



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**QUIMICA BIOINORGANICA DE LOS METALES DE  
TRANSICION FIERRO Y COBRE**

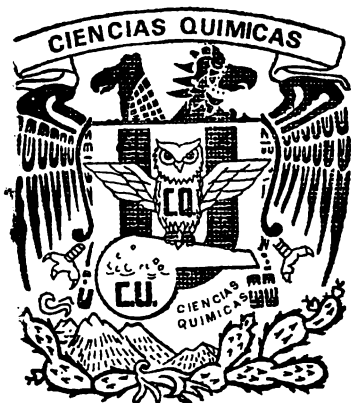
**T E S I S  
TRABAJO MONOGRAFICO**

Que para obtener el titulo de:

**Q U I M I C O**

P r e s e n t a

**Héctor Ricardo Sánchez Barrera**



México, D. F.

1981



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.

JURADO

PRESIDENTE PROF. ALICIA BENITEZ DE ALTAMIRANO

VOCAL " ALBERTO OBREGON PEREZ

SECRETARIO " MAETHA RODRIGUEZ PEREZ

1er. SUPLENTE " EMILIO BARRAGAN HERNANDEZ

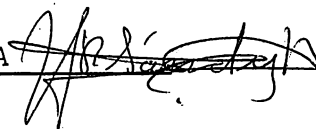
2do. SUPLENTE " GUILLERMO JOSE VALENZUELA

Sitio donde se desarrolló el tema:

FACULTAD DE QUIMICA CIUDAD UNIVERSITARIA  
MEXICO D.F.

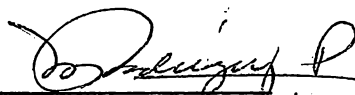
Sustentante:

HECTOR RICARDO SANCHEZ BARRERA



Asesor del tema:

MARTHA RODRIGUEZ PEREZ



Este trabajo lo dedico con mucho cariño a mi Padre (+) y Madre, a mi Esposa e Hijos, a mis Hermanos y aquellas personas que me brindaron su ayuda. A todos les doy las gracias - por su apoyo y aliento en mis estudios profesionales.

MUCHAS GRACIAS.



INDICE

Introducción.....	4
-------------------	---

QUIMICA BIOINORGANICA  
DEL FIERRO

I Grupo de las proteínas heme ..	10
II Grupo de la transferrina	50
III Grupo de la ferritina.	61
IV Grupo de la ferredoxina.....	80
V Grupo de los sideroforos....	89

QUIMICA BIOINORGANICA  
DEL COBRE

I Hemocianina.....	112
II Plastocianina, azurina y estalocianina....	117
III Galactosa oxidasa y superóxido dismutasa.....	135
IV Complejos peptídicos de Cu (II) y Cu (III)...	166
Bibliografía .....	190

NOTA: Gráficas y dibujos al final de cada capítulo.

## I N T R O D U C C I O N

Las investigaciones de los sistemas vivos se habían desarrollado independientemente entre las ciencias, ya que la Biología por su parte había tratado el problema estudiando los diferentes sistemas vivos que existen en éste planeta y por otro lado la Química lo había hecho estudiando las interacciones que sufren los elementos en diferentes condiciones y que son los que forman parte de esos sistemas vivos. Estas dos ciencias se acercaron de tal manera en estudios e investigaciones tan profundas que dieron lugar a otras interdisciplinas.

[ En el momento en que se encontró que la célula estaba formada por moléculas y éstas a su vez por átomos nació la Bioquímica ] que se desarrolló primero en la rama de Biorgánica, después en Biorgánica metálica y por último en Bioinorgánica, en cada una de éstas ramas se relacionaron las propiedades, procesos y funciones de los sistemas vivos desde un enfoque biológico y químico.

A la Biorgánica le correspondió investigar y estudiar las moléculas orgánicas que fueron parte de la célula y que como tales tienen sistemas de átomos de carbono (alquilos, arilos, fenilos, etc.) que a su vez son unidades de moléculas más grandes como aminoácidos y proteínas.

Después se encontró que éstas moléculas orgánicas tenían interacción con los metales en los sistemas vivos y de aquí partió el desarrollo de la rama organometálica, pero esta relación también se encontró en sistemas no vivos, como en el petróleo que ha sido base principal de su estudio.

{ Por último, se ha desarrollado la Química Bioinorgánica en la cual encontramos que los metales son un factor básico importante en la organización estructural de moléculas bioquímicas. }

Entendiendo que los metales con su carga positiva interaccionan con la carga negativa de otras moléculas como proteínas, aminoácidos y enzimas, a través de uniones coordinadas con átomos de nitrógeno, oxígeno, carbono, azufre o fósforo haciendo que la macromolécula resultante tenga actividad biológica.

Enfocando nuestra atención hacia ésta última interdisciplina [la Química Bioinorgánica podemos decir, que es la que estudia el papel de los metales en los sistemas biológicos que forman compuestos complejos que son indispensables para la vida y rompe así con las barreras existentes entre las ciencias básicas independientes como la Biología y la Química Inorgánica que se relacionan por medio de las funciones de las macromoléculas biológicas en la vida. }

Los sistemas vivos están rodeados por un medio ambiente inorgánico y mantienen interacción entre ellos y el medio que los rodea. A través de la historia de la evolución en el planeta estos sistemas se han adaptado al medio, han desarrollado sus estructuras, funciones, procesos y mecanismos de protección de acuerdo a las condiciones de la naturaleza. Son ejemplos, el sistema nervioso, toda clase de mecanismos homeostáticos, mecanismos inmunológicos en los animales superiores, producción de enzimas y subsecuente metabolismo de sustancias extrañas.

En la actualidad la explotación de la naturaleza por el hombre a través de la tecnología, ha creado cambios en el medio ambiente que han hecho que la vida se torne di-

fácil ya que las funciones y mecanismos apuntados anteriormente no han sido desarrolladas para situaciones artificiales del medio ambiente.

Los metales son parte del medio inorgánico y se encuentran en la corteza de éste planeta, siendo su origen las rocas y el suelo que al ser erosionados por el agua dar lugar y ríos colan a los metales en un medio acuoso propicio para que muchos sistemas vivos los utilicen. El hombre los extrae de las minas y así por un camino u otro encontramos a los metales en el medio ambiente y que serán usados por los sistemas vivos, voluntaria o involuntariamente ya que la acción de los metales sobre éstos será esencial o perjudicial para su existencia.

[ La acción de los metales en los sistemas vivos se ha estudiado en los últimos 10 años por dos caminos que son: a nivel biológico y a nivel molecular. ]

Biológicamente los compuestos metálicos son absorbidos por los organismos y metabolizados por un camino u otro. Algunos iones metálicos o sus compuestos pueden ser rápidamente excretados a través de la orina o excremento, mientras que otros pueden permanecer y así acumularse en los cuerpos de los organismos.

Algunos organismos marinos acumulan elementos específicos como Ca para formar conchas o caparazones ( $\text{CaCO}_3$ ) y otros Si en forma de silicatos. Otros como los Radiolarium usan  $\text{SrSO}_4$  como material esquelético, los Ascidians (Tunicates) concentran V en sus células sanguíneas, otras especies de Ascidians concentran Nb en lugar de V.

Es importante señalar que hay una rigurosa especificidad en la unión de los metales por los organismos mari-

nos. Los moluscos son especialmente eficientes en enriquecerse de metales del agua de mar y la razón es que éstos organismos acumulan iones metálicos selectiva o no selectivamente ya que su mucosa superficial está expuesta directamente a el agua del mar y actúa como adsorbente para los metales.

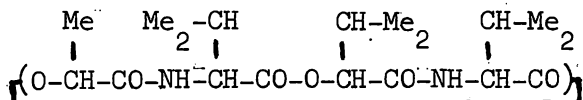
[En el hombre los iones metálicos como Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, Mg, Ca, K, Na, han sido considerados como esenciales, así el Co es un constituyente de la vitamina B<sub>12</sub> y sus derivados. El Si y B son considerados como esenciales para las plantas. El Al, Pb, Ni, Cr, Cd y Hg se encuentran igualmente en plantas y animales, sin embargo, no hay evidencias definitivas para considerarlos esenciales. El Pb, Cd y Hg son notorios por sus efectos nocivos.] Los elementos considerados esenciales también pueden ser dañinos cuando se encuentran en gran exceso si éstos no son removidos eficientemente por los organismos. Una deficiencia de éstos metales lleva consigo síntomas característicos en los organismos, ésto es conocido como "nivel de tolerancia" y difiere de un metal a otro y de un organismo a otro.]

Otras interacciones de los metales con los sistemas vivos a nivel biológico, son la de mantener [la presión osmótica constante en el interior y exterior de la pared celular, función que llevan a cabo el Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>, la sensibilidad de las células nerviosas y musculares requiere de la presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, el calcio también ayuda a mantener el ritmo cardiaco correcto, además es usado para la conversión de fibrógeno a fibrina y en la elaboración de la pared celular como corteza o esqueleto en la estructura de la celulosa. El Mg<sup>2+</sup> se encuentra como complejo en los ácidos nucleicos en el interior de la célula y también es usado en el proceso de fotosíntesis en las plantas ya que se encuentra en la clorofila.]

{ Metales de transición como el Fe y el Cu sirven - para transportar  $O_2$  en la hemoglobina de la sangre, el Zn y el Co sirven como sitios catalíticos en las enzimas.} Otros metales como Hg, Pb y Cd tienen acciones inhibitoras en las enzimas desactivándolas, pero existen organismos como bacterias aeróbicas que convierten el  $Hg^0$  en metil-Hg que es una forma de detoxificación para ellas mismas. El metil-Hg y sus derivados son fácilmente disueltos en medio acuoso y se acumulan en los animales carnívoros superiores en su cadena alimenticia. La bacteria Pseudomona K52 puede descomponer compuestos orgánicos de Hg como el fenil acetato de Hg y producir benceno y  $Hg^0$ .

Se han descubierto metilaciones de As, Se y Te - efectuadas por algunas bacterias productoras de metano.

{ La interacción de los metales con los sistemas vivos a nivel molecular es principalmente con sus proteínas.} Por ejemplo, {los diez metales esenciales para la vida del hombre se podrían dividir en dos grupos: el primer grupo - compuesto por  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  que se unen únicamente al  $O^-$  y son móviles, y el segundo grupo de la serie de transición Fe, Cu, Zn, Co, Mo, Mn, los cuales tienden a unirse covalentemente al  $O^-$ ,  $S^-$  y N y no se mueven.} Sin que ésta sea una clasificación estricta, los metales dependen de la misma para interactuar con las proteínas. La valinomicina que es una proteína usada en experimentos de sistemas de transporte iónico en biofísica con fórmula:



tiene una alta especificidad por el  $K^+$  con el cual forma - un complejo alrededor de 2000 veces más estable que con el  $Na^+$ . En éste complejo de  $K^+$  todos los grupos polares están

alrededor del ión metálico y éste queda en el centro de la molécula y los grupos no polares quedan hacia afuera de la molécula, sus uniones de hidrógeno mantienen la molécula en una conformación conveniente y el centro polar es formado - del tamaño justo para que entre el ión  $K^+$ , que es coordinado octaédricamente por seis átomos del carbonilo de un éster ( $K-O$  aprox.  $2.8 \text{ \AA}$ ) por una atracción de tipo ión-dipolo. El mecanismo de movimiento de complejos de ésta clase a través de membranas biológicas ha sido sugerido como una bomba para empujar los iones alcalinos y vencer la supuesta difusión en las células, siendo éste un campo importante para la investigación.

Las enzimas de Zn actúan como catalizadores superácidos y la geometría alrededor del metal puede ser descrita como un tetraedro irregular. La substitución del Zn (II) por Co (II) mantiene la actividad enzimática y permite un registro del espectro de absorción visible debido a la transición d-d de la enzima de Co (II) en solución. El  $Cd^{2+}$  es también similar al  $Zn^{2+}$ , está situado en la base de una grieta o abertura en la proteína y el substrato de geometría exacta puede entrar en la grieta y puede atacar al  $Zn^{2+}$  sobre el lado "abierto" o puede ocurrir en desplazamiento de  $H_2O$  (aunque esto no sucede en todos los casos) a la vez que la reacción apropiada se efectúa. La naturaleza de la simetría del sitio en éstas enzimas puede ser estudiada por los efectos inhibidores que tienen sus propiedades físicas.

[ La principal proteína almacenadora de Fe se encuentra en el hígado y vesícula del hombre, llamada ferritina, que consiste en una esfera, la cual tiene un centro muy denso de electrones de hidróxido férrico y fosfatos. Se cree que hay cerca de 2000 átomos de Fe en el centro los cuales están unidos a una cubierta proteínica (apoferritina).

El mecanismo por el cual el Fe de la ferritina es movilizado se cree que es controlado por óxido-reducción en presencia de ciertos quelatos desconocidos. Sin embargo, - en el fluido sanguíneo, se piensa que la proteína que contiene el Cu "azul" de óxido-reducción la ceruloplasmina que es la que controla el intercambio de Fe de apotransferrina para formar transferrina, la cual juega un papel clave en la utilización del Fe para la biosíntesis de hemoglobina.)

Ahora, una vez vistas las interacciones que sufren los iones metálicos a nivel biológico y molecular, veremos cuales han sido los conceptos básicos de la Química Inorgánica más relevantes que se han usado en los estudios e investigaciones para esclarecer las interrogantes que plantea la interacción de los iones metálicos con los sistemas vivos.

En el caso donde las fuerzas iónicas o electrostáticas son predominantes en la fuerte unión, ésta es gobernada por el potencial eléctrico del ión metálico, que es  $Z_e/r$  ( $Z_e$ =carga eléctrica y  $r$ = radio iónico). De esta forma, los iones metálicos con potenciales eléctricos similares pueden ser intercambiables. El  $Ca^{2+}$  en muchos sistemas biológicos puede ser substituido por  $Eu^{2+}$  o  $Sr^{2+}$  y éstos pueden ser utilizados como cationes informadores en la investigación de ciertas funciones biológicas del  $Ca^{2+}$ . Si se utiliza  $Sr^{2+}$  la radioactividad de éste se hace detectable en los huesos, pero esto puede producir efectos peligrosos en la médula de los huesos donde se producen las células sanguíneas. El  $Be^{2+}$  puede substituir al  $Mg^{2+}$  aunque es mucho más pequeño pero tiene un alto potencial eléctrico y se une más fuertemente a algunas proteínas que el  $Mg^{2+}$  y entonces bloquea su actividad. El mismo factor gobierna el número de coordinación y la energía de hidratación de un catión.



La coordinación de otros ligandos es una substitución de moléculas de  $H_2O$ . Por ejemplo, el  $K^+$  es deshidratado y coordinado por ligandos hidrofóbicos, más rápidamente que el  $Na^+$ . Otro factor importante es el tamaño del catión. Hay varios ligandos macrocíclicos conocidos, biogénéticos y sintéticos, los cuales se unen a un ión metálico alcalino - en particular debido a su tamaño, que es el caso de la valinomicina y el  $K^+$  del que ya hablamos.

La fuerza de los grupos coordinadores en orden biológico, son las moléculas N-imidazoles,  $NH_2$  (lisina, etc.) bases purinas y pirimidinas (DNA y RNA) etc. O-OH (serina, -tirosina, etc.), COO (ácido glutámico),  $PO_3$  etc.; S-SH (cisteína), SR (metionina) y otros. Cada ión metálico tiene una relativa fuerte afinidad por ciertos átomos coordinantes; - por ejemplo, el  $Co^{3+}$  por el N, el  $Fe^{3+}$  por el O etc. Sin embargo, la especificidad no es muy estricta y tal vez débil - en muchas proteínas. Entonces el problema es totalmente complejo.

Otros factores son la llamada energía de estabilización de campo cristal y la covalencia. La anterior está estrechamente relacionada con los conceptos de dureza-suavidad de la pareja ión metálico-ligando.

Los métodos físicos que se han usado para el estudio e investigaciones de la interacción de los iones metálicos con los sistemas vivos son métodos de estudio de compuestos inorgánicos particularmente de los complejos de coordinación como los espectros visibles, infra-rojo, ultravioleta, resonancia magnética nuclear, resonancia de espín-electrón, dicroísmo circular, electroquímica (polarografía y conductancia), susceptibilidad magnética, cristalografía de rayos X.

Por medio de estos métodos se han podido definir y aclarar las estructuras de los anillos porfirina, los sitios catalíticos de las metalo-enzimas, la localización exacta del metal en la molécula, la geometría que tienen los ligandos alrededor del ión metálico, la substitución del ión metálico nativo por otro similar a él y los efectos que causa este cambio en la molécula.

Luego de haber descrito un panorama general de lo que estudia e investiga la Química Bioinorgánica, reconocemos la importancia de ésta interdisciplina y prueba de esto es que se han organizado en los últimos años, dos congresos sobre la materia, el primero efectuado en 1970 y el segundo en 1977; en Universidades de Canadá y E.U. se han iniciado cursos de Química Bioinorgánica desde 1971 de licenciatura y doctorado.

El objetivo de éste trabajo es precisamente exponer los avances que se han dado en el estudio e investigaciones de la Química Bioinorgánica de los metales de transición Fe y Cu en los últimos 10 años, en lo que se refiere a la localización de los metales en la estructura de las proteínas, la coordinación de los ligandos, identificación de los mismos, estados de oxidación de los iones metálicos, todo esto en diferentes sistemas vivos.

También un objetivo de éste trabajo es el de contribuir a impulsar los estudios e investigaciones que se presentan con un amplio panorama en esta área y esperamos que sea un trabajo bien logrado de tesis para examen de Licenciatura.

QUIMICA BIONORGANICA DEL FIERRO

I

GRUPO DE LAS PROTEINAS HEME

Quizá, el grupo de proteínas de Fe más estudiado son las hemeproteínas, las investigaciones y estudios que se han hecho sobre la estructura, comportamiento del metal y su función se basan principalmente en la investigación de datos espectroscópicos y magnéticos de las proteínas naturales o de derivados de las proteínas naturales y de compuestos complejos sintéticos semejantes a las proteínas.

En la medición y determinación de los datos de los diferentes métodos espectroscópicos y magnéticos se han usado como variables; el cambio de estructura del anillo porfirina, cambio de estado de oxidación del metal, cambios de ligandos del metal, cambios de medio que rodea a la proteína, cambio del metal, resultando en efectos significativos sobre un número de parámetros físicos observables independientemente que han servido para establecer con más detalle aquellos aspectos de estructura que determinan la función de las hemeproteínas.

El anillo porfirina o heme es un sistema que une cuatro anillos pirroles a través de puentes meteno (=CH-) caracterizándose éste sistema por las dobles uniones conjugadas. Los compuestos de porfirinas naturales son formados generalmente por adición de substituyentes en las posiciones de la 1 a la 8 ó bien a los puentes meteno  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ , y son llamados de acuerdo al número y tipo de substituyentes. Las porfirinas sintéticas son formadas por adición de substituyentes a los anillos de pirrol de la porfina.

Quitando los protones del nitrógeno pirrólico, la porfirina se comporta normalmente, como ligando tetradentado y forma fácilmente compuestos complejos con una variedad de metales. La porfirina como se observa en la figura 1, - es una molécula plana, los iones metálicos al reaccionar - con la porfirina ocupan el hueco en el centro del plano del anillo.

En las hemoproteínas como la hemoglobina, mioglobina, citocromo, es el Fe el que ocupa ese hueco.

Al cambiar los ligandos axiales del metal que son el quinto y sexto sitios de coordinación del Fe en la hemoproteína y que quedan por arriba y abajo del plano del anillo porfirina, afectan la fuerza de unión entre el Fe y los nitrógenos de la porfirina que son los primeros cuatro sitios de coordinación en el plano; recíprocamente cambios en los grupos de la periferia del anillo porfirina alteran a su vez la basicidad de los nitrógenos de la porfirina, la unión entre los nitrógenos del anillo y el Fe, y la unión entre el Fe y los ligandos axiales. Cada efecto cis y trans ha sido bien estudiado para porfirinas de Fe(II), pero en menor grado para hemoproteínas.

Sin embargo, muchos detalles de interpretación de los efectos en compuestos de Fe(III) se han obtenido recientemente.

La magnitud de cambios en varias propiedades físicas usando el ligando axial como variable se muestra para una serie de deuteroheminas (fig. 2).

X representa la variable ligando axial en estos compuestos de Fe(III) de alto espín. Efectos muy marcados de los ligandos sobre la banda del infrarojo cercano, el  $\pi$

co cuádruple del espectro de Mossbauer, y picos de campo cero medidos directamente en el infrarojo lejano, son ilustrados por datos en la tabla 1.

La figura 3 ilustra cambios en el espectro electrónico en soluciones de cloroformo. El espectro electrónico, en benceno es ligeramente diferente, pero en general es similar (fig. 4).

Las diferencias causadas por efecto del solvente no son diferencias encontradas entre ciertas hemeproteínas. El cambio en el espectro electrónico atribuido a el cambio en el ligando axial sigue el mismo orden de ligando en las otras propiedades físicas incluyendo la resonancia de espín electrónico (ESR), la cual muestra diferencias significativas en el ancho de la banda  $g=6$ , y en el espectro de resonancia magnética nuclear (NMR) donde las magnitudes de cambios paramagnéticos varían.

El espectro de resonancia magnética de protón se ilustra en la figura 5 para los derivados azida y fenoxo en  $CDCl_3$ . Son notables los grandes cambios paramagnéticos para los protones porfirina y también para los protones del ligando fenoxo. No es difícil señalarlo en las heminas y proporcionar una base para la aplicación de estudios de resonancia magnética nuclear en hemeproteínas paramagnéticas. Sin embargo, hacer señalamientos en el caso de las proteínas es más difícil; separación de contacto, pseudo-contacto, y efectos de campo de anillo común representan un mayor problema.

La magnitud de los efectos de campo de anillo común es ilustrado por la influencia de concentración en el modelo de metil anillo y la resonancia del metil ester para el dimetil ester 2,4 dipropionildeuteroporfirina IX diamag-

nético, en  $\text{CDCl}_3$ . (fig. 6). Como la concentración es incrementada, el equilibrio entre especies monoméricas y dimericas es desplazado en favor del dímero. La gráfica de cambios químicos contra concentración (fig. 7) revela que la resonancia del grupo metilo 5 es menos sensible a la formación del dímero que los metilos 1, 3 y 8. Pueden ocurrir cambios en la frecuencia como un resultado de los efectos de campo de anillo común intermolecular presentes en el dímero pero no en el monómero. Las técnicas espectroscópicas mencionadas se han aplicado a las hemeproteínas. Determinaciones de bandas de campo cero en el IR lejano se han hecho en fluoruro de mioglobina ( $11.9 \text{ cm}^{-1}$ ) y fluoruro de hemoglobina ( $12.5 \text{ cm}^{-1}$ ) y se han comparado con fluoruro de protohemina ( $10.0 \text{ cm}^{-1}$ ) y fluoruro de deuterohemina ( $11.1 \text{ cm}^{-1}$ ). Fue encontrado un valor de E (E/D ca. 0.085) para la azida protohemina como base de una contribución del ligando azida para la distorsión rómbica en ausencia de cualquier proteína o una histidina trans, como en el caso de las azidas de mioglobina y hemoglobina.

