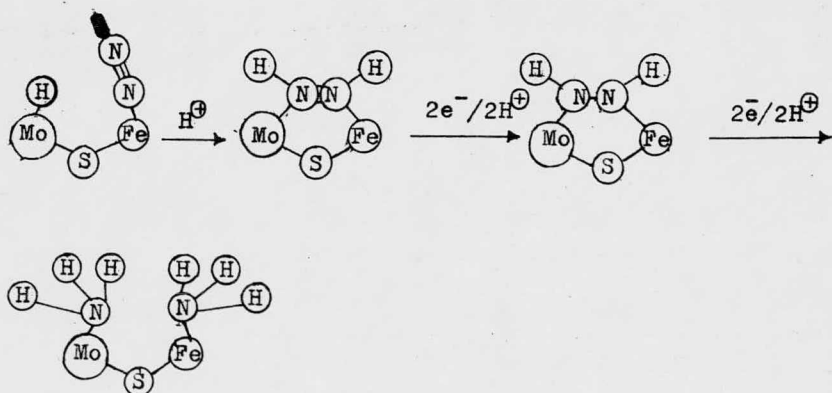


FIGURA III-11

MODELOS DE ESTUDIO EN LA FIJACION DEL NITROGENO.-

Tanto el molibdeno, el fierro no hemo y el azufre ácido-lábil se han reconocido como los componentes esenciales de la nitrogenasa (32), (33). En base a lo anterior se ha intentado -- producir modelos químicos que reproduzcan las funciones de la -- nitrogenasa y que al mismo tiempo aclaren el mecanismo que la -- misma sigue en la reducción biológica del nitrógeno.

Ya que el acetileno es un inhibidor competitivo de la fijación del nitrógeno y se supone que también se une al sitio - activo (29), se ha escogido como un sustrato adecuado para valorar la actividad enzimática de la nitrogenasa tanto de las pre-- paraciones naturales como de los modelos químicos.

Los modelos de la Mo-Fe-proteína se han centrado en -- complejos de molibdeno con ligandos con azufre y $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ o NaBH_4 como agentes reductores (34).

El mejor modelo de estudio reduce el acetileno en un - 0.3% en comparación con la velocidad enzimática (4).

Los compuestos de molibdeno probados incluyen Na_2MoO_4 , MoOCl_3 , MoCl_5 y heteropolimolibdatos. De los distintos ligandos con azufre, los que han mostrado mayor actividad son el ditioeritritol, 1-tioglicerol, 2-mercapetanol, cisteína y glutation, así como isonitrilos (16) al (20), (35). La actividad máxima observada sucede con la razón 1:1, metal:ligando.

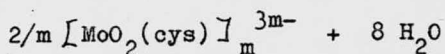
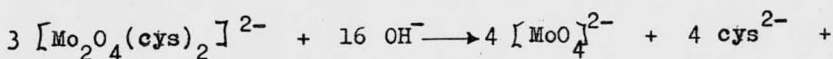
Los modelos que contienen cisteína como ligando, - - - $\text{Na}_2\text{Mo}_2\text{O}_2(\text{Cis})_2$, el cual es más activo que el complejo con histidina, en presencia de NaBH_4 producen especies monómeras, catalíticamente activas de Mo(V) (36). La formación de dichas especies se incrementa con el aumento del pH y se ha propuesto que se debe al ataque nucleofílico sobre el oxígeno puenteante que enlaza al molibdeno. FIGURA III-12.

donde Mo^{ox} = forma oxidada del catalizador (Mo^{6+} o Mo^{5+}).

Se observa que el amoníaco formado es una consecuencia de la descomposición de la di-imida en nitrógeno y amoníaco (16).

En la fijación biológica del nitrógeno la primera etapa, sustrato-dependiente puede describirse como la reacción del nitrógeno con el sitio activo de molibdeno reducido formando un nitruro cuya hidrólisis produciría una di-imida. Presumiblemente la di-imida permanece en la vecindad del sitio activo y puede -- ser reducida a hidrazina, sin embargo este último intermediario no es compatible con las pruebas encimológicas, pues no se ha -- observado que los cultivos fijadores de nitrógeno la asimilen -- (3). En este sistema, el molibdeno reducido es estimulado por -- ATP y otros nucleósido-fosfatos.