Es claro que estas aproximaciones a lo largo de las determinaciones de estructura de hemeproteínas con rayos X representan pruebas altamente prometedoras, sin embargo, pueden ser estrictamente limitadas en su interpretación en términos precisos para explicar la función de la enzima. La identidad de los ligandos axiales unidos al metal en una hemeproteína dada, bajo un grupo de condiciones es frecuentemente oscura. Además, aún si los ligandos son conocidos, no se puede suponer conocimiento de la estereoquímica, fuerza de unión, y medio ambiente de los ligandos en el disolvente o en la proteína, cualquiera de estos es un factor de importancia para las propiedades exhibidas por la hemeproteína. Si el ligando tiene protones puede usarse el espectro de resonancia magnética nuclear. Recientemente se han probado técnicas de IR en ésta área.

El espectro IR de soluciones acuosas de hemoglobinas y mioglobinas presentan una "ventana" de absorción relativamente baja entre 1750 y 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas de ligandos-como; monóxido de carbono azida, y cianuro unidos a éstas - hemeproteínas han sido estudiados por una técnica diferente de IR desarrollada por Alben y McCoy. La banda de CO fue - observada unida a la hemoglobina en las células de la san-- gre. Los derivados azida para cada una de las proteínas - presentaron dos bandas (fig. 8) que indican las formas de - bajo y alto espin. Con la mioglobina dos bandas de CO son- observadas (fig. 9), mientras que sólo una banda de CO se - encontró para hemoglobinas normales. Así, con los deriva- dos de CO y  $\text{N}_3$ , la mioglobina muestra una gran tendencia pa- ra unir ligandos por dos caminos, uno más que la hemoglobi- na. Se concluye de los datos del espectro IR que los ligandos CO y  $\text{N}_3$  forman significativamente uniones flexionadas - Fe-ligando en hemoglobinas y mioglobinas (fig. 10). Las - uniones aparecen más grandes en la mioglobina, por lo tanto la  $\nu_{\text{CO}}$  es mayor de  $1944 \text{ cm}^{-1}$  para la COMbs comparada con -  $1951 \text{ cm}^{-1}$  de la COHbA; se espera que una frecuencia baja - acompañe a una mayor desviación de la linealidad. La falta de sensibilidad de la frecuencia del ligando a cambios de - pH en proteínas normales, lo mismo que efectos de substitú- ción de aminoácidos por la histidina lejana de hemoglobinas anormales, sugieren una interacción de unión entre la histidina lejana y el ligando, no una unión hidrógeno como se - propone en un estudio de rayos X de  $\text{N}_3\text{Mb}$  sino mejor una in- teracción n- $\sigma$ donador-aceptor con la histidina como donador y el átomo ligando unido al Fe como aceptor. Así, la unión marcada (?) en la figura 10 representa una unión entre un- carbóno de CO parcialmente positivo y un nitrógeno de la - histidina parcialmente negativo. Aunque bandas de IR para- uniones de  $\text{O}_2$  no son útiles por su baja resolución, datos - de rayos X han sido obtenidos para  $\text{O}_2\text{Hb}$  ó  $\text{O}_2\text{Mb}$ , indudable-- mente que el  $\text{O}_2$  ocupa el mismo lugar que el CO y experimen-

ta interacciones de unión con el Fe(II) y la histidina lejana similares. Una unión lineal Fe-O<sub>2</sub> es excluida por fundamentos teóricos y estéricos. Sin embargo, una unión flexionada de Fe-O<sub>2</sub> es completamente consistente con los datos disponibles. Y la mayor afinidad del O<sub>2</sub> por la mioglobina más que por la hemoglobina está de acuerdo con una mayor flexión y una "cavidad estrecha" en el caso de la oximioglobina. En el otro caso, los datos útiles del IR y de rayos-X no sugieren flexión en el cianuro pero son más compatibles con la presencia de uniones lineales Fe-CN en las ciano mioglobinas y hemoglobinas.

La oxidación de la oxihemoglobina diamagnética produce la ferrihemoglobina, un derivado paramagnético de alto espín y 5 derivados de bajo espín los cuales pueden ser estudiados con resonancia paramagnética de electrón (EPR). Para muchas proteínas heme, existen 5 combinaciones de ligandos Z de bajo espín, cada combinación tiene un rango de valores "g", pueden presentarse naturalmente o a través de modificaciones químicas, utilizando ligandos endógenos de la heme. Cuatro de estas combinaciones de ligandos tienen necesariamente un átomo de nitrógeno de una histidina. Los otros ligandos Z posibles son OH<sup>-</sup>, N histidilo, S metionilo, y un ligando nitrogenado de composición química indeterminada. La quinta combinación de ligandos Z tiene un S de cisteína y una base nitrogenada como las combinaciones anteriores. En una mezcla se pueden separar cuantitativamente cada especie de bajo espín y ensayar para todas los citocromos paramagnéticos de hemoglobina en células rojas intactas.

Existe un buen número de proteínas heme que se presentan en el estado ferroso y que son muy interesantes, pero estas no se pueden estudiar por resonancia paramagnética de electrón.



Los compuestos férricos existen en sus dos estados de espín: alto espín ( $5/2$ ) y bajo espín ( $1/2$ ). La resonancia paramagnética de electrón de cada uno de ellos es muy diferente cuando son examinados a bajas temperaturas en soluciones tipo congeladas de porfirinas o proteínas heme. La figura 11 es la gráfica de un espectro de EPR típico de una absorción derivativa observado a bajas temperaturas en el aparato de banda X (900 Mc/seg.). El estado de alto espín es el superior. Hay una extensión de la absorción de los valores "g" desde 6 hasta 2. El valor "g" es un factor de la escala, que es la inversa del campo magnético y es más usado porque ya tiene dividida la frecuencia del espectrómetro. Los espectros son tomados en la forma derivativa, y así estas formas representan una absorción del rango "g"-6-2. Hay un espectro axial, que se puede esperar de una molécula como la porfirina que tiene simetría de dobles enlaces si no se hace caso de la diferencia entre los grupos sustituyentes de la periferia. La curva de abajo es de un típico compuesto férrico de bajo espín y tiene tres absorciones derivativas características. Con suficiente precisión, los tres valores "g" pueden ser leídos a la derecha de los tres lugares indicados.

Ahora examinemos un espectro EPR real de un ejemplo de porfirina. El cloruro de hemina disuelto en N,N-dimetilformamida da el espectro formado en la figura 12. La curva de absorción de abajo se extiende en g-6-2 y la curva superior (absorción derivativa) es muy grande en g=6 y escasamente perceptible en g=2. Hasta donde se puede decir de cada uno de los espectros, el sistema es axial;  $g_x$  y  $g_y$  están en 6, mientras que  $g_z$  está en 2. Se puede convertir fácilmente a la hemina en un compuesto de bajo espín por adición de ligandos que reemplazaran al cloro. Uno de estos ligandos es el mercapto etanol; al adicionarlo al ejemplo y congelando la solución se obtiene el espectro de la figura 13. Este es el espectro de EPR del compuesto protoporfiri-

na IX mercaptoetanol (la curva inferior es de absorción, la curva superior es de absorción derivativa). Se pueden leer los tres valores de "g", y la absorción se extiende en este caso desde 2.37 a 1.93. El pico derivativo (segundo a la derecha) es debido a el remanente de cloruro de heme y está en  $g=2$ . Este compuesto biológicamente no es muy interesante, pero un compuesto exactamente análogo puede hacerse por adicionar simplemente mercaptoetanol a una proteína-heme, como la mioglobina. Al hacer esta operación se obtiene el espectro de EPR y es esencialmente idéntico. Así se hace un compuesto mercaptoetanol heme interno en la misma proteína, y es exactamente como la serie de compuestos que se están estudiando.

La mioglobina es una proteína heme que se encuentra en los músculos rojos, une oxígeno y se presenta normalmente en el estado ferroso, pero puede ser convertida rápidamente a el estado férrico. Se compone de una cadena polipeptídica y un grupo heme.

La hemoglobina es una molécula más complicada que la mioglobina, aunque evolutivamente están muy relacionadas. La hemoglobina está formada de cuatro cadenas polipeptídicas y cada una tiene un grupo heme. Un par de cadenas es semejante entre sí y se les llama alfa ( $\alpha$ ) y el par restante también semejante entre sí llamadas beta ( $\beta$ ). A simple vista, las cadenas alfa y beta no pueden ser distinguidas de la cadena de mioglobina. Sin embargo, difieren en muchos detalles, pero tienen el mismo número de regiones helicoidales que son ordenadas en la estructura terciaria.

Ahora veremos un interesante experimento que sólo tendrá una interpretación fenomenológica hasta que examinemos un modelo de esta molécula. Empezaremos con hemoglobina A férrica, que es la forma oxidada de la hemoglobina nor

mal que probablemente todos tenemos, consiste de dos cadenas alfa y dos cadenas beta. Se oxida a la forma férrica - de alto espin con ferricianuro. Es estable por un tiempo - largo, y su espectro de EPR se muestra en la figura 15 (curva superior). Si adicionamos histidina a éste ejemplo, se encuentra que hay un cambio en la extensión. La substancia de alto espin decrece, y se forma un compuesto de bajo espin. Sucede un hecho interesante si empezamos con hemoglobina H, que es una hemoglobina anormal que consiste de cuatro cadenas beta.. No es muy estable a diferencia de la hemoglobina A, pero da tiempo suficiente (aprox. 3 hrs.) para producir un hemicromo que es el nombre que se les da a ciertos compuestos férricos de bajo espin cuando se adiciona - una histidina. Si manejamos dos experimentos paralelamente, la oxidación de la hemoglobina A no da productos que nos puedan ayudar, mientras la oxidación de la hemoglobina-H produce productos que dan información de la histidina adicionada a la hemoglobina A.

Si observamos el modelo de una cadena revelará - que es lo que está sucediendo. La figura 16 es el modelo de Dickerson sobre la mioglobina, pero se puede suponer que es cualquiera de las cadenas de la hemoglobina. El ligando cercano no porfirina al átomo de Fe es el átomo de nitrógeno de un anillo imidazol que pertenece a una histidina y - precisamente se le llama el ligando cercano. Del otro lado del anillo porfirina hay un espacio relativamente vacío en el cual se transporta oxígeno en estas moléculas cuando están en el estado ferroso. Más alejado y fuera para hacer - una unión, hay otro anillo imidazol con su átomo de nitrógeno dirigido hacia el heme.

En este espacio se pueden adicionar moléculas muy pequeñas como el mercaptoetanol o la histidina. En estas - condiciones, la hemoglobina inestable reajustará la estruc-

tura terciaria para que el átomo de nitrógeno endógeno pueda coordinarse con el átomo de Fe. Así, la heme existe como un compuesto dihistidina. Se producen exactamente los mismos átomos ligandos como residuos de la única estructura terciaria al adicionar otra histidina en espacio o cavidad. Por lo tanto el Fe es coordinado por la porfirina y dos átomos de nitrógeno de imidazol. Sin tomar en cuenta detalles, estos dos compuestos parecen idénticos en el espectro de EPR.

Se pueden hacer cualquier número de compuestos interesantes por este camino, con átomos ligando exógenos y endógenos a la molécula. Por ejemplo, cadenas alfa oxidadas de hemoglobina A que se separaron de las cadenas beta, muestran un espectro de EPR de alto espin similares a aquellos que ya vimos. Cuando el pH es aumentado, aparece un compuesto que está en equilibrio con el compuesto de alto espin. Este es justamente un compuesto hidróxido de la cadena normal alfa férrica. El espectro EPR de un ejemplo casi desplaza completamente a estas formas de bajo espin que se muestran en la figura 17. (A) Forma hidróxi: cadenas alfa oxi fueron oxidadas con 5 proporciones moleculares de ferricianuro en solución reguladora 0.02 M de tris-clorhidrato, pH 8.0. Inmediatamente el ferricianuro fue eliminado y la solución reguladora cambiada por tris-sulfato 0.15 M, pH 8.7, por el paso en una columna pequeña de Biogel P-2. (B) Forma dihistidilo: las cadenas alfa férricas de alto espin se dejaron durante 1 hora en solución reguladora de fosfato 0.05M, pH 5.6. En un tiempo corto esto es espontáneamente reversible favoreciendo a el compuesto de alto espin y cambiando el pH. Sin embargo, en estas condiciones, éste compuesto, también, se reajustará espontáneamente para transformarse en el mismo hemicromo con los mismos valores "g" que vimos antes para las cadenas beta de hemoglobina. H. El -

mismo hecho sucede como en las cadenas beta; esto es, la estructura terciaria se relaja hacia la histidina lejana que puede volverse y unirse al Fe, produciendo un compuesto histidina de Fe. Se pueden hacer otros hemicromos bajo condiciones seleccionadas.

¿Que puede hacer un químico teórico con cada uno de los espectros EPR de bajo espin para ordenar y deducir información estructural? Veremos la mecánica cuantica Hamiltoniana para sistemas férricos de alto y bajo espin.

$$H_{a.e.} = g\beta H.S + D(S_z^2 - 1/3 S(S+1)) + E(S_x^2 - S_y^2)$$

$$H_{b.e.} = g\beta H.(S + L) + \lambda(L.S + (\Delta/\lambda)Y_2^0 + (V/\lambda)(Y_2^2 + Y_2^{-2}))$$

Los dos términos  $Y_2^k$  representan simetrías del campo cristal electrostático y son proporcionales a  $z^2 - r^2/3$  y  $x^2 - y^2$ , respectivamente. Los términos H son términos de interacción de Zeeman y no dan información estructural. El término L. S. (el acoplamiento orbital espin) en los Hamiltonianos de bajo espin también no dan ninguna información. Los términos restantes son los que indican la geometría de la estructura. Los coeficientes D y  $\Delta/\lambda$  representan la divergencia o desviación de los ligandos hacia los arreglos octaedral o tetragonal; por ejemplo, los ligandos cercano y lejano convenientemente desiguales a los cuatro ligandos porfirina. Los coeficientes E y  $V/\lambda$  representan la desviación de la simetría inferior tetragonal hacia la rómbica. - Bajo las condiciones de  $E/D=1/3$  ó  $V/\Delta = 2/3$  la simetría ha sido determinada completamente rómbica. Estos coeficientes determinan completamente los tres valores "g" en cualquier caso de espin y es toda la información que se puede extraer de un espectro de EPR de una solución congelada. El método de análisis fue recopilado por Griffith y por Weissbluth.

Si tenemos los análisis de un gran número de compuestos férricos de bajo espin, pueden ser resumidos convenientemente en una gráfica de campo cristal como la figura-18. La abscisa es el campo tetragonal ( $\Delta/\lambda$ ), y  $V/\lambda$  llama da rombicidad como ordenada. Todos estos compuestos, con la excepción de alguno marcado con sustancias exógenas, estan formados con átomos que son endógenos a la hemoglobina- y así representan varias clases de compuestos de bajo espin endógenos. La hemoglobina A fue aislada de células rojas - humanas hemolositos sin el uso de tolueno. Cadenas alfa fueron aisladas y preparadas desde oxihemoglobina por el método de Bucci y Fronticelli modificado por Parkhurst, Gibson- y Geracci. Las cadenas beta fueron obtenidas de la oxihemo- globina H. La oxidación a la forma férrica fue lograda con- ferricianuro en una columna de Biogel P-2 a un pH de 7.

Los compuestos de bajo espin pueden ser formados- usando los siguientes reactivos referidos en la figura; Et- SH, mercaptoetanol; Pyr, piridina; His, histidina;  $N_3$ , azi- da. Las 5 áreas encerradas por las líneas punteadas defi- nen las regiones y parámetros donde pueden entrar los 5 com- puestos diferentes al ser producidos. Los grupos marcados- O y H contienen los compuestos hidróxido y dihistidina, res- pectivamente, y que se vieron anteriormente. El grupo mar- cado P contiene los compuestos mercaptoetanol y otros sulfhi- drilos. El grupo marcado C contiene compuestos que tienen- histidina por un lado y un tioeter de metionina en el otro- lado, por analogía con el citocromo C que es donde se cono- ce que existe ésta estructura. El grupo restante B, contie- ne una histidina por un lado y un ligando desconocido en el otro lado. Este ligando desconocido es el mismo que se en- cuentra en el citocromo b, cualquiera de esos puede ser.

Los hemicromos que entran en este grupo B pueden- ser hechos desde la hemoglobina con un rendimiento del 100%,

igualmente aunque no conozcamos su ligando lejano. La receta es la siguiente: cualquier agente desnaturalizante rompe la unión hidrófobica en las diferentes partes de la estructura terciaria conduciendo a estos compuestos. Muchas moléculas aromáticas solubles en agua satisfacen estos requerimientos. Así, este tipo de hemicromo fue descubierto después del tratamiento con silicilato produciéndose también imidazol.

Se ha recorrido un camino largo en el estudio de la hemoglobina natural. ¿Cual de estos hemicromos puede ser renaturalizado bajo condiciones apropiadas a hemoglobina funcional? Los experimentos han demostrado que los tipos O y H hidróxilo y dihistidina pueden ser renaturalizados mientras los tipos C, B y P parecen tener puntos cruzados que no son renaturalizables. Refiriéndonos otra vez, al modelo de la cadena de mioglobina (fig. 16), se puede ver que de los dos compuestos reversibles, uno como el hidróxido como el ligando lejano no necesariamente cambia la estructura terciaria del todo, y es comprensible porque espontáneamente reversible. El otro, en el que el nitrógeno del imidazol lejano viene para unirse al Fe, requiere de un cambio muy pequeño para hacer posible esto, y también es comprensible porque puede ser reversible. Los otros requieren mucho más de un cambio en la estructura terciaria en el orden que lo requieran los átomos ligando lejanos para que puedan aprovechar al Fe.

Hay varios conceptos teóricos que pueden ser señalados en el diagrama (fig. 18). El primero es el camino que se ha elegido para trazar las constantes teóricas donde la abscisa es una función del total de electrones donados por el Fe, pero quizá no es una función lineal. A la extrema derecha, es la mayor distancia que se desvía de una geometría cúbica. La ordenada es la razón de dos parámetros -

simétricos o un número de significancia geométrica. De este modo, los compuestos situados sobre la misma línea horizontal pueden tener la misma geometría, mientras los compuestos situados sobre la misma línea vertical pueden tener la misma densidad de electrones en el átomo de Fe. Esta densidad de electrones es determinada por una propiedad de los seis átomos ligando, la cual puede ser llamada vagamente electronegatividad, aunque el uso puede ser impropio.

Es interesante notar que el centro de gravedad de los cuatro compuestos C, B, H y O situados más o menos en la misma línea horizontal comparten una cosa en común; todos tienen un átomo de nitrógeno de la histidina cercana que está presente en la hemeproteína natural y como que todos aquellos compuestos están en la misma geometría. Además, el ligando determina casi completamente la geometría del compuesto. Cambiando el sexto ligando sólo cambia la densidad electrónica y no destruye o distorsiona la geometría. En el caso de los compuestos con mercaptida si se destruye la geometría. Esto es, la mercaptida no impone la misma geometría en la heme, como lo hace el átomo de nitrógeno de la histidina cercana. El imidazol y la azida aunque parezcan muy diferentes para un químico inorgánico, se comportan de una forma similar ante una porfirina de Fe. Todo lo que se sabe de estos compuestos es que hay una doble unión con el nitrógeno y de la geometría de éste ligando en particular hay muy pocas observaciones. Aquí la geometría está determinada por los otros ligandos.

Seguiremos con compuestos de hemoglobina A, que tienen proporciones iguales de cadenas alfa y beta, ó cadenas alfa, o cadenas beta, al final con compuestos indistinguibles en estos grupos. Esto es particularmente notable en el grupo hidróxido, donde se han hecho los estudios más extensos. Posiblemente no se pueda decir desde estos com--



puestos de bajo espín, cuales de estas cadenas están presentes o si éstas fueron una mezcla de las dos, y es justo - apuntar que el Fe en compuestos férricos de bajo espín casi no interacciona con la segunda esfera de coordinación. Interaccionando sólo con la primera esfera de coordinación que es idéntica en todos estos compuestos que pertenecen a un grupo particular. La conducta en las propiedades más importantes como potencial de óxido-reducción y cinética de reacción son determinados realmente por los efectos combinados de las esferas primaria y secundaria de coordinación.

El significado de las líneas que indican la simetría "rómica pura" requiere de una explicación. Si se tiene más o menos una geometría octaédrica de los ligandos semejante a la estructura I figura 19, donde el átomo de Fe - está coordinado por cuatro "As" y por dos "Bs", hay una clara y perfecta simetría tetragonal como se observa usualmente en el caso de compuestos férricos de alto espín. Se puede dibujar un cuadro conectando las "As" y decir, "eso es - la heme" porque estos cuatro átomos estaban en la molécula original, que era esencialmente equivalente. ¿En los compuestos de bajo espín cercanos a la línea que indica campo rómico total (estructura II) donde las "As" son diferentes de las "Bs" y estas de las "Cs", donde está el cuadrado?

Compararemos los compuestos de bajo espín de la - hemoglobina con los de otras proteínas heme. La figura 20- es una gráfica de campo cristal para algunas proteínas heme donde los contornos son los mismos que en la gráfica de la hemoglobina. ¿Que otros compuestos de bajo espín de proteínas heme son semejantes a los hemicromos de hemoglobina? Algunos compuestos que son hemicromos diferentes como cianuro de hemoglobina, de citocromo c, y de mioglobina muestran como el ión cianuro es un ligando diferente a cualquier otro ligando endógeno. Todos los citocromos P-450 que son conocidos por ser compuestos heme mercaptida, caen en la misma-

región de los compuestos heme mercaptida de hemoglobina. - Algunos compuestos hidróxido de mioglobina dan oportunidad para indicar los efectos de interacción de la esfera de coordinación exterior, usando la frase o expresión indefinida, que se tiene sobre estos compuestos. La mioglobina a pH de 10.1 y 12.8 lo manifiesta, y también hay puntos intermedios. El campo cristal lleva a través de los puntos conocidos al aumento de pH en casi tres unidades logarítmicas.

Se han estudiado dos citocromos naturales, los citocromos  $b_2$  y  $b_5$  que están en la región marcada B. El citocromo c está en la región C y tiene histidina y metionina - como dos ligandos no porfirínicos del Fe.

La azida catalasa, por ejemplo, está donde la azida hemoglobina; con la misma geometría, y densidad electrónica. La estructura es probablemente la misma. Nadie sabe cual es el ligando cercano a la heme de Fe que está en la catalasa, pero podemos especular que es un imidazol, exactamente como en la hemoglobina.

En informes anteriores, se especula con la configuración de la heme a. Dos compuestos de heme  $a_3$  se han observado en la mitad de citocromo c oxidasa reducida. Uno es un hidróxido normal, y cuando se adiciona azida, es un azida  $a_3$  normal. Esto significa que bajo estas condiciones, la heme  $a_3$  se comporta como una heme aislada normal, y no tiene una configuración peculiar en el citocromo c oxidasa bajo estas condiciones.

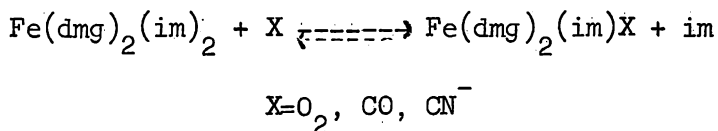
La cuestión ha llamado la atención por la gran diferencia en reactividad entre varias proteínas heme: ¿qué diferencia estructural es responsable de esto? He aquí tres ejemplos de citocromos (a, b, c) que tienen la misma esfera de coordinación interior como ciertos compuestos de hemaglo

bina. Así las grandes diferencias en las reacciones de los citocromos son causadas por las diferencias en la estructura más externa que la esfera de coordinación interior. Claramente, los citocromos y la hemoglobina difieren mucho como un resultado del alejamiento del átomo de Fe.

Hay algunas excepciones que no se ajustan a este diagrama (fig. 18), en general son las peroxidásas. Los compuestos de bajo espín de peroxidásas tienen diferentes densidades electrónicas y se puede decir que no tienen el mismo ligando cercano como las proteínas que aparecen en el diagrama.

Se han estudiado otros sistemas y se han propuesto otros modelos de las estructuras de proteínas heme, por ejemplo: un modelo ingenioso ha sido el de preparar un compuesto donde son incertados grupos imidazol en poliestireno y este reacciona con un ester heme. La estructura resultante se muestra en la figura 21. Esta especie absorbe oxígeno molecular reversiblemente igual que en presencia de agua, así no sólo imita el medio sino también las propiedades de la proteína heme.

Otro modelo es el complejo  $\text{Fe}(\text{dmg})_2(\text{im})_2$  donde: -dmg-dimetilgloxima, im=imidazol, presenta una conducta similar a la de las proteínas heme, bajo las siguientes condiciones de equilibrio en solución:



Puede ser absorbida una segunda molécula de X, aunque cualquiera de las especies no contenga oxígeno se han aislado estequiométricamente en estado sólido. La simi

litud con la heme por la relación en estructura entre el sistema porfirina de Fe y la unidad planar  $\text{Fe}(\text{dmg})_2$  se explica y se muestra en la figura 22. Hay un marcado paralelismo en las propiedades físicas de las dos especies cuando se adicionan los mismos ligandos axiales que apoyan esta proposición. Se han observado reacciones similares con 1,2-ciclohexanodiona dioxima (nioxima) en lugar del dimetilgloxima.

El modelo que más se asemeja al sistema heme como mínimo hasta donde la estructura molecular es considerada, es aquel de tetrasulfonato de ftalocianina  $\text{Fe}(\text{II})$  que absorbe oxígeno molecular en solución y en estado sólido y se muestra en la figura 23.

Otros modelos propuestos que han ayudado a deducir la estructura de las proteínas heme, se basan en estudios realizados sobre metaloporfirinas. Hay un creciente interés en estos compuestos complejos metaloporfirinas entre los químicos por su naturaleza única en química de coordinación, tanto del ligando porfirina como del ión metálico de estas substancias. Se ha demostrado que el ligando porfirina actúa como ligando bi, tri o hexadentado y como usualmente se encuentra en la heme, tetradentado. Además, se ha observado que el ión metálico posee las coordinaciones 4, 5, 6 y 8.

Las porfirinas semejantes a otros macrociclos tienen un centro de tamaño fijo, que puede ser alterado por el recogimiento de el macrociclo porfirina, limitado por un rango pequeño de variación. El rango de variación está entre  $2.098$  y  $1.929 \text{ \AA}$ . Es fácil ver que en ciertos complejos el ión metálico es incapaz de fijarse en este hueco, por lo tanto, se coloca fuera del plano de los nitrógenos del pirolo. Este fenómeno se presenta en el sistema iónico ferro

so-férrico. Tomando la diferencia entre el radio iónico empírico de las porfirinas ferrosas y férricas como  $0.12 \text{ \AA}$ , para un número de coordinación de 6 para las porfirinas ferrosas de alto espín y  $2.19 \text{ \AA}$  para la longitud de unión compleja con los átomos de nitrógeno. Tomando también un radio del centro como de  $2.01 \text{ \AA}$ , todo esto produce un desplazamiento calculado fuera del plano de  $0.87 \text{ \AA}$  para el ion ferroso. Aunque estos valores son sobre estimados, la predicción de que el ion férrico se sitúa en el plano y el ion ferroso fuera del plano es válida. En la hemoglobina, en su forma oxigenada, el átomo de Fe se coloca en el plano aproximadamente, mientras que en la forma deoxigenada, el metal se coloca fuera del plano.

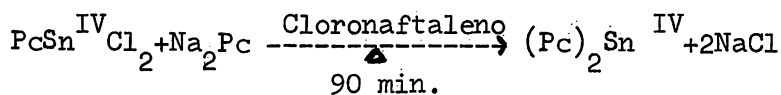
Es muy importante este pequeño movimiento (de menos de  $1 \text{ \AA}$ ) del Fe en relación al plano de la porfirina en la hemoglobina para conducir  $O_2$ , cuando va de la forma deoxigenada penta-coordinada de alto espín a la forma oxigenada hexa-coordinada de bajo espín moviendo una histidina próxima al plano.

Para proponer los modelos en que el ion metálico está fuera del plano del anillo porfirina, se han sintetizado compuestos con otros metales, tales como el Zr, Hf, Sn, U, que parece que no tienen nada que ver con el tema que nos ocupa; pero que sin embargo, las estructuras que presentan junto con el anillo porfirina tienen mucha semejanza con los compuestos complejos de proteínas heme, en donde el Fe es el ion metálico principal. Antes de seguir, explicaremos la terminología usada para describir los diferentes tipos de compuestos lo de mono y dinuclear se refiere a el número de anillos porfirina o tipo porfirina presentes en una unidad de la cadena del compuesto; mono, di y trimetálico al número de iones metálicos presentes en el anillo o asociados con él.

Se han propuesto dos modelos para complejos monometálicos, mononucleares, complejos "sentado sobre" (sitting atop) de Fleischer como intermediario en el mecanismo de inserción del metal (Fig. 24). En esta configuración el ion metálico deforma la porfirina para facilitar su incorporación.

Dos ejemplos de este tipo de compuestos son el Zr (IV) en la figura 26, y el de Hf(IV) que son formas estables de complejos porfirinas monometálicos mononucleares - fuera del plano y que tienen dos ligandos bidentados acetato. Un análisis cristalográfico de difracción de rayos X - ha confirmado que el átomo de metal está fuera del plano de la porfirina y sobre el eje normal  $S_2$  a el plano de la porfirina con los dos ligandos acetato sobre el mismo lado del anillo porfirina, de acuerdo con los modelos propuestos de Fleischer y el de Hoard's "pirámide cuadrada" (fig. 25).

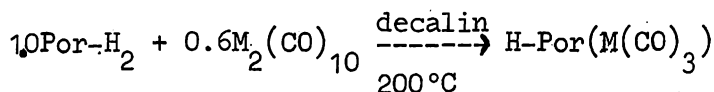
Otro tipo de complejo monometálico - dinuclear y octacoordinado fuera del plano, es el "sandwich", compuesto de ftalocianina Sn(IV) (fig. 27). Nuevamente, un análisis de rayos X mostró tener el átomo de Sn fuera de los dos planos de las porfirinas y sobre el eje normal  $S_2$  a el plano de las mismas, de acuerdo también con el modelo propuesto.



Pc=Ftalocianina

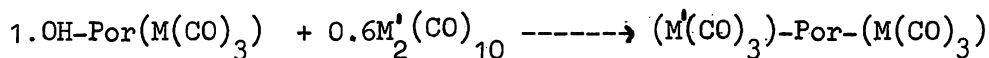
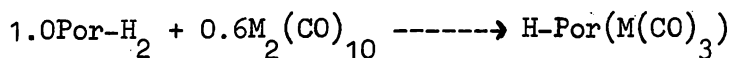
Otros ejemplos de este tipo de compuestos se han reportado, como el bis (ftalocianina) U(IV); así como una serie de complejos lantanidos de bis (ftalocianina) La, Ce, Nd, Eu, Er, Yb.

Recientemente, se han reportado un nuevo tipo de complejos fuera del plano, monometálicos mononucleares y se preparan de la siguiente forma:

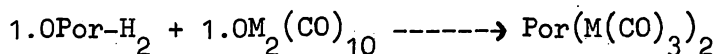


donde  $\text{M}=\text{Re}$ ,  $\text{Tc}$  y  $\text{Por}=\text{H-MP}$ ,  $\text{H-TPP}$ . El átomo de  $\text{Re}$  se sitúa fuera del plano de la porfirina en el eje normal  $\text{S}_2$  (fig.28). El complejo  $\text{H-Por}(\text{Tc}(\text{CO})_3)$  también ha sido preparado por este procedimiento y tiene una estructura similar.

La segunda clase de metaloporfirinas fuera del plano, que también presentan varios tipos de estructura, son los complejos dimetálicos mononucleares. Hambright ha propuesto un modelo para este complejo (fig. 29) en donde los átomos del metal se colocan por arriba y abajo del plano de la porfirina y sobre el eje normal  $\text{S}_2$ . Tuitsui y compañeros han sintetizado el complejo dimetálico mononuclear del  $\text{Re}$  y  $\text{Tc}$ , como también el complejo heterodimetálico  $(\text{Tc}(\text{CO})_3)\text{-Por}(\text{Re}(\text{CO})_3)$  (fig. 30).



donde  $\text{M}'=\text{M}=\text{Re}$ ,  $\text{Tc}$  y



Análisis de rayos X han mostrado que los átomos del metal se colocan arriba y abajo del plano de la porfirina de acuerdo con el modelo propuesto por Hambright, pero fuera del eje normal  $\text{S}_2$  a el plano de la porfirina (fig 30). La distancia entre los átomos de metal es de  $3.1 \text{ \AA}$  aproximada

mente: larga para una unión formal, pero corta para permitir alguna interacción del metal.

Yoshida y colaboradores usaron el método del carbonilo para preparar un complejo similar con dos átomos de rodio (Rh) por porfirina (fig. 31). Comprobándose el modelo por análisis de rayos X, Lapper y colaboradores reportaron un análisis estructural del que es propuesto como intermedio, o el primer producto formado en esta reacción, una sal semejante al complejo dimetálico mononuclear  $(OEP-H_4) - 2-(Cis-(RhCl_2(CO)_2))$  (fig. 32), este complejo se reordena en solución para producir el complejo de la figura 31 con la liberación de HCl.

También se demostró que el complejo de carbonilo metálico prefiere coordinarse con átomos de nitrógeno adyacentes (fig. 31), que con átomos de nitrógeno alternados como fuera propuesto en las figuras 24 y 29, causando que los átomos del metal se desvien del eje normal  $S_2$  del plano de la porfirina. Se debe señalar, que para el caso del átomo de Re la coordinación es octaédrica, distorsionando drásticamente el anillo porfirina. El valor óptimo para el diámetro del centro de un complejo metaloporfirina sin distorsionar se ha estimado en  $4.02 \text{ \AA}$ . Los diámetros para los complejos  $u-(Por)-(Re(CO)_3)_2$  y  $u-(Por)-(Tc(CO)_3)_2$  son de  $4.52 \text{ \AA}$  para el primero y de  $3.65 \text{ \AA}$  para el segundo, que son inusualmente largo y corto. El diámetro largo es causado por la gran desviación de los anillos pirroles del plano inferior del macrociclo (fruncido, recogido, plegado del anillo). El diámetro corto presenta aparentemente como puede ser alcanzada la coordinación octaédrica por el átomo metálico. Es importante señalar que las distancias entre los centros metálicos son normales y aproximadamente las mismas y también que hay muchos complejos porfirina en los que el átomo de metal es coordinado por los cuatro nitrógenos de -



los pirroles y en los complejos de Re, Tc, y Rh la coordinación es por 2 ó 3 átomos de nitrógeno, esta coordinación es predicha por la regla de los 18 electrones con el metal en un estado de oxidación bajo (+1,  $d^6$ ,  $d^8$ ). Medidas de susceptibilidad magnética para el complejo de Re, conducen a suponer que el metal se encuentra en  $d^0$  diamagnético. Además, - las porfirinas y otros ligandos insaturados (ej: biperidilo) se distinguen por su sistema  $\pi$  deslocalizado. El traslape entre orbitales de electrones  $\pi$  deslocalizados sobre la porfirina y los orbitales del metal de simetría propia, producen una fuerza moderadamente alta de campo ligando. También, por aceptación posterior de la densidad electrónica de los complejos metálicos, la porfirina facilita la reducción del complejo metálico a un estado de oxidación bajo. Sin embargo, no todos los estados de oxidación poco usuales de las porfirinas son fácilmente explicables. Por ejemplo; la porfirina de planta más estable, tiene al metal en un estado de oxidación de 2+ y no en 1+. No se ha propuesto ninguna explicación.

Una tercera clase de complejos fuera del plano - son los trimetálicos dinucleares, un ejemplo es la preparación de un complejo de mercurio que presenta la posibilidad de formar polimeros agrupados de metales de transición (fig. 34) que contiene uniones metal-metal. La figura 33 muestra la estructura más probable para el complejo típicamente iónico;  $Ag^+$ ,  $Hg^+$ , etc., mientras la figura 34 muestra la estructura más probable para los complejos de metal de transición unidos más covalentemente.

Se ha propuesto que en un estado de oxidación bajo del metal es necesario un requerimiento para la formación de una unión metal-metal. Este hecho considerado con la presencia de anillos con una gran deslocalización de electrones, *vida supra*, debe hacer a las metaloporfirinas -

polinucleares fuera del plano buenas conductoras de electrones.

Ahora veremos de que forma afecta y como ayuda el cambio de metal en las proteínas heme para la interpretación de su estructura; Muchas proteínas son incoloras, pero algunas tienen una pequeña molécula que las ataca y hace que sean rojas o cafés dándoles habilidad para hacer una pasmosa variedad de química especial con moléculas pequeñas como el oxígeno y el peróxido de hidrógeno, o sirven como receptores o senderos de electrones. Esta molécula coloreada es la heme. La estructura del anillo sin el metal es llamada protoporfirina IX (PPIX) y es púrpura. El color rojo en heme ferrosa surge desde una banda de absorción a 550 nm en la región visible. Un pico aproximadamente a 410 nm en el UV cercano llamado la banda de Soret, tiene aproximadamente 10 veces el coeficiente de extinción de la banda de la región visible y es característico de macrociclos porfirina. Las bandas de Soret y la del visible cambian con el cambio del metal estado de oxidación o ligando del metal central.

Anteriormente, se han descrito estudios sobre la estructura de proteínas heme como la hemoglobina y mioglobina principalmente y también un poco sobre los citocromos, - si este último lo consideramos como el prototipo de la única clase de proteínas heme en que el anillo está unido a la cadena de la proteína a través de dos fuertes uniones covalentes los grupos vinilo (fig. 35) son reducidos por grupos sulfhidrilo de dos cisteínas de cadenas laterales separadas sobre la cadena de la proteína para formar una unión tioeter y un grupo metilo. Esta unión no se rompe a pH bajo, por lo que cambios en la heme demandan una química diferente que con la hemoglobina. El citocromo c natural a pH neutro tiene un grupo imidazol unido al Fe como en la hemo-

globina; sin embargo, la posición del sexto ligando del Fe es ocupada por el azufre de una metionina de una cadena lateral. En condiciones fuertemente básicas, la metionina es reemplazada por coordinación de un grupo amino de una lisina adyacente de una cadena lateral. Con el incremento de un medio ácido, ambos ligandos son reemplazados por agua. Los aniones o pequeñas moléculas semejantes al  $O_2$ ,  $NO$ , y  $CO$  no se unen al citocromo c a un pH neutro. Mientras, los aniones en estado oxidado como el  $CN^-$ , si se unen al Fe. (El cianuro es venenoso para la cadena de transferencia de electrones de los citocromos).

Los estudios cristalográficos de rayos X y una gran abundancia de estudios químicos mostraron que el citocromo c oxidado y reducido tiene diferente conformación proteínica. En términos simples, una grieta es abierta en la forma oxidada y se cierra en la forma reducida.

Otras proteínas heme menos estudiadas son las peroxidasas y catalasas, las primeras catalizan la descomposición del destructivo peróxido de hidrógeno que es el producto de algunas reacciones en la célula. Las peroxidasas usan el  $H_2O_2$  para oxidar moléculas orgánicas (ej: fenoles). Las catalasas descomponen el  $H_2O$  y el  $O_2$ , fácilmente se obtienen de cualquier heme en solución ácida, lo mismo que las peroxidasas del rábano. Peroxidasas de leucocitos y de leche no tienen heme ácidas lábiles.

La preparación cuidadosa de hemoglobina reconstituida que fue indistinguible de su fuente original, alentó grandemente el desarrollo del cambio de metal en proteínas-heme. La producción de hemoglobina a partir de hemoglobina no fue un ejercicio trivial, sólo poniendo gran atención a las propiedades de preparación de apo-proteínas, fue regenerada satisfactoriamente la hemoglobina.

La técnica general y una descripción histórica - del desarrollo de cambios de metal en proteínas son expuestos en seguida: cambios en la heme involucra adición de proteína heme acuosa en medio ácido con acetona o metil-etil--cetona. Para lo anterior, la heme se disuelve en acetona y la globina precipita como un sólido blanco y puede ser centrifugado y redisuelta en agua. Con la segunda, metil-etil cetona que es parcialmente miscible con agua; la heme está en la capa superior de cetona y la globina en la capa inferior de agua.

La adición de la metaloporfirina deseada hacia - dentro de la globina es en general un proceso totalmente espontáneo, que puede ser monitoreado por el cambio de la banda de Soret de la metaloporfirina cuando se une a la histidina de la proteína. La metaloporfirina es disuelta en una base diluyente apropiada y se adiciona a la solución regulada de globina.

El desarrollo de hemoglobina de cobalto es históricamente interesante. Aparentemente los primeros en introducir  $\text{Co(III)}$ -protoporfirina IX en apohemoglobina fueron - Thiele, Behlke y Scheler en 1963. Sin embargo, fueron incapaces de reducir el producto al estado de  $\text{Co(II)}$  y desde - cualquiera de los espectros UV/visible, parece que a los -- productos les falta la fuerte unión asociada con la proteína heme pura. En 1969, Hoffman y Petering, ignorantes totalmente de estos trabajos, que no eran atractivos, prepararon hemoglobina  $\text{Co(II)}$  y observaron que cualquier preparación unía oxígeno reversiblemente. Además, en algunas de - las preparaciones se comportaba la hemoglobina  $\text{Co(II)}$  cooperativamente. Estas observaciones fomentaron trabajos de - Yonetani y colaboradores y de Dickinson y Chien explorando en detalle la estereoquímica y estructura electrónica a través de resonancia paramagnética de electrón en cristal y de varios estudios químicos.

El manganeso se ha usado para reemplazar al Fe en la hemoglobina y mioglobina aunque sus derivados se oxidan rápidamente a el estado de Mn (III) y no unen oxígeno reversiblemente. Aunque algunos trabajos anteriores reportaron adición de Mn a la hemoglobina y mioglobina sus derivados - han sido investigados muy recientemente por estudios extensos de resonancia magnética de subunidades interdependientes e interaccionantes, y por cristalografía de rayos X que revelan la identidad de conformación de las hemoglobinas de - Mn(III) y Fe(III).

Metaloporfirinas de Cu, Ag, Ni, Cr, Re, Ru se han adicionado a la hemoglobina y mioglobina. El Cu y Ag muestran estructuras hiperfinas en el espectro de resonancia de espin electrón, el Ni está en el estado de alto espin y el Cr muestra diferente espectro que el de los compuestos modelo, empleando una interacción poco usual con la proteína en ambos casos.

También entre las proteínas heme que pueden ser - preparadas por tratamiento de ácido-cetona están peroxidasas de citocromo c y de rábano.

La síntesis de reemplazo de metal en citocromo c es un poco más complicada que la técnica de cambio de metaloporfirinas debido a las uniones covalentes de los lados - de la porfirina del citocromo c con la cadena de la proteína. Robinson y Kamen descubrieron que cuando el citocromo c es disuelto en fluoruro de hidrógeno anhidro, la única modificación química es el cambio del ion Fe del anillo porfirina. El producto porfirina citocromo c puede reaccionar - con una variedad de metales para producir el cambio del metal en el citocromo c, sin embargo, la adición del ion metálico generalmente requiere de disolventes (cloroformo, ácido acético glacial, dimetilformamida) y condiciones (100°C o-

más por extensos períodos de altas concentraciones de ion - metálico) que generalmente precipitan proteína irreversiblemente o sujetan el ataque del ion metálico. Lógicamente, - las condiciones necesarias son desarrolladas para cada caso específico.

La adición de Co a la porfirina citocromo c ha sido satisfactoria y el producto investigado con detalle. De la reacción entre ácido acético diluido, NaCl acuoso,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y acetato de Co se descubrieron dos productos. Uno de los productos sufre cambio iónico por electroforesis, y parece que tiene los mismos ligandos metionina e histidina - que el citocromo c de Fe natural. Esta forma conserva el - 40% de la velocidad de reacción con la enzima oxidasa, pero no es reducida enzimáticamente por la reductasa. El citocromo c de Co muestra un cambio de ligando completamente diferente con el pH, comparado con el citocromo c de Fe; a - pH de 12.9 sólo la histidina está ligada, a pH de 1, sólo - la metionina. Es curioso, como en estudios de modelos de - Fe no se puede experimentar con los dos ligandos histidina- y metionina a la vez, pero con el compuesto modelo de Co se forma rápidamente el complejo con la proteína.

El caso favorable de la adición del metal a porfi- rinas citocromo c es el del Cu(II) donde la reacción se pro- duce durante la noche con un exceso bajo de Cu a 4°C. Pa- ra la inserción de Ag(I), Mn(II), y Ni(II) se están desarro- llando otros métodos actualmente en investigación.