En base a datos analíticos y polarográficos (36) se ha observado que el complejo $\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{cys})_2^{2-}$ desproporciona en Mo(VI) y Mo(III) en lugar de formar Mo(V)-cys . Tal desproporcionación -- es más rápida conforme se eleva el pH, pues el complejo -- -- -- $\text{Mo}_2\text{O}_4(\text{cys})_2^{2-}$ es inestable a pH 9. La reacción total es:



A pH 8.2 el complejo no se descompone y al agregarle -- NaBH_4 se reduce en Mo(III) . A pH 9.3 el complejo se descompone -- lentamente. A pH 9.9 la descomposición es rápida y la conversión del acetileno es total en tres horas.

La reducción de $[\text{MoO}_4]^{2-}$, Mo(VI) por NaBH_4 en presen -- cia de cisteína dá una actividad inferior a la precedente. De -- estos resultados se deduce que el estado de oxidación de la es--

pecie activa es +3.

Este modelo muestra que la combinación de molibdeno -- con un ligando tiol forma un catalizador homogéneo altamente eficiente.

También se ha incluido al hierro como un factor importante del sitio activo, en donde el hierro transportaría los --- electrones al componente activador de la nitrogenasa. Se desco-- noce el mecanismo de este proceso; una posibilidad es que los -- puentes metal-azufre-metal proporcionan una ruta de baja energía para el transporte de los electrones. La figura III-14 muestra - la estructura de Mo-S-Fe que sirve como modelo a lo anterior.

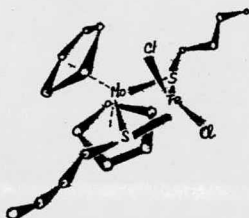


FIGURA III-14

Se desconocen las propiedades redox de esta molécula.

COMPLEJOS DE METALES DE TRANSICION CON NITROGENO MOLECULAR.-

Las investigaciones para producir un modelo adecuado - del sitio activo de la nitrogenasa se han complementado con el - estudio de la interacción del nitrógeno molecular con sales de - metales de transición. El nitrógeno molecular está considerado, tradicionalmente, como una molécula inerte. Sin embargo se ha -- demostrado que bajo condiciones similares a las del sistema en--

cimático, el nitrógeno molecular forma complejos con los iones de metales de transición (5). La formación del ión complejo binuclear $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}(\text{N}_2)\text{Ru}(\text{NH}_3)_5]^{4+}$ a partir del ión $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (40), estableció la habilidad de la molécula de nitrógeno para competir con el agua por un sitio de coordinación metálica y probó que debe existir un sitio metálico en la nitrogenasa en donde pueda ocurrir una sustitución de agua por nitrógeno molecular. Si la fijación de nitrógeno encimática ocurre en un sitio metálico, la molécula de nitrógeno debe ser capaz de desplazar al amoníaco formado para mantener el ciclo. La figura III-15 demuestra que el amoníaco puede ser desplazado del sitio nitrógeno-enlazante (41).

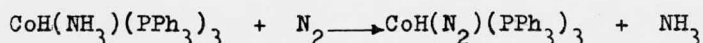


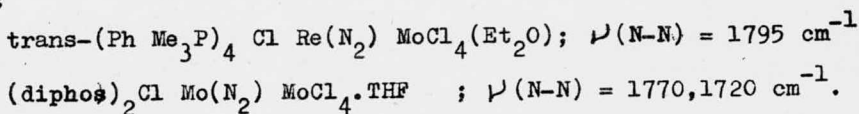
FIGURA III-15

El Molibdeno y el fierro, constituyentes esenciales de la nitrogenasa forman complejos estables con el nitrógeno molecular, desafortunadamente, los complejos formados con molibdeno, parecen tener muy poca relación con los sistemas biológicos ya que se refieren al molibdeno en su estado de oxidación 0 o +1 y a ligandos no biológicos, principalmente fosfinas terciarias (45)(46). Tales combinaciones, evidentemente, satisfacen la demanda, por parte del nitrógeno molecular, de orbitales metálicos vacíos de baja energía, π -aceptores y orbitales llenos de alta energía σ -donadores.

Los estudios de los complejos de metales de transición con nitrógeno molecular han revelado una interacción interesante bimetal-nitrógeno, pues cuando el nitrógeno molecular se une a ciertas combinaciones metal-ligando, retiene la capacidad de mo-

lécúlas como $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$, PF_5 , $\text{TiCl}_3 \cdot 3\text{THF}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 3\text{THF}$, $\text{MoCl}_4 \cdot 2\text{THF}$ - y $\text{Pt}_2\text{Cl}_4(\text{PEt}_3)_2$ como donadores (5).