Una área de investigación de las proteínas heme - es como compuestos de coordinación con ligandos extraordina- riamente complejos, pero las propiedades de estos complejos no pueden ser duplicadas por otros sistemas. Sin embargo, - el cambio de metal en proteínas heme contribuye al entendi- miento de la estructura en las mismas, un ejemplo de esto -

es la claridad que abre sobre la localización de los electrones en la oximioglobina. Un examen directo de la densidad electrónica por cristalografía de rayos X parece estorbar la densidad de electrones en el anillo porfirina y por la rápida autooxidación de la mioglobina cristalina a el estado férrico. La oximioglobina es diamagnética y no es sensible a estudios de resonancia de espín electrón, pero la oximioglobina de Co es paramagnética y se ha estudiado por resonancia de espín electrón en cristal para obtener in formación estereoquímica (O-O eje paralelo al plano de la heme) y densidad electrónica con varios núcleos. En ausencia de una respuesta directa para el caso del Fe, es muy satisfactorio saber que esto acontece en el otro caso conocido de la oxigenación reversible a un rango de temperatura. Similarmente se puede elaborar la estructura del complejo peroxidasa de rábano de Mn-hidroperóxido o la relación de baja cooperatividad del Co con la hemoglobina de Fe expresado por la corta distancia de la unión metal-nitrógeno de histidina en el modelo. El estudio termodinámico de la unión de oxígeno en la mioglobina de Co es importante en comparación con los compuestos modelo que no existen para el Fe.

Los resultados descritos del cambio del metal en proteínas heme se resumen en la tabla II. Es claro que hay muchas más posibilidades y desafíos en la química de cambio de metal en las proteínas heme.

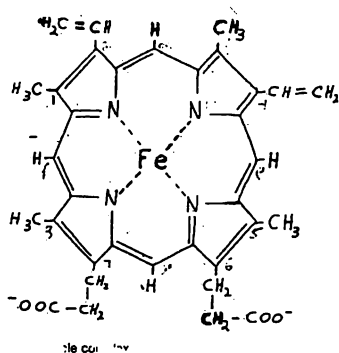


Figura 1. Complejo tetrapirrol de hemoglobina.

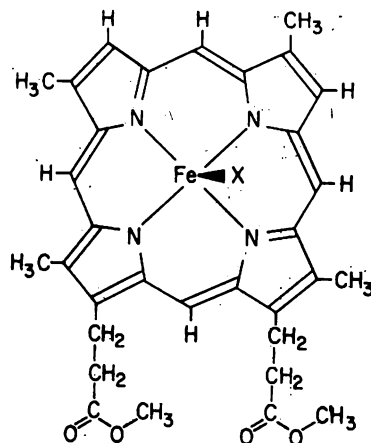


Figura 2. Deuterioporfirina IX - dimetil ester Fe(III) (deuterohemina dimetil ester).

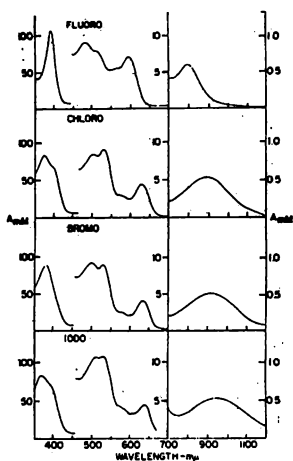


Figura 3. Espectro de absorción de los derivados de deuterioporfirina IX dimetil ester Fe(III) en cloroformo; los ligandos corresponden a "X" de la figura 2.

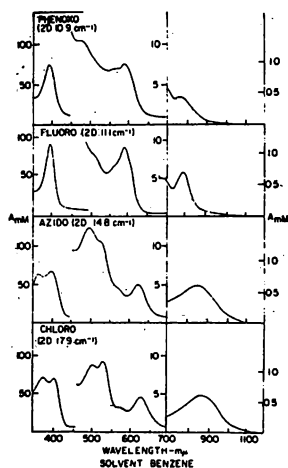


Figura 4. Espectro de absorción de los derivados de deuterioporfirina IX dimetil ester Fe(III) en benceno. Los valores 2D se refieren al desdoblamiento del campo magnético-cero. Los ligandos corresponden a "X" de la figura 2.



TABLA I. Propiedades Espectroscópicas de Compuestos Deuteroporfirina IX Dimetil Ester Fe(III)

Ligando máx.	Banda IR	E	2D
	m	Mm/Seg	Cm
F <sup>-</sup>	800	0.59	11.1 <sup>-</sup>
Cl <sup>-</sup>	910	0.91	17.9
Br <sup>-</sup>	934	1.12	23.6
I <sup>-</sup>	958	1.30	33.0
CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup>	761	0.54	9.3
φO <sup>-</sup>	769		10.9
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	836	0.6	13.8
N <sub>3</sub> <sup>-</sup>	868	0.7	14.8

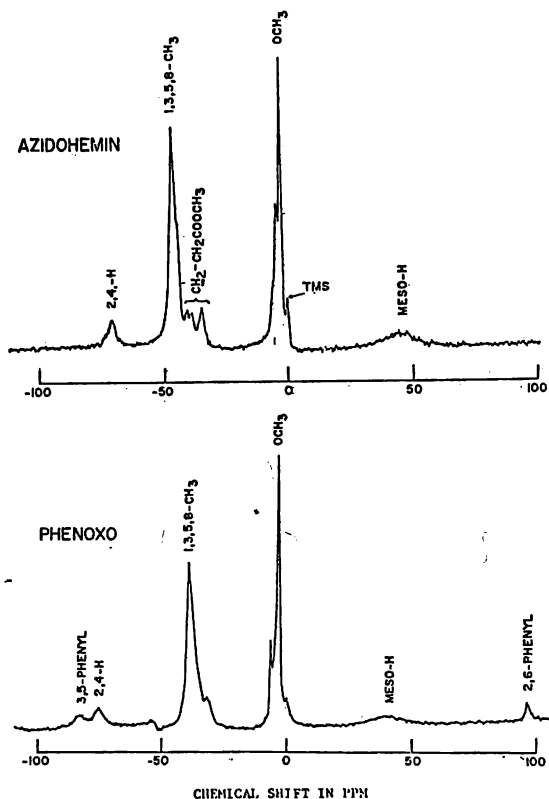


Figura 5. Espectro de resonancia magnética de protón - a 100 MHz de los derivados azida (arriba) y fenoxo (abajo) de deuteroporfirina IX dimetil ester Fe(III) en  $\text{CDCl}_3$  a 35° C.

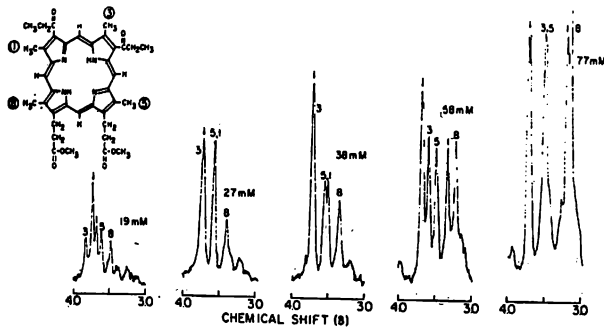


Figura 6. Espectro de resonancia magnética de protón a 60 MHz del 2,4-dipropionil-deuteroporfirina IX dimetil ester a diferentes concentraciones en  $\text{CDCl}_3$  a  $35^\circ\text{C}$ .

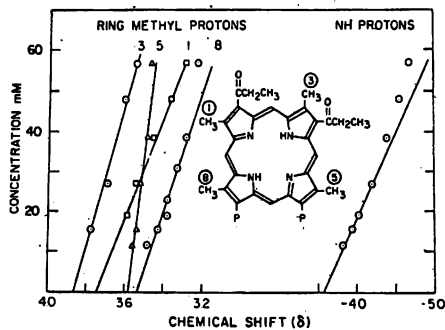


Figura 7. Gráfica de cambios químicos contra concentración para protones de los metilos del anillo y de NH desde el espectro de resonancia magnética de protón de 2,4--dipropionil-deuteroporfirina IX dimetil ester con  $\text{CDCl}_3$  a  $35^\circ\text{C}$ .

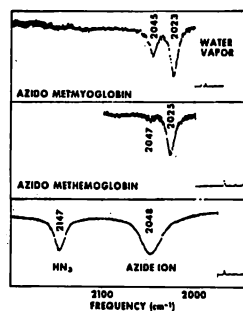


Figura 8. Espectro de diferencia IR. Arriba: de azidametmioglobina vs. -metmioglobina. 0.2M. Intermedio: de -azidamethemoglobina vs. albúmina de plasma bovina. 0.1M. Abajo: de azida de sodio en solución reguladora de citrato. 0.5M vs. solución reguladora de citrato.

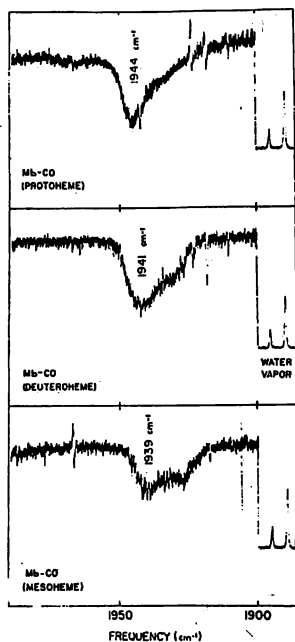


Figura 9. Espectro de diferencia IR. de carbonilo de espermatozoide de ballena de mioglobina reconstituida de diferentes hemes vs. metmioglobina en solución reguladora de fosfato. Arriba: protoheme. Intermedio: deuteroheme. Abajo: mesoheme.

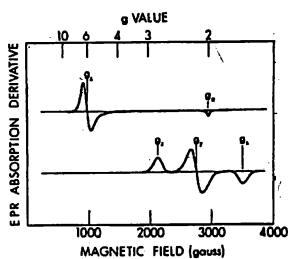


Figura 11. Banda-X típica del espectro de resonancia paramagnética de electrón de alto espín (arriba) y bajo espín (abajo) de compuestos heme férricos analizados en solución con gelada.

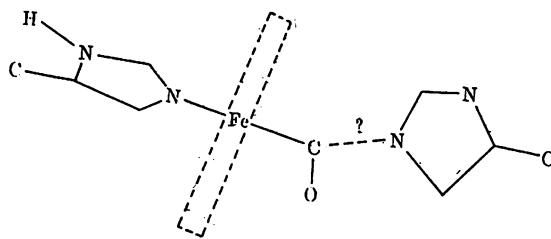


Figura 10. Representación esquemática de la unión del CO con mioglobinas y hemoglobinas.

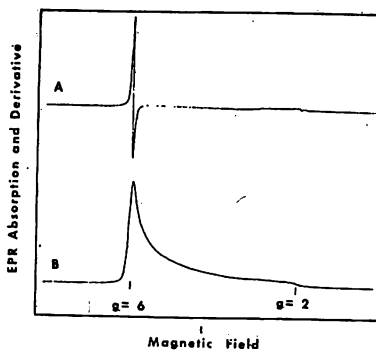


Figura 12. Espectro de resonancia paramagnética de electrón de una solución de cloruro de hemina en N,N-dimetil-formamida.

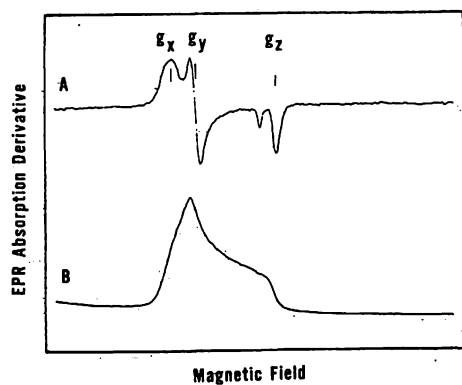


Figura 13. Espectro de resonancia paramagnética de electrón de cloruro de hemina al cual se adicionó mercaptoetanol.

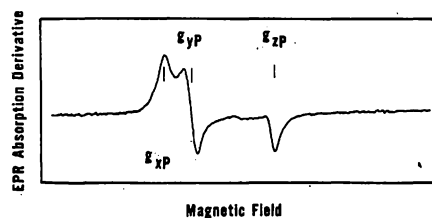


Figura 14. Espectro de resonancia paramagnética de electrón de mioglobina al cual se adicionó mercaptoetanol.

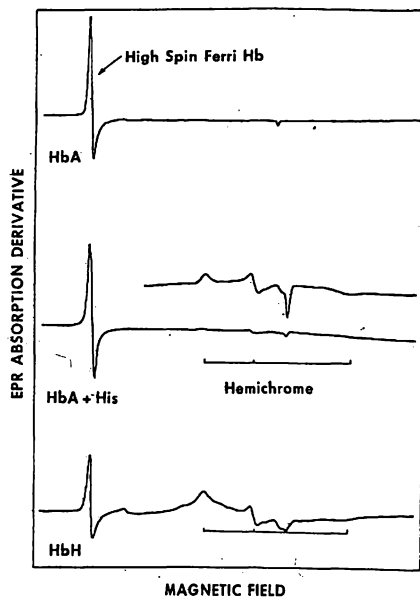


Figura 15. Espectro de resonancia paramagnética de electrón de hemoglobina A - férrica de alto espin (arriba) y el mismo ejemplo más histidina (intermedio) y más hemoglobina H (abajo).

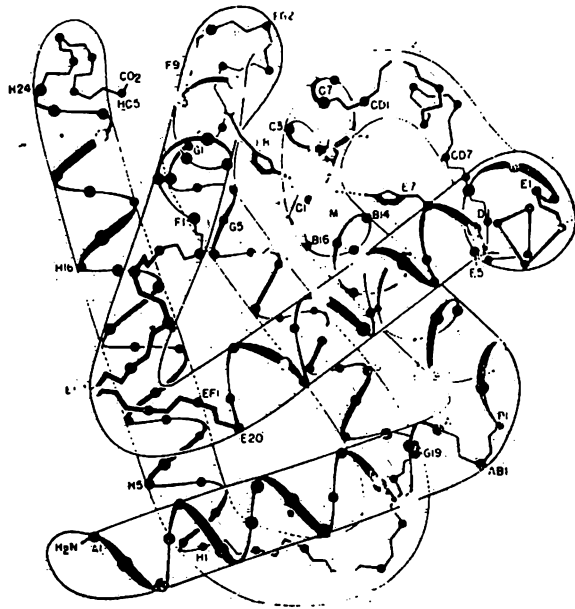


Figura 16. Diagrama de carbono- $^{13}$  de la molécula de mioglobina obtenida desde un análisis de  $2\text{ \AA}$

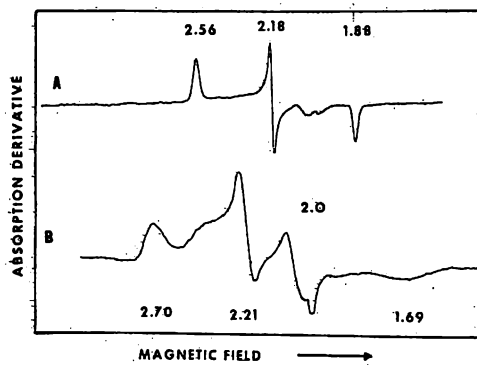


Figura 17. Espectro de resonancia paramagnética de electrón de formas de bajo espín aisladas de cadenas alfa férricas de hemoglobina A.

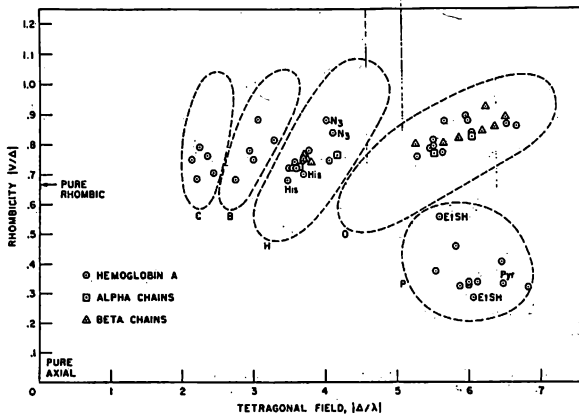


Figura 18. Parámetros de campo cristal para compuestos de bajo espín de hemoglobina A y sus cadenas constituyentes aisladas.

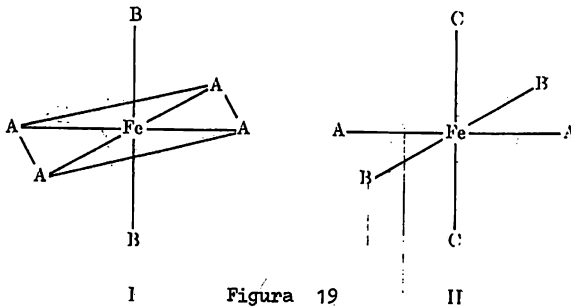


Figura 19

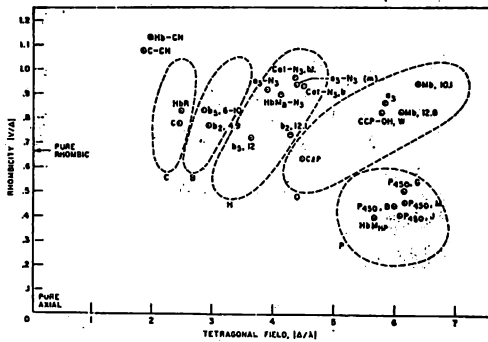


Figura 20. Parámetros de campo cristal para formas férricas de bajo espín de varias proteínas heme.

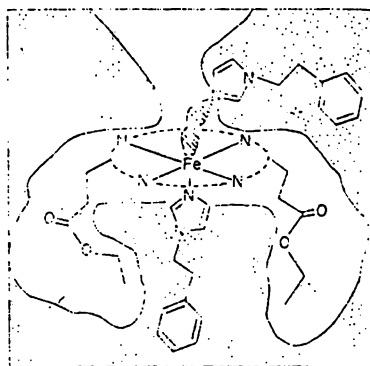


Figura 21. Modelo sintético de un sistema heme que usó como matriz al-poliestireno.

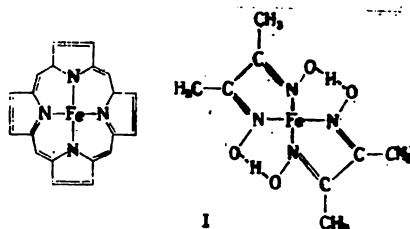


Figura 22

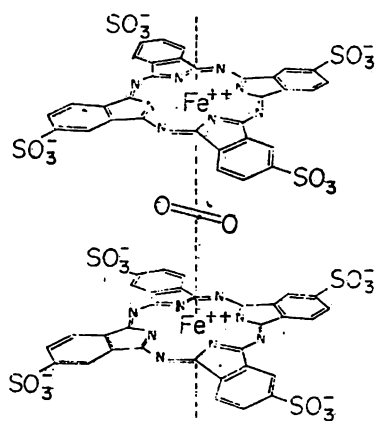


Figura 23. Estructura propuesta del tetrasulfonato ftalocianina Fe(II) del aducto de dioxígeno dimérico.

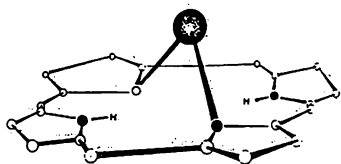


Figura 24. Complejo "sentado sobre" - de Fleischer's

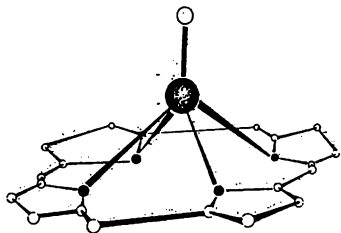


Figura 25. Complejo pirámide cuadrada de Hoards

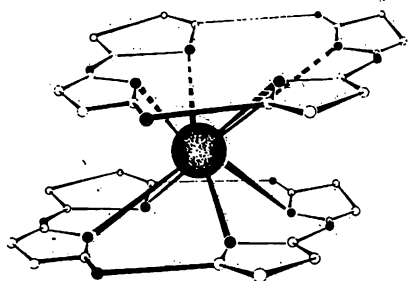


Figura 27. Estructura de bisftalocianina de Sn(IV) y U(IV)

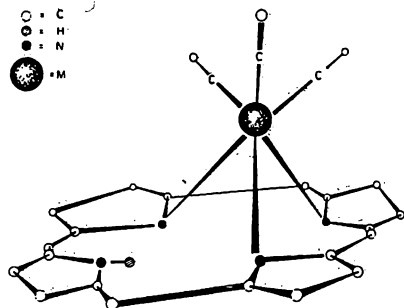


Figura 28. Estructura que muestra la esfera de coordinación alrededor de los iones Re y Tc

S<sub>2</sub> AXIS

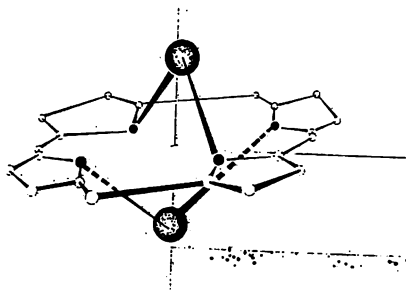


Figura 29. Modelo de Hambricht's para los complejos porfirina dimetálicos mononucleares.

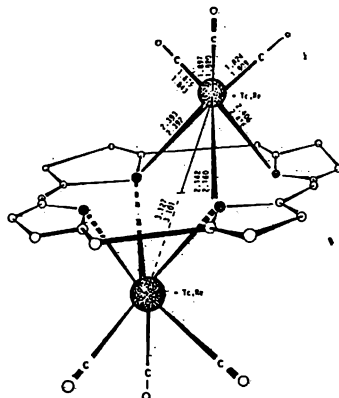


Figura 30. Esfera de coordinación que muestra la distancia de unión entre el Re y el Tc de bis(tricarbonil)(meso-tetrafenilporfinato)M(I)

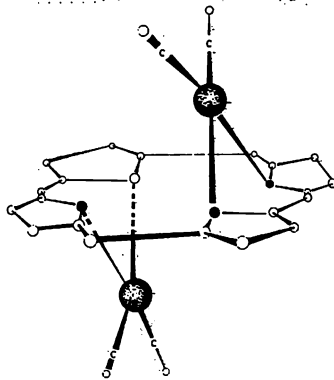


Figura 31. Estructura del  $(\text{Rh}(\text{CO})_2)\text{OEP}$



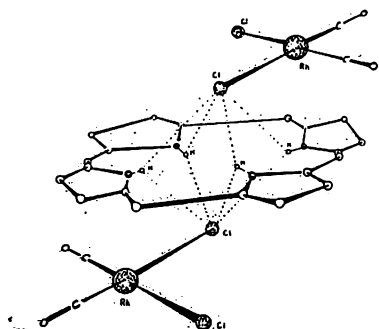


Figura 32. Estructura de la sal porfirina de  $(\text{Rh}(\text{CO})_2\text{Cl}_2)_2(\text{OEP}-\text{H})_4^{2+}$

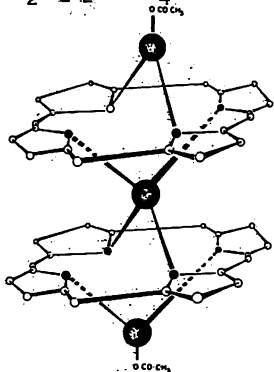


Figura 33. Estructura propuesta para el complejo porfirina de Hg trimetálico dinuclear.

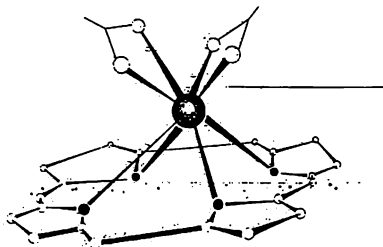


Figura 26. Estructura propuesta de  $(\text{OEP}) \text{Zr}(\text{IV})$  y  $(\text{OEP}) \text{Hf}(\text{IV})$  (OEP=acetatoetilporfina).

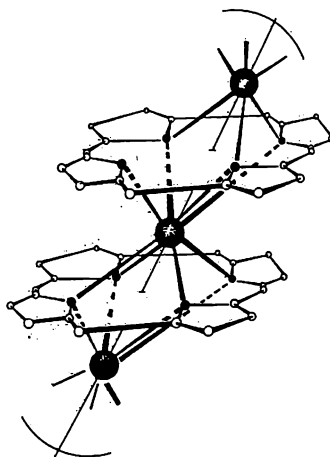


Figura 34. Estructura propuesta para los polímeros en pila de porfirinas.

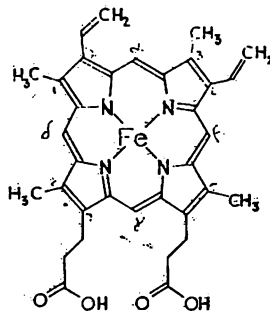


Figura 35. Estructura de la molécula heme.

TABLA II

Resumen de Resultados del Reemplazo de Metal en Hemoproteínas			
Hemoproteína	Metal	Función preservada	Valor función
Hemoglobina (humana, caballo).	Co	i) Oxigenación reversible.	$p_{1/2}=105 (5)mm$
	Cu, Mn, Ag Cr, Ru, Rh	ii) Cooperatividad Ninguna "	$n=2.2 (2.3)$
Mioglobina (esperma de ballena).	Co	Oxigenación reversible.	$p_{1/2}=50 (0.65)mm$
	Cu, Mn, Ag Cr, Ru, Rh	Ninguna "	
Citocromo c (corazón de caballo)	Co	i), Estado accesible de oxidación +II/+III	$E_{m.7} = -140 (+250)mv$
	Mn, Cu, Ag Ni	ii) Actividad de oxidación indeterminada.	$K_1 = 40\% (100\%)$
Citocromo c peroxidasa (levadura para hornear)	Mn	Reducción catalítica del peróxido.	$V_{max} = 5.5 \times 10^2 (5.5 \times 10^3)s^{-1}$ $K_m = 9 (20) M$

## II

## GRUPO DE LA TRANSFERRINA

Este grupo de proteínas lo componen la transferrina, lactoferrina y conalbúmina, la transferrina proporciona Fe para la biosíntesis de hemoglobina y probablemente para otras proteínas esenciales de Fe. El Fe se une fuertemente en los dos sitios activos para resistir la hidrólisis de manera que experimente muchos ciclos de transporte de Fe. - Estos sitios no existen a menos que una esterioquímica conveniente del anión sea aprovechada para estabilizarla y que probablemente actúa como un puente ligando entre el metal y la proteína.

En el reino de los vertebrados, donde un sistema circulatorio elaborado sirve a los tejidos con una extensa variación de requerimientos de Fe, las transferrinas comprenden una clase ingeniosa y compleja de moléculas unidas de Fe. El suero de transferrina es el prototipo y el miembro más estudiado de este grupo.

La lactoferrina o lactotransferrina es una proteína extensamente distribuida en las células y fluidos de secreción externa, como lo es la leche humana y bovina. Se cree que hidroxilos de tirosina son los quelatos del Fe(III) en esta proteína. El Fe está más fuertemente unido que en la transferrina.

La conalbúmina u ovo-transferrina se encuentra en la clara del huevo de las aves, la función biológica de estas dos últimas proteínas es poco conocida, la lactoferrina aparte del transporte de Fe en la leche se le consideran igual que a la conalbúmina, propiedades bacteriostáticas por cualquier huésped secuestrante del metal haciéndolo in-

capaz para el desarrollo microbial en el metabolismo.

La transferrina es una glicoproteína con una composición irremarcable de aminoácidos, con un peso molecular entre 76000-80000. Consiste de una cadena polipeptídica sobre la que están dispuestos dos sitios activos de unión del metal. Si estos dos sitios son idénticos en estructura y - equivalentes en funciones, es aún, después de 30 años de - descubierta la transferrina una cuestión controversial. - Considerada como un elipsoide prolato hidrodinámico de revolución, la proteína es asimétrica, con una razón axial en-entre 2.5 o 3 a 1 para la aproproteína, la cual decrece cuando está unido el Fe. La interacción responsable por el - cambio de forma depende del metal, y su significado fisiológico aún permanece desconocido.

Tal vez la propiedad química más sorprendente de la transferrina es que su actividad unidora de Fe es exhibida sólo cuando un anión apropiado está disponible para la - unión concomitante. El carbonato o bicarbonato probablemente son los aniones preferidos por la proteína, pero cuando todas las formas hidratadas del dióxido de carbono son ex-cluidas de la solución, otros aniones pueden activar el sitio de unión del metal. Esto incluye pero no son límites a, oxalato, malonato, tioglicolato, glicinato. EDTA, y posiblemente citrato. Un anión es obligado a unirse a cada ion metálico. La fisiología y química de la función de unir el - anión por la transferrina es actualmente una de las grandes áreas de interés para investigar.

La aparición de los dos sitios de unión del Fe sobre la cadena de proteína ha generado muchas especulaciones de la posibilidad de duplicación del gene y de la fusión de la evolución bioquímica de la transferrina. Trabajos basados sobre desdoblamiento químico y mapeo peptídico han sido

poco convincentes, análisis de secuencia de aminoácidos han revelado homologías internas que parecen suponer la hipótesis de fusión-duplicación del gene.

Los residuos carbohidratos del suero transferrina de ser humano están dispuestos en dos secciones de cadena - idénticas atacando a un residuo asparginilo y terminando en un residuo de ácido siálico, pero estudios recientes de su estructura primaria hechos por Spick y colaboradores discrepan con el modelo propuesto anteriormente por Jamieson y colaboradores. Una de estas cadenas está localizada cerca del carbono terminal de la cisteína de la mitad de la cadena peptídica, mientras la otra está sobre la parte interior de la cadena proteínica. La eliminación enzimática del residuo de ácido siálico terminal no parece afectar la unión con el Fe o las propiedades donadoras del Fe de la proteína. En contraste con otros sueros glicoproteínicos, los cuales son rápidamente liberados de la circulación en el hígado, la vida media biológica de la homóloga asiolotransferrina es ligeramente inferior comparada con la proteína natural. Experimentos con transferrina tratada con glicosidasa han fallado - para demostrar inequívocamente un papel funcional para el carbohidrato principalmente en la interacción de la proteína con las células blancas, los reticulocitos.

Aunque el Fe(III) es el más importante, si no el único ion metálico unido bajo circunstancias fisiológicas, los dos sitios específicos de transferrina acomodarán una variedad de iones metálicos multivalentes los cuales han sido usados como pruebas espectroscópicas de los sitios. Detalles conocidos del mecanismo químico fundamental de la unión compacta pero fisiológicamente reversible del Fe por la transferrina, probablemente tendran que esperar a estudios cristalográficos, pero ya se han obtenido por varios métodos espectroscópicos. En algunos de los primeros estu-

dios de las transferrinas, fue notable que el complejo fenólico de Cu(II) era amarillo, mientras que los de Fe(III) son rojos. Los complejos correspondientes de las transferrinas tienen colores similares. Sobre estas bases, y porque algunos de los grupos unidos a la proteína tienen pKs más grandes de 10. Warner y Weber sugirieron que residuos tirosilo pueden estar coordinados a los iones metálicos. Esto fue posteriormente demostrado para cada una de las transferrinas por diferentes valoraciones espectrofotométricas de las proteínas con metal y libres del metal, las cuales revelaron dos o tres más residuos de tirosina en la ausencia de la unión específica de los iones metálicos. El espectro de resonancia magnética de protón de los complejos de transferrina y conalbúmina de Fe comparado con complejos de galio diamagnéticos y las apoproteínas, muestran cambios en las regiones aromáticas, presumiblemente por el resultado del ensanchamiento de la resonancia del protón del tirosilo, por la proximidad del ion férrico paramagnético. Un aumento marcado de la fluorescencia del ion terbio cuando se une a una transferrina fue interpretado como resultado de transferencia de energía de un ligando tirosilo. Finalmente Gaber y colaboradores identificaron cuatro bandas aumentadas de resonancia Raman en los complejos de transferrina de Cu(II) y de Fe(III), los cuales se asemejan mucho a las bandas dadas por un compuesto modelo de fenolato Fe(III). Observaciones similares fueron reportadas también por Tomimatsu y colaboradores.

Estos estudios espectroscópicos, tomados conjuntamente proporcionan evidencias de la involucración del residuo tirosilo en el sitio activo de la transferrina. La modificación química del residuo tirosilo, daña o anula las propiedades unidoras del metal de las transferrinas, ofreciendo además una base para esta descripción. El número de grupos tirosilos que participan en la unión con el ion metá

lico es más difícil de determinar. En estudios de titulaciones espectrofotométricas, habían sido considerados tres grupos fenólicos OH coordinados por el Fe(III). Sin embargo, otros trabajos basados sobre espectrofotometría de diferencia-UV indican que sólo dos grupos pueden estar involucrados. Pueden ser apropiadas dos regiones homólogas en la estructura primaria de la molécula transferrina, las cuales pueden además representar las partes correspondientes de los sitios activos, cada una conteniendo sólo dos residuos-tirosilo.

La primera sugerencia de que ligandos nitrógeno - también pueden estar coordinados y específicamente unidos a los iones férricos viene desde los estudios de titulación - del ión hidrógeno de la transferrina. Para cada sitio activo, dos grupos, presumiblemente residuos histidilo, fueron titulados con un pH aproximado de 6 en la apoproteína, pero no en la molécula que tiene Fe. Estudios de modificaciones químicas (las cuales deben de ser cuidadosamente interpretadas y esto puede ser difícil para distinguir el rango de efectos conformacionales desde influencias muy específicas - en el sitio activo) y espectroscópicas de resonancia Raman - también implican residuos histidilo como ligandos del metal. Una demostración directa de que hay un ligando nitrógeno como mínimo en cada uno de los sitios de unión específicos del metal ha sido proporcionada por espectroscopia de resonancia paramagnética de electrón (EPR) de complejos de transferrina de Cu(II), pero no es claro si este nitrógeno - está sobre el anillo imidazol de la histidana. Aunque estudios primarios de EPR fueron interpretados como demostración de la influencia de dos ligandos nitrógeno, el uso de Cu isotópicamente puro y simulación espectral por computadora indicaron esa interacción del espín electrónico del Cu (II) con solamente un núcleo de  $^{14}\text{N}$ , es probablemente suficiente para considerarla la característica más notable del espectro.

En estudios detallados de la frecuencia dependientes de la velocidad de relajación del protón del agua en soluciones de transferrinas de Cu(II) y Fe(III), se cree que una molécula de agua está lo suficientemente cerca al ion metálico (aprox.  $2\text{Å}$  para la distancia de Fe-protón) para considerarla como ligando.

Desde estos datos, parece que la estructura de los ligandos en el sitio activo incluye, dos o tres residuos tirosilo, uno o dos grupos nitrógeno (posiblemente de anillo imidazol de residuo histidilo), y una molécula de agua. Entonces el número de coordinación usual del Fe es 6, pudiera parecer posible para satisfacer los requerimientos del Fe(III) con estos únicos ligandos. Las características notables en la unión específica del Fe con la transferrina sin embargo, es la cooperación mostrada entre el metal y las funciones de unión del anión de la proteína; ninguno parece unirse fuertemente en la ausencia de los otros. Esta interdependencia de unión del metal y el anión puede indicar, que el anión es también un ligando obligatorio del ion metálico, tal vez por servir como un puente ligando entre el metal y la proteína. Estudios de resonancia magnética de  $^{13}\text{C}$ - y aniones con espin marcado específicamente unidos a transferrina apoyan este modelo.

El papel del anión puede ser mejor apreciado desde simples consideraciones cuantitativas. En la ausencia de un anión conveniente; la unión específica del Fe con la transferrina no ocurre del todo; la constante de unión efectiva es cero. Sin embargo, a un pH fisiológico y concentraciones de bicarbonato, la constante de unión efectiva es aprox.  $5 \times 10^{23} \text{ M}^{-1}$ . Esto significa que en un litro de plasma sanguíneo, en el cual la transferrina está solamente en un 30% saturada con Fe, tendrá muchos menos iones férricos libres sobre una molécula del complejo transferrina-



férrica y será disociado espontáneamente en unos 10000 años. Después de que el Fe es fácilmente cambiado de la molécula de transferrina durante su interacción con los reticulocitos exteriores rompiendo la estructura proteínica, debe existir un mecanismo fisiológico específico para efectuar este cambio. Estudios preliminares sugieren que el anión puede ser el corazón de tal mecanismo.

Considerando las bases estructurales para la sorprendente interdependencia de las funciones de unión del Fe y el anión de la transferrina, Schlabach y Bates trataron tres modelos posibles:

- a) El anión unido sólo al ion metálico.
- b) El anión unido sólo a la proteína, ejerciendo su influencia sobre la unión del metal por un efecto conformacional o alostérico.
- c) El anión unido a la proteína y al ion metálico en un arreglo entrelazado.

Desde un análisis estereoquímico de los enlaces de aniones, el modelo del sitio entrelazado es el más consistente con los datos obtenidos. Se ha propuesto que la relación espacial del ion metálico y el anión en transferrina humana sea estudiada a través de espectroscopia de resonancia magnética nuclear y electrónica.

Cuando centros no paramagnéticos están cerca, la unión de la transferrina con el carbonato marcado con  $^{13}\text{C}$  deberá dar un aumento en la banda de resonancia igual que en el espectro de desacoplamiento del protón. Sin embargo, en la presencia de un ion metálico paramagnético cercano, la señal del  $^{13}\text{C}$  puede ser empleada. La dimensión de esta-

ampliación puede proporcionar una medida de la distancia - del metal al  $^{13}\text{C}$ . En efecto, el sitio específico de unión del metal en transferrina fue ocupado con Fe(III) paramagnético o con Co(III) diamagnético y Ga(III). En cada uno de los casos el requerimiento de unión del anión fue encontrado con  $^{13}\text{CO}_3^-$ , un carbonato estaba unido con cada uno de los iones metálicos. Una señal relativamente aguda de NMR de  $^{13}\text{C}$ , cambio unas 5 ppm bajo campo desde el bicarbonato libre de  $^{13}\text{C}$  en la misma solución, fueron observados en los complejos de  $^{13}\text{CO}_3^-$ -transferrina-Co(III) diamagnético y  $^{13}\text{CO}_3^-$ -transferrina-Ga(III) (fig.36) contra los antecedentes de resonancia amplia del abundante  $^{13}\text{C}$  natural de la proteína. En contraste, no hay señal para la unión del  $^{13}\text{CO}_3^-$  que pueda ser localizada en el complejo paramagnético de  $^{13}\text{CO}_3^-$ -transferrina-Fe(III) dentro de  $\pm 400$  ppm de su posición en el espectro de las proteínas diamagnéticas.

La ausencia de una señal detectable del  $^{13}\text{CO}_3^-$  de los complejos paramagnéticos de transferrinas de Fe(III) - probablemente reflejan ampliaciones causadas por interacciones de espín nuclear con el espín electrónico del ion metálico. De la ecuación de Solomon Bloembergen para  $T_2$ , el tiempo de relajación transversal del núcleo del  $^{13}\text{C}$ , es posible estimar la distancia máxima que debe de separar a los dos espines para la resonancia de la unión específica del  $^{13}\text{CO}_3^-$  para volverse indistinguible esparciéndose en el espectro. Esta distancia tiene un máximo en la unión de  $9 \text{ \AA}$  pero puede ser más pequeña.

Estos resultados son interesantes pero tal vez - no muy satisfactorios, ya que se pone un límite superior sobre la distancia de la unión anión-metal sin revelar inequívocamente si el anión está directamente coordinado a el ion metálico. Para lograr esta cuestión, se atacó un anión nitroxilo de transferrina con espín marcado para determinar -

si su señal de resonancia paramagnética electrónica era ampliada por interacción con la unión específica del Fe(III). El mecanismo de las ampliaciones puede ser similar a los de experimentos de NMR, pero ahora hay una interacción electrón-electrón mayor que la interacción núcleo-electrón anterior.

Ya que el malonato (estructura I) es capaz de cumplir el papel del anión en transferrina, parecerá razonable ver si el derivado de malonato con espin marcado puede servir como prueba de los sitios activos. Dos de esos derivados con espin marcado fueron preparados e identificados (preliminarmente) con la estructura II (N-4 - (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) malonamida) y III (N-4-(2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) malonato). Resultados similares fueron obtenidos con cada uno de los de la figura 37. Con una mezcla de Fe(III), transferrina, y II a un pH bajo, y aumentando el pH cerca de la neutralidad con amoníaco libre de CO<sub>2</sub>, el color rojo naranja característico del complejo ternario anión-transferrina-Fe es rápidamente manifestado. Sin embargo, la señal anticipada de EPR del nitróxido con espin marcado no es observada, probablemente porque es ampliada más allá de lo detectable por su cercanía a el gran momento magnético del Fe(III). La adición de bicarbonato a la preparación, causa una señal intensa del radical libre nitróxido y como el derivado malonato es desplazado de la proteína por la unión más cercana del carbonato paravolverse libre en solución.

Cálculos de la distancia de la unión nitróxido-metal, usando los análisis de Leigh's o la ecuación de Solomon-Bloembergen, indican que el metal y el radical están separados por 11 Å aprox. Ya que modelos en el espacio, muestran que la distancia del átomo de nitrógeno del nitróxido a cualquiera de los dos átomos de oxígeno del carboxi-

lo puede variar de 6 a 12 Å°, parece probable que el malonato con espín marcado es un ligando del Fe de la transferrina. Estos datos deben confirmarse, pero ellos ofrecen evidencias de que el anión actúa como un puente ligando entre el metal y la proteína.

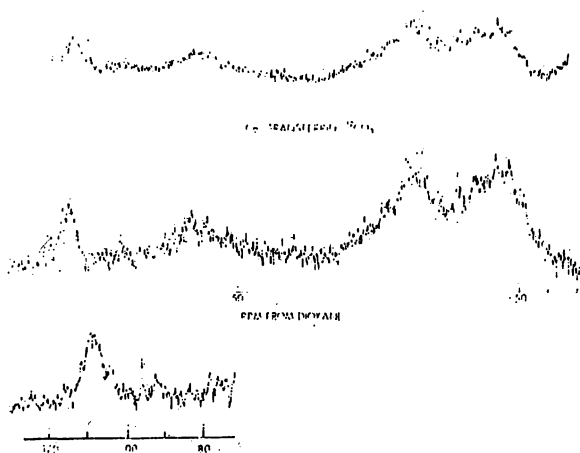


Figura 36. Espectro de resonancia magnética de neutrón de  $^{13}\text{C}$  despareado transformado por Fourier del  $\text{CO}_3$ -transferrina-Co(III). (A) transferrina marcada con  $^{13}\text{CO}_3$ ; (B) sin marcar; (C) después de adicionar  $\text{H}^{13}\text{CO}_3$ . La línea en 104 ppm es causada por la unión específica del  $^{13}\text{CO}_3$  a la transferrina y es de 14 Hz de ancho. La línea en 96 ppm es de 7 Hz del  $\text{H}^{13}\text{CO}_3$  libre.

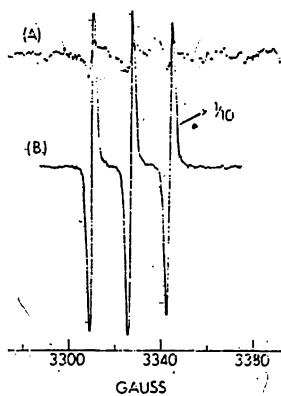
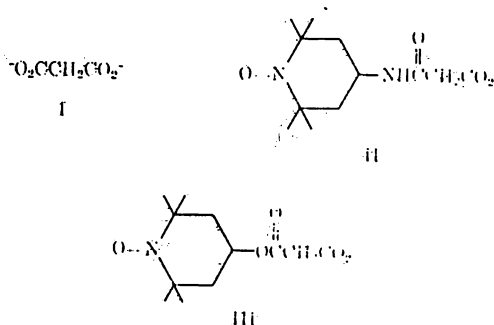


Figura 37. (A). Espectro RPE a 9.34 GHz de transferrina-II-Fe(III) a un rango de temperatura, la soluc. de transferrina  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  fue saturada con 90% de Fe(III) y malonato con nitroxilo marcado (compuesto II). (B) Después la preparación fue hecha en bicarbonato  $5 \times 10^{-3}\text{M}$ .



## III

## GRUPO DE LA FERRITINA

En este grupo de proteínas de Fe que probablemente se comportan como polímeros lo forman la ferritina como proteína principal la fosvitina y la hemeritina.

Las propiedades magnéticas y espectroscópicas de algunos sistemas modelo de Fe(III) han sido investigadas y comparadas con aquellas de ciertas proteínas que tienen Fe. Los datos espectrales muestran una coordinación del (Fe(III)  $O_6$ ) octaédrica, que está presente en el polímero de Fe(III) de Saltman-Spiro y también probablemente en el centro ferritina. El polímero (Fe(III)  $O_4$ ) de coordinación tetraédrica es compatible con los datos espectrales y magnéticos encontrados para la fosvitina Fe(III). Se han reunido muchos datos sobre dímeros de puentes oxo de Fe(III). Un modelo estructural electrónico involucra un acoplamiento moderado antiferromagnético de los dos centros de alto espín de Fe(III) que explica satisfactoriamente el espectro de campo ligando. Evidencias de excitación de pares electrónicos simultáneos también están presentes. Los datos espectrales y magnéticos para hemeritina son interpretados en términos de un modelo dimérico de Fe(III).

Se ha dirigido un gran esfuerzo hacia el entendimiento del espectro electrónico de complejos de alto espín  $d^5$  del tipo estructural (Fe(III)  $O_6$ )<sub>oct</sub> y (Fe(III)  $O_4$ )<sub>tet</sub>. La situación interesante con respecto a la transición de campo ligando (LF) para estos dos tipos de complejos se muestra en la figura 38. No hay transición de campo ligando de espín permitido desde el estado basal  $A_1$  y las dos transiciones bajas de espín prohibido decrecen en energía cuando el campo ligando cúbico se incrementa rápidamente. Además, la-

primera de las dos bandas de campo ligando de espín prohibido para  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$  debe encontrarse a más baja energía, que las bandas análogas de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$ .