En estos aductos binucleares, el valor de $\nu(\text{N-N})$ es -- arriba de 650 cm^{-1} , más bajo que en la molécula de nitrógeno libre, indicando un efecto de debilitamiento del enlace (42), por ejemplo:



Los complejos de nitrógeno molecular han proporcionado modelos, para algunas etapas en la fijación del nitrógeno, pero no para la reducción al amoníaco en condiciones similares a la fijación encimática. Evidentemente, el enlace N-N no es debilitado suficientemente en ningún complejo, como para romperlo bajo condiciones suaves reductoras en medio acuoso.

Chatt y colaboradores (43) han discutido los enlaces - en los sistemas lineales M-N-N-M' en términos de combinaciones lineales de orbitales metálicos d y p del nitrógeno molecular. - En la figura III-16 se muestra un esquema simplificado de orbitales moleculares Π para un sistema C_{4v} M-N-N-M'.

Los orbitales $1e$ y $4e$ son principalmente orbitales - Π de unión y Π^* de antiunión del nitrógeno con muy poco carácter metálico, dependiendo ésto de la afinidad electrónica de los orbitales metálicos con relación a los del nitrógeno. Los orbitales $2e$ y $3e$ son de carácter metálico d_{xz} y d_{yz} principalmente; - $1b_2$ y $2b_2$ son de carácter d_{xy} y su contribución al enlace es insignificante. La fuerza de el enlace N-N está gobernada por el - número de lectrones en los orbitales e; la molécula de nitrógeno proporciona cuatro electrones para llenar el nivel $1e$ y el carácter metálico parcial de este orbital resulta en un debilita--

miento ligero del enlace N-N. Todos los complejos conocidos -- M-N-N-M' tienen por lo menos un ión metálico d^n ($n = 4$ o 6); por lo que tienen suficientes electrones para llenar los orbitales moleculares $2e$ y $1b_2$. Ya que el orbital $2e$ es de antiunión para el nitrógeno, el enlace N-N se vería debilitado considerablemente. Sin embargo, este debilitamiento se verá contrarrestado si hay electrones disponibles para ocupar los orbitales moleculares $2b_2$ y $3e$.

Si el número total de electrones d de no-unión aportados por los dos metales en el sistema M-N-N-M' es no menos de cuatro y no más de ocho, entonces los orbitales $1e$ y $2e$ y muy probablemente el $1b_2$ estarán ocupados y el debilitamiento del enlace N-N será máximo. El molibdeno en sus estados de oxidación más bajos, Mo(II) y Mo(III), puede satisfacer este criterio. En base a estas ideas se propone un esquema especulativo para la reducción del nitrógeno molecular; figura III-17, en donde el molibdeno es capaz de un cambio en el estado de oxidación formal de tres electrones y la fijación catalítica del nitrógeno involucraría un ciclo entre Mo(III) y Mo(VI) o Mo(II) y Mo(II) y Mo(V). De estas dos posibilidades es más factible la última pues se desconoce Mo(II) en solución acuosa.

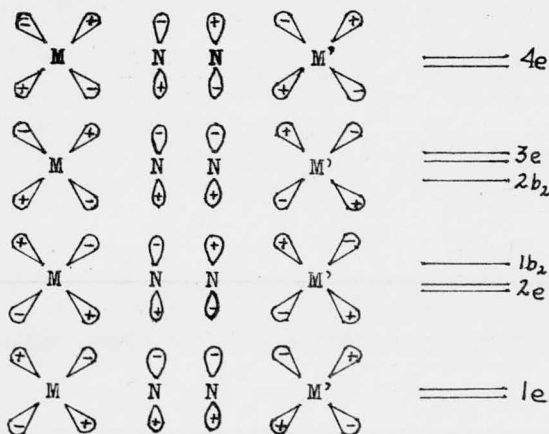


FIGURA III-16

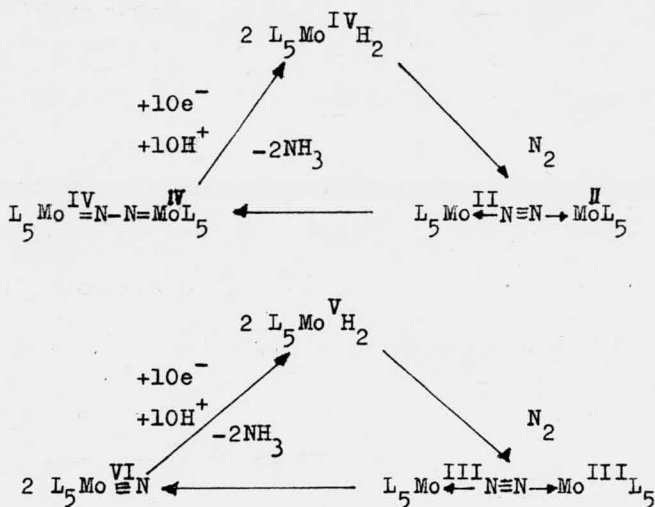


FIGURA III-17

Bulen y colaboradores (44) proponen que la encima en su estado basal posee una conformación proteínica tal que los centros metálicos no están a la distancia adecuada para unirse al nitrógeno, pero puede ocurrir un cambio en la conformación debido al ATP o a los iones H^+ . Otra posibilidad es que los cambios en las distancias metal-ligando que acompañan a la reducción del metal, antes de la unión con el nitrógeno, puedan ser acompañados por el cambio conformacional deseado. Una vez que el sitio metálico adquiere la posición correcta, el sistema binuclear se une al nitrógeno y puede ocurrir la transferencia electrónica de los iones metálicos reducidos; el resultado del ciclo sería la producción de amoníaco. La figura III-18 se puede aplicar al molibdeno y al fierro como el sitio de unión y el componente del sistema de transferencia electrónica.

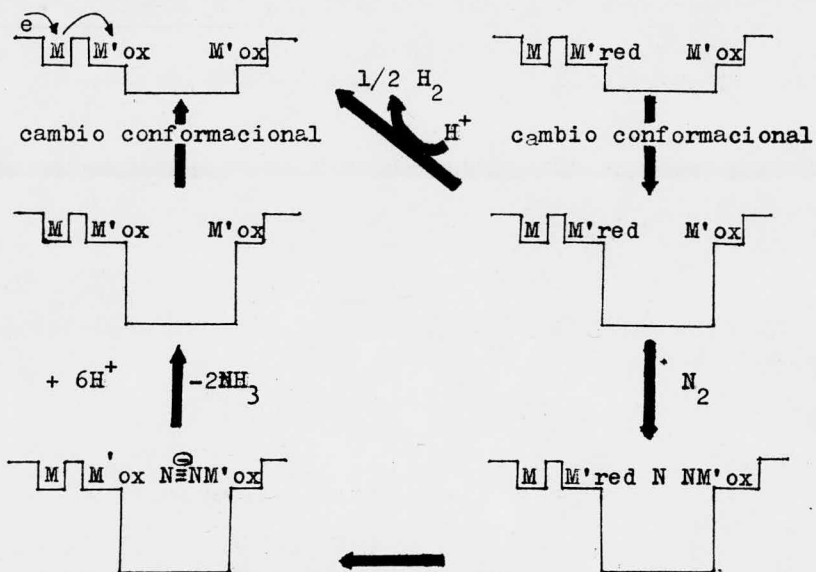
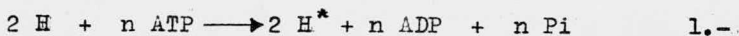


FIGURA III-18

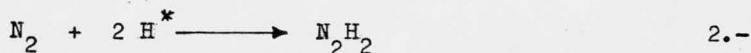
CONCLUSIONES

La nitrogenasa es el sistema enzimático responsable de la fijación del nitrógeno atmosférico en diversos microorganismos cuya característica común es ser procariotes.

La reducción total de nitrógeno a amoníaco es favorable termodinámicamente, pero la adición de los dos primeros electrones para la formación de la di-imina es muy desfavorable, sin embargo, se ha sugerido que al usar un agente reductor más poderoso se favorece la termodinámica de la primera etapa. El desarrollo irreversible de hidrógeno demuestra que se genera un agente reductor, más poderoso que el mismo hidrógeno (pero de potencial desconocido) debido a la acción del ATP. Por otro lado, la analogía con el acetileno demuestra que el primer producto sería cis-di-imina. De donde, la encima cataliza nominalmente dos reacciones distintas: 1).- la conversión de equivalentes reductores ($2H$), suministrados a un potencial equivalente al del hidrógeno, en un agente reductor más poderoso ($2H^*$) a expensas de la hidrólisis del ATP, o sea :



donde el valor más común de n es cuatro, y 2).- la reducción del nitrógeno:



seguida de reducciones posteriores hasta amoníaco.