Espectros experimentales de dos sistemas modelo - bien definidos estructuralmente ilustraron esta diferencia. El espectro superior de la figura 39 es el de un cristal de sulfato de amonio férrico el cual contiene  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , el espectro de abajo es el de una pasta de feldespato ortoclase- $\text{Fe}^{3+}$ . En este ejemplo los iones  $\text{Fe}^{3+}$  reemplazan al  $\text{Al}^{3+}$  en un cierto porcentaje de los sitios tetraédricos del óxido - donador. Los dos espectros muestran muy claramente que las dos bandas más bajas,  ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1({}^4G)$  y  ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2({}^4G)$  - son substancialmente bajas en energía en el caso del  $(\text{Fe} - (\text{III})\text{O}_6)_{\text{oct}}$ . Este espectro fue seleccionado porque cuatro - bandas de campo ligando son resueltas en cada caso. La ter - cera banda está totalmente definida en cada espectro y es - señalada para la transición en la cual no se requiere promo - ción orbital,  ${}^6A_1 \rightarrow {}^4A_1 E({}^4G)$ . La cuarta banda en cada caso está señalando  ${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2({}^4D)$ .

Se da un resumen de los datos espectrales para -  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  y  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  en las tablas III y IV respectiva - mente. Los coeficientes de extinción molar de las bandas - de campo ligando de espín prohibido son relativamente peque - ños, como se esperaba. Las bandas para  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  son - aproximadamente un factor de diez veces más intensos que - aquellos para  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  porque la transición de campo ligan - do en el último complejo son ambos de espín y orbital prohi - bido. Los diagramas de nivel de energía computados, mostra - dos en las figuras 40 y 41 están basados sobre los datos experi - mentales para los dos complejos modelo. El valor de  $\Delta_{\text{oct}}$  es considerablemente mayor que el de  $\Delta_{\text{tet}}$  de acuerdo con - lo esperado. Es de interés la gran diferencia en la razón - del parámetro Racah C/B, para el caso octaédrico esta razón

es de aproximadamente 3, mientras para la coordinación tetraédrica es cerca de 8.

### El Núcleo Ferritina

Un sistema biológico interesante que tiene  $\text{Fe}^{3+}$  en un medio estructural de coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_n)$  es la proteína almacenadora de Fe, ferritina. El núcleo o centro de la ferritina consiste de un fosfato, con óxido hidratado u óxido-hidróxido de  $\text{Fe(III)}$ . Se han sugerido modelos para el núcleo ferritina de los cuales los principales medios de coordinación del  $\text{Fe(III)}$  son,  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ , y una mezcla de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}} - (\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ .

Un modelo sintético particularmente interesante del núcleo ferritina es el polímero de  $\text{Fe(III)}$  obtenido por Spiro, Saltman y colaboradores en solución de nitrato férrico-hidrolizado con bicarbonato. El polímero tiene un peso molecular aproximado de 150000 y un diámetro de cerca de  $70\text{Å}$ . Estudios analíticos indican una composición de  $\text{Fe}_4\text{O}_3(\text{OH})_4(\text{NO})_2 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  para el polímero. En forma y tamaño físico, la "bola" de Saltman-Spiro es notablemente similar a el núcleo ferritina. La estructura que se ha sugerido para la "bola" de Saltman-Spiro y empleado para la ferritina se muestra en la figura 42. Los iones de  $\text{Fe(III)}$  están unidos a la vez en una red de puentes oxo e hidroxilo con una estructura de coordinación tetraédrica  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)$ . En este modelo, las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  y los iones  $\text{NO}_3^-$  cubren la "bola" principal para la analogía gráfica de Saltman's con los dulces M y M'. La base principal para el modelo estructural de coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  es un ángulo pequeño en un experimento de dispersión de rayos X, y un análisis subsecuente de la función de distribución radial. Este es un experimento difícil para analizar y en nuestra opinión la espectroscopia electrónica ofrece una ruta de prueba más evi-



dente para la estructura de coordinación.

Se ha examinado, el espectro electrónico de la "bola" de Saltman-Spiro. En el espectro (fig. 43) se muestra un modelo de cuatro bandas débiles con la banda más baja cerca de los 900 nm., en concordancia con la coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ . La derivada de los parámetros de campo ligando son  $\Delta_{\text{oct}} = 11260 \text{ cm}^{-1}$ ,  $C/B=3$  y  $B=815 \text{ cm}^{-1}$ . Se puede decir con confianza que muchos de los iones  $\text{Fe(III)}$  ocupan sitios de coordinación octaédrica. No hay indicios de bandas atribuibles a  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  y como estas bandas son propiamente más intensas que aquellas señaladas para  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$  podemos efectivamente ordenar nuestra coordinación tetraédrica en estos compuestos sintéticos modelo.

Los estudios espectrales de absorción electrónica sobre el núcleo ferritina son menos definitivos. Porque de una fuerte cola de absorción a través del visible sólo se ha resuelto a 918 nm. la banda de campo ligando. Esta banda es diagnóstico de coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ , pero sin mejorar el espectro en la región de 400-700 nm. no se puede distinguir entre las estructuras de coordinación exclusivamente de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$  y la mezcla  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}} - (\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$ . Hay, sin embargo, evidencias negativas de la presencia de unidades de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  en el núcleo y de la primera analogía con la "bola" de Saltman-Spiro se prefiere un modelo con la coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ .

Otro aspecto estructural importante en la "bola" de Saltman-Spiro y el núcleo ferritina que podemos examinar por mediciones espectroscópicas, es la cuestión de si la red polimérica de  $\text{Fe(III)}$  se mantiene continua con los puentes oxo e hidroxilo, como se sugiere en la figura 42 ó si sólo uno de los puentes oxo o hidroxilo es suficiente. Estudios de espectro IR de varios óxidos de fierro hidratados de es-

estructura conocida han mostrado que puentes hidróxido absorben invariablemente en la región  $900-1200 \text{ cm}^{-1}$ . Ni la "bola" de Saltman-Spiro, ni el núcleo ferritina muestran una banda en el IR atribuible a los puentes hidróxido, aunque la absorción se debe respectivamente a  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en la región de vibración que interesa sobre la conclusión. Sin embargo, parece muy probable que ambos, la "bola de Saltman-Spiro y el núcleo ferritina contienen una red polimérica de sordenada con unidades de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$  primeramente unida por puentes oxo. Presumiblemente, complementan esta red polimérica moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NO}_3^-$  (ó  $\text{PO}_4^{3-}$ ) que están unidos a algunos de los centros de Fe.

### Fosvitina Fe(III)

Otra proteína de Fe(III) en la cual la coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_n)$  es semejante, es la fosvitina Fe(III). El hecho de que 46 iones de Fe(III) están unidos por una molécula de fosvitina ha sido establecido recientemente por Saltman y Multani. El espectro de absorción electrónico de la proteína de Fe(III) se muestra en la figura 44. Tres bandas débiles de campo ligando en el espectro, a 447, 426, y 420 nm. a  $150^\circ\text{K}$ . La energía relativamente alta de la primera de las dos bandas de campo ligando proponen una coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  y en realidad es muy satisfactorio y apropiado el espectro que se obtiene con los parámetros de campo ligando  $\Delta_{\text{tet}} = 5270 \text{ cm}^{-1}$ ,  $B = 495 \text{ cm}^{-1}$ , y  $C/B = 8$ . Notablemente el espectro está aparentemente libre de picos en la región 800-1000 nm. donde aparece invariablemente el  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ . Así se sugiere que la fosvitina Fe(III) proporciona un ejemplo biológico de la favorablemente rara coordinación  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$ .

Dos fragmentos más de información inducen y contribuyen a los detalles del modelo. Mediciones de sensibilidad magnética de fosvitina Fe(III) sobre el rango de temperatura 85-300°K, se encontraron evidencias de conducta anti ferromagnética (fig. 45). El momento magnético por goteo de Fe desde 4.45 a 3.39 BM sobre el mismo rango de temperatura investigado. Así, es muy probable que como mínimo alguna de las unidades de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$  son puentes ligando de interacción continua. Como hay 100 residuos de fosfato serina en la fosvitina, o aproximadamente dos por cada Fe(III), una posibilidad interesante es una estructura del tipo mostrado en la figura 46.

Son posibles otros modelos. Por ejemplo, un pequeño porcentaje de iones Fe(III) coordinados octaédricamente pueden escapar a la detección de los experimentos espectroscópicos. Enfatizando la mejor conclusión: muchos de los iones Fe(III) están coordinados tetraédricamente y forman algún tipo de estructura polinuclear.

#### Dimeros de Fe(III) Puentes Oxo

Las investigaciones estructurales de Fe(III) polimerizado hidrolíticamente no se han limitado a los sistemas de pesos moleculares altos tales como la "bola" de Saltman-Spiro. En realidad muchas de las investigaciones se han concentrado en el área de los complejos de Fe(III) binucleares relativamente simples. Los ligandos polifuncionales y quelatos del Fe(III) EDTA (etilendiaminotetracetato) y HEDTA (hidroxietilendiaminotriacetato) así es, efectivamente en una hidrólisis básica solo una posición de coordinación es accesible para el puente, y los dimeros del tipo  $(\text{EDTA Fe})_2\text{O}^{4-}$  y  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$  lo forman, pero no polímeros superiores. Como un resultado, EDTA y HEDTA son excelentes-

agentes solubilizadores del Fe(III) sobre un amplio rango - de pH extendiéndose hasta soluciones muy básicas.

Sales de red cristalina pueden ser obtenidas de - las soluciones que tienen el complejo dimérico. En particu- lar se ha investigado la sal en  $H_2^{2+}$  (etilendiamonio) de -  $(HEDTA Fe)_2O^{2-}$ . La estructura de este compuesto se conoce de los análisis cristalográficos de rayos X. El aspecto más importante de la estructura de coordinación se muestra en - la figura 47. Las unidades monoméricas  $(Fe(III)O_4N_2)_{oct}$  se reparten en un puente casi lineal oxo, el ángulo  $Fe(III)-O-Fe(III)$  es de  $165^\circ$ . La distancia de  $Fe(III)-oxo$  es  $1.8 \text{ \AA}$ , un número que puede ser considerado como una indicación de unión  $p\pi \rightarrow d\pi$  si no fuera por el hecho de que una distan- cia corta de  $1.68 \text{ \AA}$  similar, se ha observado en una estruc- tura  $Al(III)-O-Al(III)$ .

El complejo  $(HEDTA Fe)_2O^{2-}$  posee una banda de ab- sorción IR cerca de los  $840 \text{ cm}^{-1}$  que es característica de - una unidad  $Fe(III)-O-Fe(III)$  casi lineal. Este espectro ca- racterístico del complejo se muestra en la figura 48. La - banda es señalada para el movimiento de estiramiento antisí- métrico en el sistema de tres átomos. El hecho de que la - banda de  $840 \text{ cm}^{-1}$  esté presente en un cristal y en una solu- ción  $D_2O$  de  $(enH_2)-((HEDTA Fe)_2O) \cdot 6H_2O$  establece que la es- tructura de puente oxo persiste en un medio acuoso. Medi- ciones magnéticas y datos de espectro electrónico también - confirman la identidad esencial de la estructura en sólidos y soluciones acuosas.

Volviendo a los datos magnéticos, la figura 49 - muestra la gráfica de  $M_{eff}$  contra temperatura para un ejem- plo sólido de  $(enH_2)-((HEDTA Fe)_2O) \cdot 6H_2O$  y una referencia - de alto espín ( $S=5/2$ ) del complejo monómero de  $Fe(III)$ . El complejo binuclear presenta conducta antiferromagnética, el

$\mu_{\text{eff}}$  por goteado de Fe(III) es de 1.9 BM a 300°K hasta el cero efectivo cerca de los 30°K. Lo excelente y conveniente de este dato es producido por suponer que los iones con  $S=5/2$  son de espín acoplado, con  $J=-95 \text{ cm}^{-1}$ . Evidencias que apoyan fuertemente a este modelo son proporcionadas por datos de espectros electrónicos que serán discutidos más adelante.

Un examen de los artículos en este campo revelan que los puentes oxo están bien establecidos en varios complejos binucleares de Fe(III). Los complejos de Fe(III) con puente oxo que han sido estudiados cuidadosamente, todos presentan valores  $J$  en el rango  $-85$  a  $-105 \text{ cm}^{-1}$ . En claro contraste, el dímero de Fe(III) de puente dihidroxido ha sido aislado y caracterizado completamente por mostrar el  $(\text{Fe}(\text{pec})_2\text{OH})_2$  muchos acoplamientos débiles espín-espín ( $J=-8 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_{\text{eff}}(300^\circ\text{K})=5.2 \text{ BM}$ ).

Fuertes evidencias de que el  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$  tiene acoplamiento antiferromagnético de unidades octaédricas  $S=5/2$  pueden ser extraídas de su espectro de absorción electrónica que se muestra en la figura 50. El HEDTA es un buen ligando para estos estudios porque no absorbe apreciablemente en el IR cercano, visible y UV cercano. No menos de 8 picos de absorción aparecen antes de la absorción de transferencia de carga e intraligando. El espectro se divide en dos partes, un grupo de cuatro picos de baja energía (a-d) con coeficientes de extinción bajos o moderados, y un grupo de picos más intensos de alta energía (e-h).

Las bandas de a-d están colocadas propiamente por ser las primeras cuatro transiciones de campo ligando en cada unidad  $S=5/2$   $(\text{Fe(III)}\text{O}_4\text{N}_2)_{\text{oct}}$  (ver fig. 40). Acuerdos razonables entre la teoría y los experimentos son obtenidos para los valores de los parámetros del campo ligando  $\Delta_{\text{Oct}} =$

10900  $\text{cm}^{-1}$ ,  $C/B=2.4$  y  $B=950 \text{ cm}^{-1}$ . La diferencia principal entre el espectro de campo ligando en los dímeros puente oxo y un complejo monómero octaédrico de Fe(III) es la intensidad de las bandas. Los coeficientes de extinción molar de las cuatro bandas de campo ligando en  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$ , por ejemplo, son dos veces de mayor magnitud más que aquellas para un complejo monomérico como el  $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ . Esta intensidad mejora las bandas de campo ligando de prohibido y es una consecuencia esperada del acoplamiento antiferromagnético en el sistema de puente oxo; el acoplamiento relaja parcialmente la regla de selección del espín y adquiere algunas transiciones de carácter permitido. La selección del acoplamiento espín-espín por el aumento de intensidad de las bandas de campo ligando de espín prohibido han sido trabajadas con algo de profundidad en el caso de  $\text{MnF}_2$  y otros materiales antiferromagnéticos que tienen Mn(II). La observación en el sistema Fe(III)-O-Fe(III) lógicamente tiene la misma explicación.

Las cuatro bandas relativamente intensas del UV (e-h) son resueltas en un tiempo largo. Basados sobre los estudios de complejos monómeros parientes, energéticamente ellos son también bajos para ser atribuible a transiciones de transferencia de carga del ligando  $\rightarrow \text{Fe}(\text{III})$ ; es más, hay también muchas bandas para una explicación de transferencia de carga. Las bandas son mucho muy intensas para ser las bandas de campo ligando de alta energía, conforme a lo permitido por el aumento de intensidad en un dímero acoplado antiferromagnéticamente. La eliminación de los tipos usuales de transición ha conducido a sugerir que el espectro de UV consista de excitación simultánea de pares electrónicos (SPE). Esto es, transiciones de campo ligando simultáneas sobre los dos centros de Fe(III) pueden ser acopladas cuando la excitación del par es de espín permitido. Esta explicación no es sin precedentes-Varsanyi y Dieké pro

pusieron primero una explicación similar para una parte del espectro de excitación de fluorescencia del  $\text{PrCl}_3$ , y para este sistema Dexter ha discutido excitaciones SPE desde un punto de vista teórico. Cada transición en la mezcla de fluoruros de  $\text{Mn(II)-Ni(II)}$  y el dímero acetato de  $\text{Cu(II)}$  también ha sido sugerido en la interpretación del espectro de absorción.

Suponiendo una aditividad simple, las posiciones de las cuatro excitaciones SPE en el  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$  concuerdan muy bien con las posiciones de las bandas e-h y proporcionan ayuda considerable para la interpretación. Esta semejanza se muestra en la figura 50 y es incluido en el resumen de la interpretación del espectro de absorción electrónico del  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$  agrupados en la tabla V.

En resumen, se está sobre el camino para el entendimiento de las propiedades magnéticas y espectrales de ciertos tipos de complejos binucleares de  $\text{Fe(III)}$ . Dímeros de puente oxo de alto espín y monómeros de  $\text{Fe(III)}$  muestran como mínimo cuatro características distintas: una banda IR cerca de  $840\text{ cm}^{-1}$ ; de conducta antiféromagnética con  $J$  en el rango  $-85$  a  $-105\text{ cm}^{-1}$ ; bandas de campo ligando con aumento de intensidad; y una rica serie de bandas UV que son interpretadas como excitaciones SPE.

### Hemeritrina

Las propiedades espectroscópicas y magnéticas observadas para el modelo dímero puente oxo,  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$ , ha proporcionado datos en intentos por entender la estructura de coordinación de la proteína hemeritrina, que une oxígeno reversiblemente. La proteína se ha estudiado desde sipunculid *Golfingia gouldii* muy ampliamente por Klotz y colaboradores. Ocho subunidades, cada uno conteniendo dos áto

mos de Fe capaces de unir una molécula de oxígeno asociada con el total de la proteína para dar un peso molecular de cerca de 108000. Mediciones magnéticas mostraron que la forma deoxi de la proteína contiene Fe(II) de alto espín. El espectro de absorción electrónico de esta forma es relativamente claro abajo de los 300 nm.; en el UV, aparece el pico característico de tirosina cerca de los 280 nm.

Oxidando la proteína a met Fe(III), aparecen picos de absorción en la región visible. Cada subunidad de la met proteína une ligandos como  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ , y  $\text{N}_3^-$  en un complejo de Fe(III) 1:2, y las posiciones del pico visible de estos derivados met que varían ligeramente. El espectro de absorción electrónico de metclorohemeritrina se muestra en la figura 51. En adición, para las bandas mostradas hay algunas evidencias de un pico debido a una transición electrónica en la región de los 900 nm. Este pico está sumamente sobrepuesto por bandas atribuibles a vibraciones armónicas y así, no es bien caracterizado. Las bandas a 668 y 500 nm., sin embargo, pueden ser señaladas como bandas de campo ligando en un complejo de Fe(III). Sus intensidades moderadas son consistentes con un modelo en el cual dos iones de Fe(III) son de espín acoplado en un dímero de puente oxo del tipo  $(\text{Cl-Fe(III)-O-Fe(III)})$ . Datos de sensibilidad magnética son discutidos actualmente en apoyo de esta proposición.

Las bandas a 384 y 331 nm. en el derivado metcloro deben ser atribuidas a alguna clase de transición electrónica involucrando a uno o ambos iones de Fe(III). Sus posiciones e intensidades pueden ser racionalizadas si ellas son señaladas como excitaciones SPE en un dímero de puente oxo. Alternativamente, transiciones de transferencia de carga ligando  $\rightarrow \text{Fe(III)}$  son también explicaciones posibles. A longitudes de onda más bajas de 331 nm. se -



considera que hay absorción de tirosina, y picos adicionales causan que se tape el Fe(III).

El espectro de absorción electrónica de oxihemeritrina se muestra en la figura 52. Este espectro se parece mucho al de metclorohemeritrina, excepto por la gran intensidad en la banda de 500 nm. El espectro puede ser considerado como una evidencia razonable de una sugerencia hecha por Klotz, que en la forma oxi ambos fierros han sido oxidados a Fe(III) y el  $O_2$  reducido a  $O_2^{2-}$ . La gran intensidad a 500 nm. puede ser entendida en este modelo porque una banda de absorción similar ha sido observada en el complejo formado entre  $(Fe(III)-EDTA)^-$  y  $H_2O_2$  en solución básica. Presumiblemente, esta banda es atribuida a una transición de transferencia de carga  $O_2^{2-} \rightarrow Fe(III)$  ó  $HOO^- \rightarrow Fe(III)$ .

Las bandas a 370 y 317 nm. en oxihemeritrina son similares a las bandas de 384 y 331 nm. en el derivado metcloro y con muchas probabilidades señalamientos análogos son apropiados.

Los datos espectrales para el metcloro y proteínas oxi sugieren estructuras de coordinación involucrando unidades dimericas de Fe(III). Experimentos de sensibilidad magnética sobre un rango de temperatura limitado para ambas proteínas arrojan un peso considerable para esta sugerencia. Estos datos se muestran en la figura 53. Aunque los límites de error son grandes, parece que en cada caso el  $\mu_{eff}$  por goteo de Fe(III) es reducido grandemente del valor de alto espín  $\sim 6$  BM. Además, en el rango de 300 a 100°K hay algunas evidencias de que ambas proteínas presentan conducta antiferromagnética.

Los datos espectrales y magnéticos apuntan a una estructura de dímero puente oxo Fe(III) para la proteína -

metcloro. Un modelo de puente oxo es también atractivo para la oxihemeritrina, con la posible alternativa de un puente-peróxido-Fe(III) que no puede ser desechada. Preferimos ligeramente el modelo de puente oxo para la forma oxi, porque naturalmente corresponde en las series met como un derivado metperoxi o methidroperoxi. Se han obtenido evidencias preliminares que ambas proteínas oxi y met muestran la absorción característica de  $840\text{ cm}^{-1}$  de una estructura Fe(III)-O Fe(III). Como a la temperatura de la celda IR hay problemas serios de descomposición de la proteína oxi, estos resultados son muy tentativos actualmente.

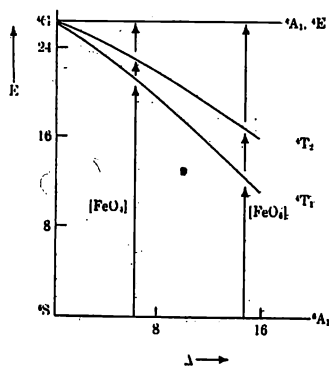


Figura 38. Relación de los niveles de energía más bajos de campo ligando para complejos de Fe(III) d<sup>5</sup> en coordinación octaédrica y tetraédrica.

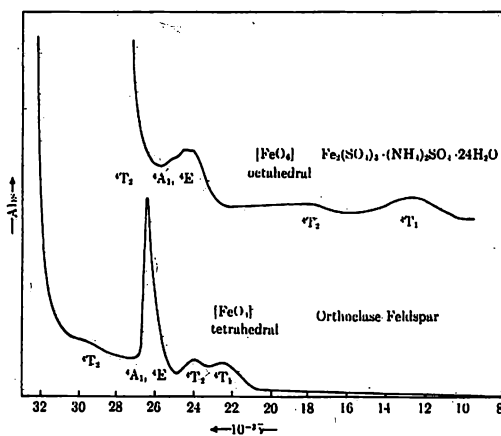


Figura 39. Espectro de absorción electrónica de Fe(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> en sulfato de amonio férrico y (Fe(III)O<sub>4</sub>)<sub>tet</sub> en feldespato ortoclasa.