La encima requiere, por lo menos, de dos sitios activos para la primera etapa de la reducción del nitrógeno. Un sitio compleja al nitrógeno y contiene como metales de transición al molibdeno y al fierro. El otro sitio suministra equivalentes reductores de bajo potencial, conteniendo como metal de transi--

ción al fierro. En efecto, la nitrogenasa está formada de dos -- componentes encimáticos.

Con el fin de aclarar el mecanismo de la fijación del nitrógeno, se ha logrado aislar su cofactor. Este cofactor satisface el requisito de fijar nitrógeno y de reducir al acetileno. Un estudio más profundo de sus funciones ayudará a elucidar el - enigma que todavía significa la nitrogenasa.

El hombre ha tratado de sintetizar un complejo capaz de fijar nitrógeno, pero las sustancias sintetizadas no reúnen todos los requisitos necesarios para obtener un rendimiento óptimo de amoníaco, similar al de la nitrogenasa y de una manera económicamente accesible, pues observamos que los fertilizantes nitrógenados se basan en el amoníaco y todos los métodos actuales para obtener este último requieren de grandes cantidades de energía, que consecuentemente redundan en el costo de estos fertilizantes.

El problema radica principalmente en descubrir el estado de oxidación del molibdeno y se han propuesto desde Mo(0) hasta Mo(VI). Con la cisteína como ligando se ha tratado de acercarse más a la estructura encimática.

En consecuencia, el mecanismo de la reducción de nitrógeno ha estado sujeto a la especulación. Ahora, sin embargo, las mediciones de los cambios en los espectros EPR que acompañan al enlace con el ATP, la oxidación-reducción de la nitrogenasa y sus componentes van dando datos experimentales que aclararán las etapas específicas del mecanismo de fijación del nitrógeno y la estructura del sistema encimático que constituye a la nitrogenasa con respecto al estado de oxidación del molibdeno.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Burris, R.H. Nitrogen fixation. en Plant Biochemistry. (Bonner, J. y Varner, J.E. Editores). Capítulo 2. págs. 887-907. Academic Press. E.U.A. (1976).
- 2.- Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Parshall, G.W. Bioinorganic --- Chemistry of Dinitrogen Fixation in Inorganic Biochemistry. (Eichhorn, G.L. Editor) Vol. 2 págs. 745-87. Elsevier ---- Scientific Publishing Co.. Holanda (1973).
- 3.- Postgate, J.R.
The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation.
Plenum Press
E.U.A. (1971)
- 4.- Bowden, F.L. The Biochemical Function of Molybdenum. en Tech niques and Topics in Bioinorganic Chemistry. (Mc. Auliffe, C A. Editor). Parte 3. 207- 67. The Mac Millan Press L.T.D. . Londres (1975).
- 5.- Stiefel, E.I.. The Coordination and Bioinorganic Chemistry - of Molybdenum en Progress in Inorganic Chemistry. (Lippard, S.J. Editor) Vol. 22. John Wiley & Sons. E.U.A. (1977).
- 6.- Cramer, S.P., Eccles, T.K., Kutzler, F.W., Hodgson, K. O., -- Mortenson, L.E.,. Molybdenum X-Ray Absorption Edge Spectra. The Chemical State of Molybdenum in Nitrogenase. J.Am. Chem. Soc. [98],(5) , 1287-8. (1976).
- 7.- Eady, R.R., Postgate, J.R. Nitrogenase. Nature. [249] . 805- 10. (1974).

- 8.- Chinese Academy of Agriculture and Forestry Sciences. Purification and Some Properties of Iron-protein of Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Wei Sheng Wu Hsueh Pao*. [16]. (2) . 126-30 . (1976).
- 9.- Emerich, D.W., Burris, R.H. Interactions of Heterologous -- nitrogenase components that generate catalytically inactive complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*. [73] . (12) . 4369-73. (1976).
- 10.-Shah, V.K., Brill, W.J. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [74] . (8). 3249-53 . (1977).
- 11.-Rawlings, J., Shah, V.K., Chisnell, J.R., Brill, W.J., Zimmermann, R., Münck, E., Orme-Johnson, W.H. Novel metal cluster in the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* . [253] . (4) . 1001- 4. (1978).
- 12.-Hageman, R.V.; Burris, R.H. Nitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*. [75] . (6). 2699- 702 . (1978).
- 13.- Andersen, K., Shangmugam, K.T.. Energetics of biological - nitrogen- fixation. Determination of ratio of formation of - H_2 to NH_4^+ catalysed by nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae* in vivo. *Journal of General Microbiology*. [103] . 107- 21. (1977).
- 14.-Burris, R.H. Preparation and properties of nitrogenase proteins. *The Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Pap. 23. 333-49. (Stewart, W.D.P. Editor). Cambridge University Press. E.U.A. (1975).