TABLA III

Datos de Espectro Electrónico para Fe (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> en Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> · (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 24H<sub>2</sub>O

<sup>4</sup> A <sub>1</sub> →	$\bar{\nu}$ , cm <sup>-1</sup>	$\epsilon$
<sup>4</sup> T <sub>1</sub>	12,600	0.05
<sup>4</sup> T <sub>2</sub>	18,200	0.01
( <sup>4</sup> A <sub>1</sub> , <sup>4</sup> E)	24,200	1.3
	24,600	
	25,400	
<sup>4</sup> T <sub>2</sub>	27,700	1

${}^4A_1 \rightarrow$	$\bar{\nu}, \text{cm}^{-1}$	$\epsilon$	Calcd <sup>b</sup>
${}^4T_1$	22,500	0.73	22,150
${}^4T_2$	23,900	0.76	24,550
( ${}^4A_1, {}^4E$ )	26,500	4.1	26,550
${}^4T_2$	29,200	0.1	28,940

TABLA IV. Datos de Espectro Electrónico de  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)$  en Feldespato Ortoclasa.

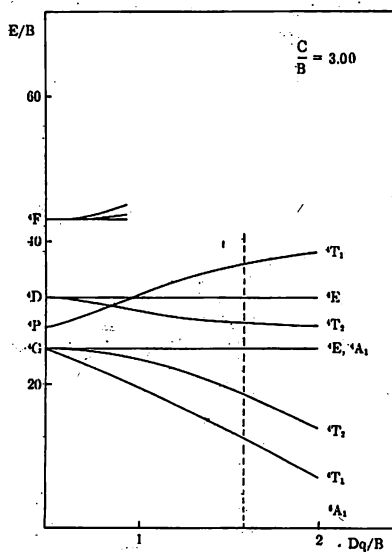


Figura 40. Niveles de energía de campo ligando calculados para  $(\text{Fe(III)}\text{O}_6)_{\text{oct}}$ .

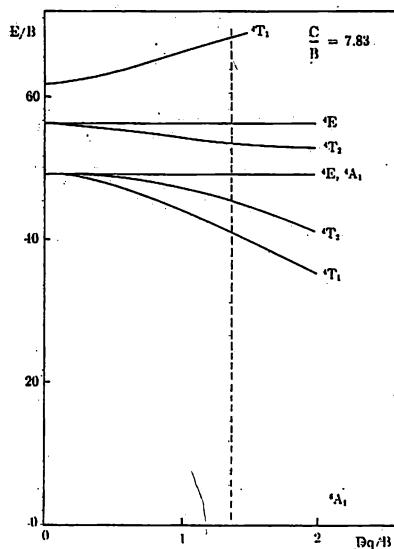


Figura 41. Niveles de energía de campo ligando calculados para  $(\text{Fe(III)}\text{O}_4)_{\text{tet}}$ .

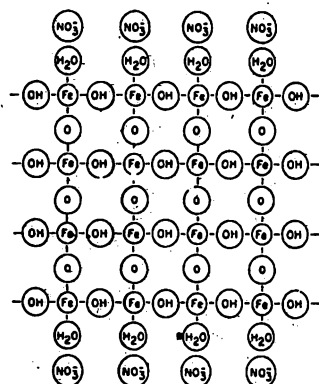


Figura 42. Modelo estructural -  
propuesto para la bola de Salt-  
man-Spiro.

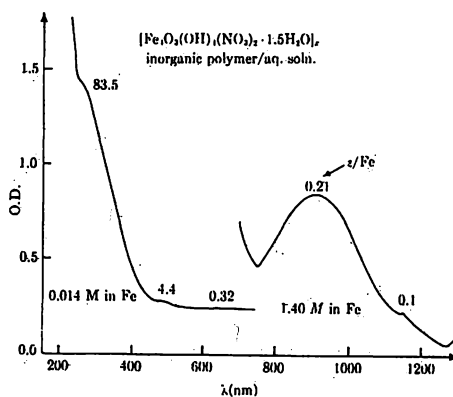


Figura 43. Espectro de absorción electrónica  
de la bola de Saltman-Spiro.

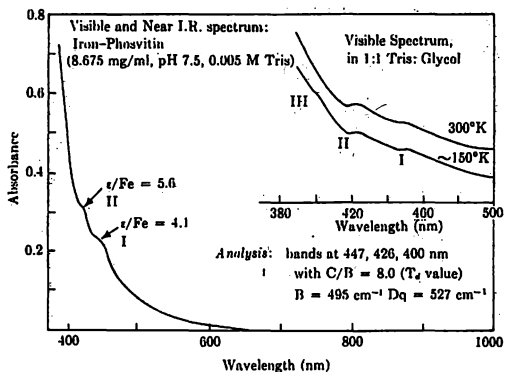


Figura 44. Espectro de absorción elec-  
trónica de fosvitina Fe(III).

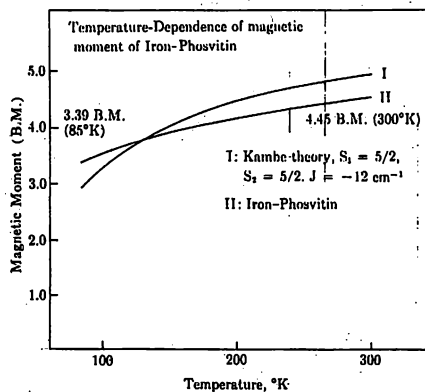


Figura 45. Datos de momento magnético de fosvitina Fe(III).

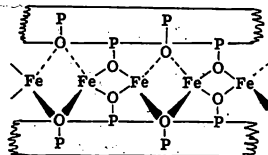


Figura 46. Modelo de unión entre el Fe(III) y la fosvitina.

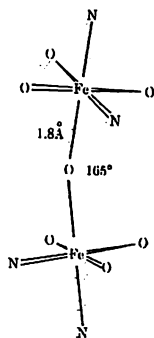


Figura 47. Estructura de coordinación de  $(\text{HEDTA Fe})_2 \text{O}_2^{2-}$ .

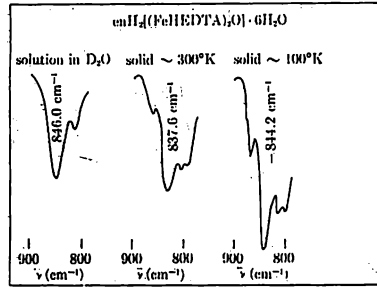


Figura 48. Espectro IR en la región de los  $840\text{ cm}^{-1}$  de  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$

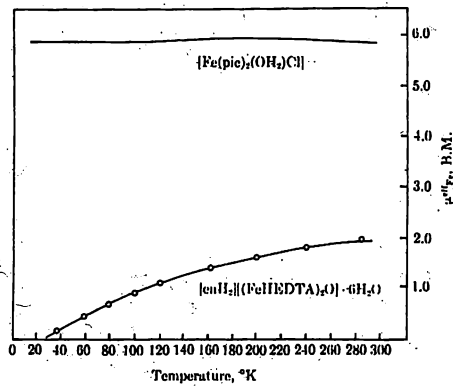


Figura 49. Datos de momento magnético para  $(\text{enH}_2)(\text{HEDTA Fe})_2\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Fe}(\text{pic})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}$ .

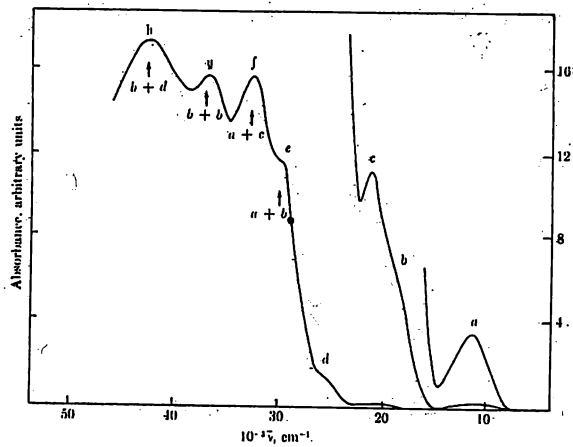


Figura 50. Espectro de absorción electrónica de  $(\text{HEDTA Fe})_2\text{O}^{2-}$

TABLA V. Datos de Espectro Electrónico para en  $H_2((HEDTAFE)_2O)_6H_2O$

Banda		Señal
Band	$(10^{-3}) \bar{\nu}_{max}, cm^{-1}(\epsilon)$	Assignment
a	11.2 (2.6)	${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_1$
b	18.2 (40)	${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2$
c	21.0 (25)	${}^6A_1 \rightarrow ({}^4A_1, {}^4E)$
d	24.4 (120)	${}^6A_1 \rightarrow {}^4T_2$
e	29.2	$a + b = 29.4$
f	32.5	$a + c = 32.2$
g	36.8	$b + b = 36.4$
h	42.6	$b + d = 42.6$

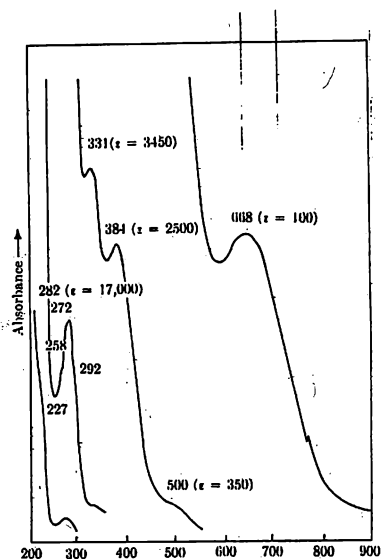


Figura 51. Espectro de absorción electrónica de metchlorohemeritrina.

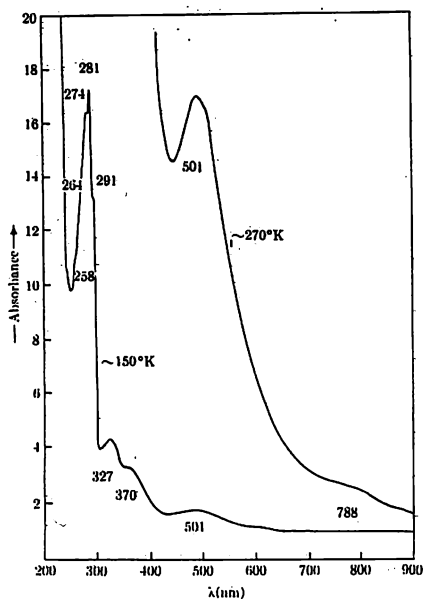


Figura 52. Espectro de absorción electrónica de oxihemeritrina.

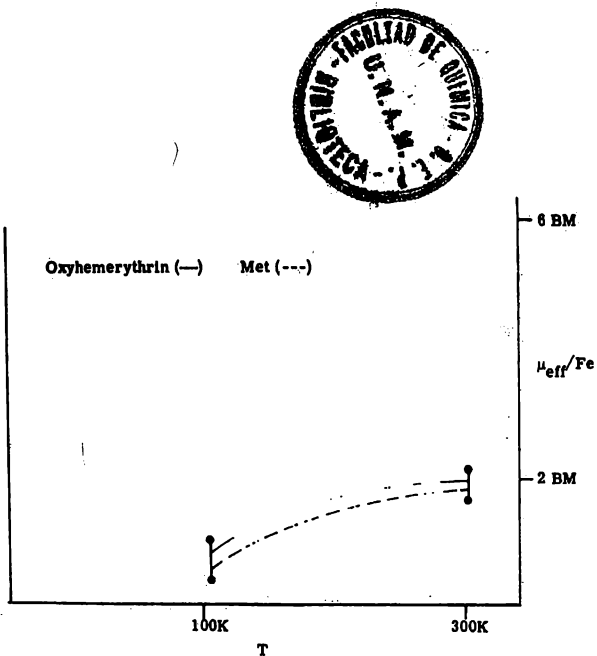


Figura 53. Datos de momento magnético para metchlorohemeritrina y oxihemeritrina.



## IV

## GRUPO DE LA FERRODOXINA

Este grupo de proteínas tienen Fe y S inorgánico (ácido labil) en los centros activos como  $4\text{Fe}-4\text{S}$  ó  $2\text{Fe}-2\text{S}$ , también como en el caso de la rubredoxina con únicamente un átomo de Fe. El Fe está siempre unido al S de una cisteína. A diferencia de las proteínas de los grupos anteriores, el Fe no se encuentra unido a un anillo porfirina.

Las proteínas de Fe-S se agrupan usualmente en cuatro clases diferentes, en la siguiente forma:

- a) Centros que tienen  $4\text{Fe}-4\text{S}$
- b) Centros que tienen  $2\text{Fe}-2\text{S}$ .
- c) Centros que tienen sólo un átomo de Fe.
- d) Proteínas complejas de Fe-S

Uno de los grupos mejor conocidos de las proteínas de Fe-S es el de las ferredoxinas. Estas son pequeñas proteínas que tienen relativamente pocos ácidos amino, entre 55 y cerca de 120 (peso molecular 6000-14000). Contienen cualquiera de los centros activos  $4\text{Fe}-4\text{S}$  ó  $2\text{Fe}-2\text{S}$ , que pueden ser extraídos intactos de la proteína en presencia de ligandos y disolventes apropiados por la técnica llamada "expulsión del centro". Otro aspecto importante del movimiento del centro activo es que la apoproteína formada puede ser reconstituída bajo condiciones no enzimáticas y anaeróbicas por simple adición de sulfato de amonio ferroso y sulfito de sodio.

La secuencia de amino ácidos en las ferredoxinas es completamente diferente; la posición de las cisteínas que se unen a los fierros en un medio específico no varía -

en diferentes clases de ferredoxinas. Esta poca variación - en las posiciones de los aminoácidos principales ha sido - muy usada en el estudio de la evolución de ferredoxinas.

El estudio de las proteínas de Fe-S ha sido fuertemente apoyado por el reconocimiento de la señal de EPR  $g = 1.94$  que generalmente parece estar en la forma reducida. Sin el uso de la técnica de EPR el estudio de las proteínas de Fe-S se hace muy difícil por su bajo coeficiente de extinción y su amplia absorción en la región visible. Trabajos que usaron espectroscopia Mössbauer, CD, resonancia magnética de protón, sensibilidad magnética etc., han apoyado el estudio de partes específicas de la proteína sobre los mismos centros activos. La figura 55 muestra el espectro EPR característico de las proteínas Fe-S representativas, incluyendo proteínas de Fe de alto potencial (HiPIP), las cuales tienen una señal de espectro EPR  $g = 2.02$  en estado oxidado.

La existencia de proteínas con la estructura tipo HiPIP fue el principio de un desarrollo interesante en el estudio del centro activo S-Fe. La cristalografía de rayos X demostró que hay poca diferencia entre el agrupamiento  $4Fe-4S$  en una ferredoxina ( $E' = -400$  mV) y en una HiPIP ( $E' = +350$  mV). Esta anomalía fue aclarada por la llamada hipótesis del estado "C" de Carter y colaboradores (Fig. 56), que postularon la existencia de una HiPIP super-reducida y una ferredoxina super-oxidada. Cammack demostró la existencia de la HiPIP super-reducida utilizando 80% de dimetilsulfoxido (DMSO) para distorsionar el medio de la proteína HiPIP. Fue detectada en este caso una señal de EPR de la HiPIP super-reducida similar a la de una ferredoxina  $4Fe$ . Una ferredoxina super-oxidada fue reportada por Sweeney.

El uso de agentes como el DMSO también han facili

tado el estudio de las proteínas S-Fe cuyo centro activo no ha sido determinado. En este caso la proteína en cuestión es examinada usando EPR en la presencia y ausencia de una concentración dada de DMSO (Fig. 57). La dependencia de temperatura de estas señales es también un criterio diagnóstico como lo es la forma de la señal de EPR. De este modo, un centro con 2 ó 4 Fe puede ser distinguido rápidamente. - Esto también puede ser resuelto por los experimentos de expulsión del centro de Holm y Orme-Johnson. La ventaja de la técnica del DMSO, es que el tipo de centro en una proteína unida a una membrana también puede ser distinguido, como ha sido el caso con las membranas de cloroplastos, donde un centro de 4Fe-4S fué detectado como el aceptor primario del transporte de electrones.

Está bien establecido que las proteínas tienen 2, 4, 6, u 8 átomos de Fe (ver tabla VI), dependiendo de su origen, y con un igual número de átomos de S lábiles y un número considerable de residuos de amino ácido cisteína.

Es lógico principiar los estudios de modelos concompuestos de cisteína-Fe, sin embargo trabajos en esta área han sido mínimos. Este campo puede ser muy prometedor en la obtención de datos del espectro de absorción de soluciones de cloruro de Fe, mercaptoetanol y  $\text{Na}_2\text{S}$  que tienen una estrecha semejanza con las proteínas de S-Fe.

Se propuso al persulfuro unido al átomo de Fe para sistemas biológicos, y en apoyo de esto, fué citado como un ejemplo el compuesto  $\text{Fe}(\text{S}_2\text{CC}_6\text{H}_4\text{CH}_3)_2 (\text{S}_3\text{CC}_6\text{H}_4\text{CH}_3)$ . Para las proteínas 2Fe-2S, la estructura más favorecida se muestra en la figura 54 y es apoyada por el conocido puente sulfuro  $(\text{FeS}(\text{S}_2\text{C}_2\text{Ph}_2))_2$  y el puente mercapto  $(\text{Fe}(\text{SR})(\text{S}_2\text{CSR}_2))_2$ . La geometría del Fe en estos compuestos parece ser cuadrada planar, aunque evidencias recientes indican que las ferrodó

xinas, probablemente rubredoxina, contiene Fe en sitios tetraédricos.

La equivalencia del número de átomos de Fe y S sugiere un alto orden estructural, y para las proteínas 4Fe--4S, el arreglo lógico es la estructura del pseudo-cubo. Compuestos que tienen alternativamente un metal y un no metal en las esquinas de un cubo son muy comunes a través de la tabla periódica. Como estos, son los complejos S-Fe; como  $((C_5H_5)_2FeS)_4$ , que consisten de un cubo distorsionado  $Fe_4S_4$  con los grupos ciclopentadienilo próximos a las esquinas del Fe. Este complejo puede ser oxidado y reducido en el estado de oxidación 5, en un paso de un electrón sin fisión del complejo, lógicamente una característica atrayente para comparar con el sistema enzimático. Algunas evidencias apoyan esta estructura para el sistema enzimático pero con S de cisteína en lugar de los grupos ciclopentadienilo. Esta estructura da un arreglo resultante pseudo-tetraédrico para el átomo de Fe.

Pocos sistemas son utilizados como modelos para las proteínas 6Fe-6S y 8Fe. Estudios sofisticados de rayos X de una proteína 8Fe-8S muestran un agrupamiento de alta densidad electrónica con una forma cúbica. El modelo favorable para esta proteína consiste de dos unidades pseudo-cubos separados por 12 Å.

La rubredoxina tiene un átomo de Fe rodeado tetraédricamente por 4 átomos de azufre, aunque la baja resolución de los rayos X no eliminan la posibilidad de un achatamiento del tetraedro. Muchos minerales de sulfuro de Fe tienen los átomos de S arreglados tetraédricamente alrededor de los átomos de Fe, por ejemplo:  $MFeS_2$  (M=K, Rb, Cs) que consiste de una cadena infinita de iones  $FeS_2$  formados de unidades repetidas  $FeS_4$  con el tetraedro unido por las -

esquinas opuestas. Recientemente, un complejo de coordinación de Fe con este medio ha sido caracterizado. Este compuesto es  $(\text{N}(\text{PMe}_2\text{S}))_2\text{Fe}(\text{II})$  que ha mostrado tener una estructura igual aunque no interacciona estéricamente, e impide adoptar el arreglo planar más común. Aunque este es un caso donde la solución directa del problema fué obtenida - desde un modelo preparado anteriormente, es interesante notar que ambos, la rubredoxina reducida y su modelo poseen - la banda de absorción del espectro IR cercano esperada para un medio tetraédrico del Fe(II). La alta energía de la banda para la enzima ha sido explicada sobre las bases de ligandos fuertes, sin embargo, un achatamiento del tetraedro puede producir un efecto similar. Se ha propuesto que las dos emisiones observadas a 365K y 311K en el espectro Raman de la rubredoxina son la forma alargada de Fe-S, y se hicieron comparaciones con las bandas a 360K y 303K del espectro de  $\text{KFeS}_2$ .

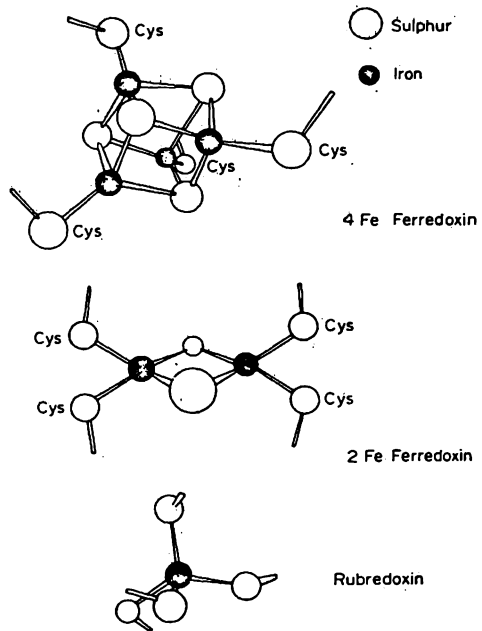


Figura 54. Estructura de los centros ferredoxina 4Fe-4S, 2Fe-2S y del centro rubredoxina 1Fe.

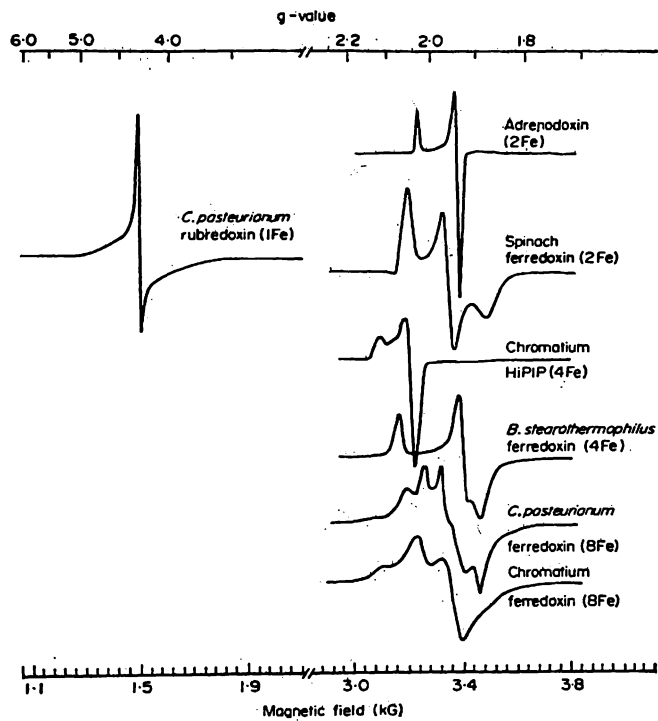


Figura 55. Espectro EPR representativo de las proteínas Fe-S.