- 15.-Evans, H.J., Phillips, D.A.. Reductants for nitrogenase and relationships to cellular electron transport. The Biochemistry of Nitrogen Fixation. (Stewart, W. D. P. Editor). Cap. - 26. 389- 420. Cambridge University Press. E.U.A. (1975).
- 16.- Schrauzer, G.N.; Kiefer, G.W., Tano, K.K., Doemeny, P.A. - The Chemical Evolution of a nitrogenase model. VII. The Reduction of Nitrogen. J. Am. Chem. Soc. [96]. (3). 641-52 - (1974).
- 17.-Schrauzer, G.N., Robinson, P.R., Moorehead, E.L., Vickrey, T. M.. The Chemical Evolution of a Nitrogenase Model. XI. Reduction of Molecular Nitrogen in Molybdocyanide Systems. J. Am. Chem. Soc. [98]. (10), 2815-20 . (1976).
- 18.-Robinson, P.R.; Moorehead, E.L., Weathers, B.J., Ufkes, E.A., Vickrey, T.M., Schrauzer, G.N. The Chemical Evolution of a Nitrogenase Model. 14. Stoichiometric Reactions of Complexes of Molybdenum (V), Molybdenum (IV) and Molybdenum (III) with Acetylene and Nitrogen. J. Am. Chem. Soc. [99]. (11) . 3657-63 . (1977).
- 19.- Moorehead, E.L., Weathers, B.J., Ufkes, E.A.; Robinson, P.-Schrauzer, G.N. Chemical Evolution of a Nitrogenase Model . 15. Reduction of Coordinated Isonitriles in Mononuclear Complexes of Oxomolybdate (IV) and their use as Catalysts for the Reduction of Acetylene and Nitrogen. J. Am. Chem. Soc. [99] (18), 6089-95 . (1977).
- 20.-Streicher, S.L., Valentine, R.C. Comparative Biochemistry - of Nitrogen Fixation. Annual Review of Microbiology . [42] 279- 302 . (1973).

- 21.-La Rue, T.A., Kurz, W.G.W. Estimation of Nitrogenase in intact legumes. *Can. J. Microbiol.* [19]. 304. (1973).
- 22.- Cardenas, J., Mortenson, L.E. Role of molybdenum in dinitrogen fixation by *Clostridium pasteurianum*. *J. Bacteriol.* [123]. (3) . 978-84 . (1975).
- 23.-Orme-Johnson, W.H., Hamilton, W.D., Jones, T.L., Tso, M.Y.M. Burris, R.H., Shah, V.K., Brill, W.J. Electron paramagnetic resonance of Nitrogenase and Nitrogenase components ---- from *Clostridium pasteurianum* W.5 and *Azotobacter vinelandii* OP. *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* [69]. (11) . 3142-45 . (1972).
- 24.-Evans, H.J. Phillips, D.A. Reductants for nitrogenase and -relationships to cellular electron transport. *The Biochemistry of Nitrogen Fixation.* (Stewart, W.D.P. Editor) Capítulo 26. 389- 420. Cambridge University Press. E.U.A. (1975):
- 25.-Benemann, J.R., Yoch, D.C., Valentine, R.C., Arnon, D.I. The Electron Transport System in Nitrogen Fixation by *Azotobacter*. Azotoflavin as an Electron Carrier. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 64 . 1079. (1969).
- 26.- Ware, D.A. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Interaction with viologen dyes as measured by acetylene reduction. *Biochem. J.* [130]. (1) . 301-2 (1972).
- 27.- Ljones, T., Burris, R.H. Evidence for one-electron transfer by the iron protein of nitrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [80]. (1) 22-5 . (1978).

- 28.- Eady, R.R., Smith, B.E.; Thornely, R.N.F.; Yates, M.; Postgate, J.R. Kinetics and mechanism of nitrogenase action. The -- Biochemistry of Nitrogen Fixation. (Stewart W.D.P. Editor). Cambridge University Press (1975).
- 29.- Hwang, J.C; Chen, C.H.; Burris, R.H. Inhibition of nitrogenase-catalyzed reductions. Biophys. Acta. [292] (1) 256-70 --- (1973).
- 30.- Hardy, R.W.F.; et al. Adv. Chem. [100], 219, (1971).
- 31.- Purcell, K.F., Kotz, J.C. Inorganic Chemistry. W.B. Saunders Company. U.S.A. (1977).
- 32.- Bulen, W.A. Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* and reactions affecting mechanistic interpretations. Proc. Int. Symp. - Nitrogen Fixation. 1974 (Rub. 1976). 1, 177-86. Ed by Newton, W.E. Nyman, C.J.; Wash. State Univ. Press, Pullman, Wash.
- 33.- Kulikov, A.V. ; Syrtsova, L.A.; Lickhtenstein, G.I.; Risarskaya, T.N. Study of Nitrogenase from *Azotobacter vinelandii* by the spin label method. Mol. Biol. [9] (2). 203-12 (1975).
- 34.- Hardy, R.W.F., Burns, R.C.; Stasny, J.T.; Parshall, G.W. - The nitrogenase reaction. The Biochemistry of Nitrogen Fixation. Cap. 24. 351-76 (Stewart W.D.P. Editor) Cambridge University Press (1975).
- 35.- Schrauzer, G.N. ; Kiefer, G.W.; Doemeny, P.A-Kisch, H. Chemical evolution of a Nitrogenase model. VI. Reduction of cyanide ion, azide ion, nitrous oxide, molecular nitrogen, and -- other substrates by molybdo cysteine catalysts in the presence of nucleoside phosphates. J. Am. Chem. Soc. [95] (17), 5582-92 (1973).
- 36.- Savignac, M.; Cadiot, P.. Modele de Nitrogenase. Activite de Complexes molybdene cysteine dans la reduction de l'acetylene .

- J. Organometallic Chemistry. [146]. C13-C16. (1978).
- 37.- Shah, V.K.; Chisnell, J.-R.; Brill, W.J. Acetylene reduction by the iron-molybdenum cofactor from Nitrogenase. Biochem. Biophys. Res. Commun. [81]. (1). 232-6 (1978).
- 38.- Schrauzer, G.N. et al. The Chemical Evolution of a Nitrogenase Model. J. Am. Chem. Soc. [97]. 7069 (1975).
- 39.- Newton, W.E.; Corbin, J.L.; Schneider, P.W. and Bulen, W.A. J. Am. Chem Soc. [93]. 268. (1971)
- 40.- Harrison, D.E.; Taube, H. J. Am. Chem Soc. The Formation of $\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{N}_2^{2+}$ in aqueous solution by direct action of molecular Nitrogen. [89]. 5706-7 (1967).
- 41.- Yamamoto, A.; Kitazume, S.; Fu, L. S.; Ikeda, S. Reversible combination of molecular Nitrogen with a cobalt complex. Exchange reaction of Nitrogen-tris(Triphenylphosphine) cobalt -- with hydrogen, ethylene and ammonia. J. Am. Chem. Soc. [89]. 3071-2 (1967).
- 42.- Chatt, J.; Richards, R.L.; Sanders, J. R. Greatly Weakened bond between rhenium (I) and Molybdenum (IV). Nature. [224], 5225 (1969).
- 43.- Chatt J.; Fay, R.C.; Richards. R.L. J. Am Chem. Soc. (A), 1971, 702.
- 44.- Bulen, W.A.; Lecomte. J.R.; Burns, R.C.; Hinkson, J. Non-Haem Iron Protein. Role in Energy Conversion. (Ed. A. San-Pietro.) Antiock. Press- Yebow Springs (1965).
Pag. 261.

45.- Brulet, C. R.; van Tamelen. E.E. Ammonia formation from -
Molybdenum-bound Dinitrogen under weakly reducing protic Condi--
tions. Journal of the American Chemical Society. [97].(4).
911-2 (1975).

46.- Chatt, J., Pearman, A.J., Richards, R.L. The reduction -
of mono-coordinated molecular nitrogen to ammonia in a protic -
environment. Nature. [253]. 39-40. (1975).

TESIS



Tesis por computadora

Medicina 25 Local 2
Tel. 550-87-98

Frente a la Facultad de Medicina
Ciudad Universitaria