TABLE VI. Propiedades de Proteínas Representativas de Azufre-Fierro.

	Active Group (atoms/molecule)	Molecular Weight	No. of Amino Acids	Redox Potential (E <sub>0</sub> in mV)
4Fe + 4S center				
8Fe ferredoxins				
<i>Clostridium</i> (obligate anaerobic bacterium)	8Fe, 8S	6,000	55	-395
<i>Chlorobium</i> (green photosynthetic bacterium)	8Fe, 8S	6,000	60	—
<i>Chromatium</i> (red sulfur photosynthetic bacterium)	8Fe, 8S	10,000	81	-490
<i>Rhodospirillum rubrum</i> I (red non-sulfur photosynthetic bacterium)	8Fe, 8S	13,000	—	—
<i>Azotobacter</i> III (aerobic N <sub>2</sub> fixing bacterium)	8Fe, 8S	15,000	130	-420
Ferredoxins with (8Fe + 8S) have also been reported in: <i>C. pasteurianum</i> , <i>C. acidivorax</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. tartarivorum</i> , <i>C. tetanomorphum</i> , <i>C. thermosaccharolyticum</i> , <i>Peptococcus acrogenes</i> , <i>Peptostreptococcus elsdenii</i> , <i>Veillonella alcalescens</i> .				

TABLA VI. Continuación

	Active Group (atoms/molecule)	Molecular Weight	No. of Amino Acids	Redox Potential (E <sub>0</sub> ' in mV)
<b>4Fe ferredoxins</b>				
<i>Desulfovibrio</i> (anaerobic SO <sub>4</sub> reducing bacterium)	4Fe, 4S	6,000	56	-330
<i>Bacillus</i> (facultative N <sub>2</sub> fixing bacterium)	4Fe, 4S	8,000	78	-380
<b>4Fe HiPIP</b>				
<i>Chromatium</i>	4Fe, 4S	9,650	86	+350
Ferredoxins with (4Fe + 4S) have also been reported in <i>B. polymyxa</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>Spirochaeta aurantia</i> , spinach chloroplast membrane, <i>D. gigas</i> , <i>D. desulfuricans</i> , <i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>monas</i> . High-potential iron-sulfur protein has been reported in <i>Rhodospseudo-</i>				
<b>2Fe + 2S center</b>				
<b>2Fe ferredoxins</b>				
Spinach (higher plant)	2Fe, 2S	10,600	97	-420
<i>Microcystis</i> (blue-green alga)	2Fe, 2S	10,300	98	—
<i>Scenedesmus</i> (green alga)	2Fe, 2S	10,600	96	—
<i>Azotobacter</i> I (aerobic N <sub>2</sub> fixing bacterium)	2Fe, 2S	21,000	181	-350
<i>Pseudomonas putida</i> (aerobic bacterium)	2Fe, 2S	12,500	114	-240
<i>E. coli</i> (aerobic bacterium)	2Fe, 2S	12,600	—	-360
Pig adrenals (mammal)	2Fe, 2S	12,500	115	-270
Mitochondria, complex III (mammalian)	2Fe, 2S	30,000	—	+280
Ferredoxins with (2Fe + 2S) have also been reported in: <i>Aethusa</i> , <i>sica</i> , <i>Botrydiopsis</i> , <i>Bumilleriopsis</i> , <i>Chenopodium</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>locasia</i> , <i>Cyanidium</i> , <i>Cyperus</i> , <i>Datura</i> , <i>Equisetum</i> , <i>Euglena</i> , <i>Gossyp-Phaseolus</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Pinus</i> , <i>Pisum</i> , <i>Polystichum</i> , <i>Porphyrid-Zea</i> , pig adrenals, pig testes.				
<i>Agrobacterium</i> , <i>Amaranthus</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anacystis</i> , <i>Aphanathece</i> , <i>Bras-Chlorella</i> , <i>Cladophora</i> , <i>Clostridium</i> (azoferredoxin and EPR protein), <i>Cop-pium</i> , <i>Laminum</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Medicago</i> , <i>Navicula</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Petroselinum</i> , <i>ium</i> , <i>Porphyra</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Sambucus</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Stelluria</i> , <i>Tolypothrix</i> ,				
<b>1Fe center</b>				
<b>1Fe rubredoxin</b>				
<i>Clostridium</i>	1Fe	6,000	54	-60
Rubredoxins have also been reported in: <i>Chloropseudomonas ethyl-sulfuricans</i> , <i>Desulfovibrio gigas</i> , <i>Peptococcus aerogenes</i> , <i>Peptoco-</i>				
<i>ica</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium stricklandii</i> , <i>Desulfovibrio dec-icus glycinophilus</i> , <i>Peptostreptococcus elsdenii</i> , <i>Pseudomonas oleovorans</i> .				
<b>Complex Fe-S proteins</b>				
Mitochondrial succinate dehydrogenase (mammalian)	8Fe, 8S, 1FAD	97,000	—	—
		(dimer)		
Mitochondrial NADH dehydrogenase (mammalian)	28Fe, 28S, 1FMN	—	—	—
Xanthine oxidase (milk, bacteria)	8Fe, 8S, 2FAD, 2Mo	275,000	—	-343 and -303
Nitrogenase ( <i>Clostridium</i> or <i>Klebsiella</i> ): molybdenum iron protein	18 or 24Fe, 18 or 24S, 2Mo	220,000	—	-60 and -280



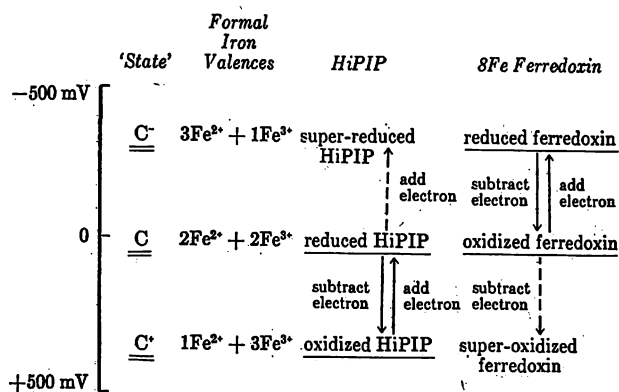


Figura 56. Los tres estados hipotéticos de los potenciales de oxi-reduc de la transferencia de electrón en los centros activos 4Fe-4S de ferredoxinas y HiPIP. Los potenciales difieren en un rango de 1-V.

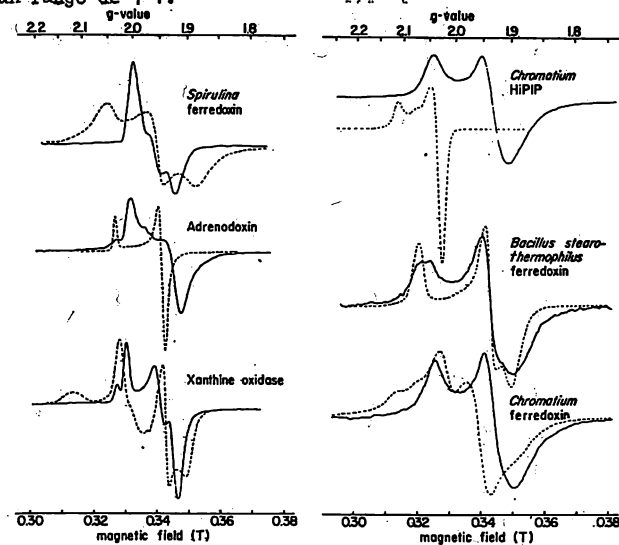


Figura 57. Efecto del dimetilsulfoxido 80% sobre proteínas reducidas de Fe-S (...), y naturales (—). Centros 2Fe-2S (izquierda); centros 4Fe-4S (derecha).

## V

## GRUPO DE LOS SIDEROFOROS

Practicamente todas las especies microbiales aeróbicas críticamente examinadas presentan excreción de sideroforos. Estos compuestos son llamados también, transportadores de Fe y siderocromos, pero fué primero Lankford quien propuso el nombre de sideroforo y es preferido, ya que sugiere la función y es consistente con la terminología usada para los agentes complejos de cationes metálicos alcalinos, los ionoforos. Sin embargo, en contraste con lo anterior, el papel natural de los sideroforos ha sido establecido con un gran esfuerzo por la rigurosa metodología de la bioquímica genética.

Los sideroforos son agentes quelatos de bajo peso molecular que son producidos por microbios y están involucrados en el transporte de Fe en la célula. Los sideroforos son todos ligandos quelatos, que forman complejos octaédricos extremadamente estables con los iones férricos de alto espin. Los átomos ligandos al átomo de Fe en los sideroforos son oxígenos, excepto en micobactina, donde un nitrógeno heterocíclico participa uniéndose al Fe. Dos clases importantes de estos compuestos, los ferricromos y las ferrioxaminas, son ácidos trihidroxámicos los cuales (excepto para aquellos que tienen substituyentes cargados) forman complejos neutros usando tres mono aniones hidroxamato bidentados. Estos complejos de Fe(III) son todos cinéticamente lábiles. También los grandes ligandos hexadentados como los ferricromos encierran completamente al ion férrico en una cavidad octaédrica, tienen una velocidad de cambio del orden de varios minutos a condiciones fisiológicas de pH y temperatura. En contraste complejos en los cuales el ion crómico es substituido por el ion férrico, aunque la estruc

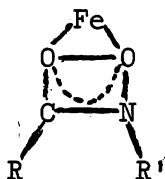
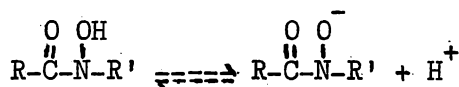
tura siga siendo la misma, son cinéticamente inertes. Esto ha sido demostrado para modelos de complejos hidroxamato, -desferriferricromos y ferrioxaminas. Se han usado en estudios de transporte de Fe varios de estos complejos cinéticamente inertes.

Otro grupo funcional como ligando común descubierto en los sideroforos es el catecol (o- dihidroxibenceno).- El catecol es similar a los hidroxamatos como ligando bidentado ya que coordina a través de dos átomos de oxígeno, pero es un dianión. Excepto por la sensibilidad al oxígeno - de los complejos de catecol (porque fácilmente se oxida el ligando) estos son muy similares en propiedades cinéticas y espectroscópicas a los complejos hidroxamato.

#### Estructura y Propiedades de los Complejos Férricos de Sideroforos.

Química General de los Quelatos de Fierro. La química acuosa del Fe(III) es dominada por los ácidos de Lewis. Algunas unidades de pH abajo de las soluciones fisiológicas, se efectúan hidrólisis y reacciones de polimerización del ion férrico. A pH fisiológico el ion férrico es cuantitativamente insoluble como hidroxilo. El  $K_{sp}$  para Fe(OH)<sub>3</sub> es  $2 \times 10^{-39}$ , mientras el  $K_{sp}$  para el Fe(OH)<sub>2</sub> es  $2 \times 10^{-16}$ . Las consecuencias biológicas de estos números son profundas, porque desde entonces este planeta produce una atmosfera oxidante, la última fuente de Fe para todos los sistemas biológicos ha sido el Fe(III) inorgánico. También, la complejación del ion férrico no es siempre suficiente para hacer usada por los sistemas biológicos, entonces la hidrólisis de tales complejos frecuentemente produce polímeros de puente hidroxi de alto peso molecular que su transporte al cruzar las membranas de la célula es imposible.

Durante los últimos 10-15 años un número de compuestos de bajo peso molecular de origen natural han sido descubiertos que unen específicamente Fe(III) y lo transportan en los sistemas biológicos. Muchos, si no es que todos los compuestos de este tipo, incluyen hidroxamatos o grupos fenolatos como ligandos. Por pérdida de un protón, el anión es un agente quelato muy fuerte con una asombrosa especificidad por el  $\text{Fe}^{3+}$ . La química general de los ácidos hidroxámicos forma una parte de la química orgánica clásica. La reacción con el ión férrico es una prueba estándar para el grupo funcional hidroxamato. La disociación ácida de los ácidos hidroxámicos da pKas típicos del orden de 9.- La reacción siguiente, con el ion férrico da un anillo de -



Complejo Hidroxamato Férrico

Fig. 58

cinco miembros muy estable. A pH muy ácidos, tres ácidos hidroxámicos se unirán para formar un complejo octaédrico neutro de  $\text{Fe}^{3+}$ . Las constantes de formación hasta para el sencillo ácido monohidroxámico tienen una completa especificidad por el  $\text{Fe}^{3+}$ . Para el ácido acetohidroxámico ( $\text{R}=\text{CH}_3$ ,  $\text{R}' = \text{H}$ ) el  $\text{pK}_a$  es 9.35 y los logaritmos de las constantes de formación  $\log K_1$ ,  $\log K_2$ , y  $\log K_3$  del paso clave son 11.42, 9.68, y 7.2 para un mecanismo de constantes de formación  $\log \beta_3$ , del complejo tris de  $2 \times 10^{28}$ . En contraste, el mecanismo de -

constantes de formación,  $\beta_2$ , para el complejo bis del ion ferroso es sólo de  $3 \times 10^4$ . Esta sensibilidad es causada más por el tamaño del ion que su carga y pueden ser observados en los valores de  $\beta_3$  para el complejo de tris  $\text{Al}^{3+}$  ( $3 \times 10^{21}$ ) y el  $\text{La}^{3+}$  ( $8 \times 10^{11}$ ). La gran disparidad entre la fuerza de complejación de los ácidos hidroxámicos por el  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  probablemente es la propiedad más importante para el transporte de Fe, puesto que la reducción del complejo férrico dentro de la célula proporciona una forma efectiva de liberar el Fe acomplejado y dejar al ligando libre para otro transporte de  $\text{Fe}^{3+}$ .

Las estabilidades de los complejos ácidos trishidroxámicos naturales son las más conocidas. Por ejemplo, el muy poderoso y usado quelato hexadentado EDTA tiene un logaritmo de constante de formación K de 25.1, mientras que para desferriferrocromo (fig. 59) es 29.1 y desferriferrioxamina E (fig. 60) es 32.4. Los complejos tris (hidroxamatos) típicos son solubles en agua y son compuestos neutros. En todos estos compuestos el fierro está en el estado de Fe (III) de alto espín, en contraste con el fierro de las proteínas heme, que es rápidamente cambiado. Esta labilidad es, desde luego esperada para complejos de alto espín  $d^5$ , aunque la cinética de cambio para estos ligandos hexadentados es mucho más lenta, que por ejemplo, complejos tris bidentados. El ion férrico puede ser removido del complejo de los ácidos trihidroxámicos tratándolos con base diluida o por reducción del Fe(III) a Fe(II).

La estructura del sencillo complejo hidroxamato tris (benzohidroxamato) Fe(III) ( $R=\text{C}_6\text{H}_5$ ,  $R'=\text{H}$  fig. 58) ha mostrado la forma cristalina más estable del sólido por ser el isómero racémico cis. (La convención para símbolos de configuraciones absolutas  $\Delta$  y  $\Lambda$  son aquellos propuestos por la IUPAC). El isómero cis es definido como el que tiene sime-

tría en el  $C_3$ . Desde luego, ambos isómeros cis y trans del complejo crómico han sido aislados, las geometrías similares de los compuestos férricos y crómicos puede indicar que los complejos cis y trans férricos probablemente están en solución en aproximadamente la misma proporción (60%, 40% - respectivamente) y predomina el isómero cis que es el que cristaliza. En los complejos férricos, la rápida isomerización de los complejos en solución de este modo produce exclusivamente la cristalización del isómero cis.

Muchos de los ácidos hidroxámicos naturales tienen tres grupos de ácido hidroxámico por molécula. Los complejos de Fe de estos ácidos trihidroxámicos tienen una banda ancha característica de absorción a 420-400 nm. y de esta forma originalmente les dieron el nombre genérico de siderocromos. Los tres grupos hidroxamatos son semejantes a cualquiera de las ramas laterales de un péptido cíclico (como en los ferricromos, fig.59) o como parte de una cadena lineal o cíclica (como en la ferrioxamina, fig.60). Aquellos que estimulan el aumento de la actividad fueron llamadas sideraminas y aquellas que son antibióticos fueron llamadas sideromicinas.

Los Sideroforos que Tienen Hidroxamatos. Ferricromos y Ferrioxaminas. Los ferricromos son todos ácidos trihidroxámicos producidos por hongos como *Ustilago sphaerogena*. Las ferrioxaminas son producidas por varias especies de *Nocardia* y *Streptomyces*. En contraste a los ferricromos, las ferrioxaminas son lineales y cíclicas (fig. 60) tienen los tres grupos hidroxamatos como parte de una cadena poliámidica equivalente a una cuenta de un rosario. Otra diferencia mayor es que los ligandos de las mismas no son ópticamente activos. Sólo si un grupo substituyente tiene un centro óptico, como en las ferrimicinas, que hay actividad óptica en la molécula. Los ferricromos tienen una activi-

dad óptica natural asociada con el ligando, excepto en aquellos casos donde el ligando es ópticamente inactivo (en tal caso los complejos son mezclas racémicas), los complejos siderocromos anteriores se ha descubierto que tienen una configuración absoluta  $\wedge$  cis (fig. 59). Así, mientras ferrioxamina E es racémica, análisis estructurales de rayos X de ferricromo A y ferricrisina han mostrado ambas tener isómeros  $\wedge$  cis. Un análisis estructural reciente de la mezcla de sideroforo imida  $\beta$  fenol hidroxamato producida por la bacteria micótica, micobactina, ha mostrado que la micobactina férrica también tiene configuración absoluta  $\wedge$  cis. Las otras propiedades físicas de los ferricromos han sido estudiadas usando varias técnicas. El espectro de NMR de los derivados de Al (III) y Ga(III), comparados con los ligandos libres han mostrado un profundo cambio de conformación que acompaña a la formación del complejo.

Sin embargo, a pesar de las grandes diferencias en la estructura molecular de los ligandos, todos los sideroforos hidroxamatos cuyas estructuras han sido determinadas por los datos, se ha descubierto que son complejos cis con una geometría de coordinación del ion férrico que es substancialmente idéntica a la del complejo simple tris (benzihidroxamato)-Fe(III). Así, mientras la ferrioxamina E es racémica pero con geometría cis, análisis estructurales de rayos X de ferricromo y ferricrisina han mostrado ambas ser isómeros  $\wedge$  cis.

Los Sideroforos que tienen Catecol.- Enterobactina. La aislación y caracterización del triéster cíclico 2,3-dihidroxi-N-benzoil-1-serina, un sideroforo triccatecol, fué reportado independientemente por Pollack y Neilands, y O'Brien y Gibson. Los ligandos fueron aislados de cultivos Salmonella typhimurium y Escherichia coli y les dieron los nombres de enterobactina y enteroquelina respectivamente. -

La enterobactina es un agente eficiente en el transporte celular, pero a diferencia del ferricromo, la liberación intracelular del fierro implica hidrólisis enzimática de la enterobactina a el monómero 2,3-dihidroxi-N-benzoil-L-serina.

Puede observarse desde modelos moleculares que dos diastereoisómeros son posibles para el complejo de enterobactina férrica  $\Lambda$  cis y  $\Delta$  cis. No hay imágenes en el espejo por la actividad óptica de los ligandos. La similitud de las funciones de los ferricromos y enterobactina prestan un interés adicional especulativo por la configuración absoluta probable del complejo de Fe. Los estudios estructurales de los complejos tris-catecol y las propiedades espectroscópicas del complejo enterobactina crómica han conducido a una asignación de la geometría para el isómero más estable del complejo enterobactina férrica (fig. 62).

Cambio del Ion Férrico por el Ion Crómico en Sideroforos.

Sideroforos Hidroxamato. Isómeros Geométricos. - Muchas de las preguntas en cuanto a la relación estructura-función de los sideroforos no pueden ser contestadas con detalle por la labilidad cinética de estos complejos de alto-spin Fe(III). Esta labilidad siempre deja ambigüedades, por ejemplo, si ó no ocurre el transporte del metal vía el complejo molecular intacto. Sorprendentemente la química de coordinación de los ligandos sideroforos con otros iones metálicos aparte del ion férrico, fué muy desconocida. (Hasta la aparición de un reporte muy breve del espectro CD del complejo desferriferricrisina de Cr(III). Sin embargo, el complejo aparentemente no fué aislado, y el espectro CD no fué interpretado). De esta forma se empezó a investigar la geometría de coordinación de los ligandos sideroforos o cualquier mitad de ligando con iones metálicos trivalentes-



cinéticamente inertes como el Co(III) y Cr(III). Desde luego, los ácidos hidroxámicos son ligandos asimétricos bidentados, y tienen ambas isomerías, geométrica y óptica en complejos tris (hidroxamato). Como anotamos al principio para un complejo octaédrico formado con tres aniones hidroxamato equivalentes, ópticamente activos, hay dos isómeros geométricos posibles, cis y trans. Cada isómero geométrico consiste de un isómero óptico  $\wedge$  y otro  $\Delta$ . Con frecuencia, estos son diastereoisómeros por la actividad óptica del ligando, en tal caso hay cuatro isómeros posibles,  $\wedge$  cis,  $\wedge$  trans,  $\Delta$  cis, y  $\Delta$  trans.

Investigaciones exploratorias preliminares se dirigieron hacia la preparación y caracterización de los complejos de Cr (III) ó Co(III). Estos con iones metálicos de bajo espín  $d^3$  y  $d^6$  respectivamente, que tienen las posibilidades mayores de energía de estabilización de campo ligando y por lo tanto son cinéticamente inertes en cuanto a sustitución de ligando y reacciones de isomerización. Esto es - en contraste a los iones férricos de alto espín  $d^5$  que tienen una energía de estabilización de campo ligando de cero. Así, en contraste al complejo sideroforo férrico, complejos substituidos con iones crómicos o cobálticos deben ser cinéticamente inertes.

Modelo de Complejos Hidroxamato. El intento de preparar el complejo tris (hidroxamato)-Co(III) con ácido benzohidroxámico o su derivado N-metilo, resulto en la oxidación del ligando acompañado de la reducción del Co(III) a Co(II). La preparación del tris (benzohidroxamato)-Cr(III),  $\text{Cr}(\text{benz})_3$ , fue afortunada y resulto en la separación y caracterización de sus isómeros geométricos. La vida media para la isomerización de estos complejos a condiciones fisiológicas apróximadas es del orden de horas. Para facilitar la separación de los cuatro isómeros ópticos del comple

jo modelo simple tris (hidroxamato)-Cr(III), fué preparado (usando 1-mentol como substituyente) el ácido hidroxámico - ópticamente activo, N-metil-1-mentoxiacetihidroxámico (men). Esto resultó en la separación de los dos diastereoisómeros - cis del tris (N-metil-1-mentoxiacetihidroxamato)-Cr(III) de los diastereoisómeros trans y de sus propiedades por espectro de absorción electrónica y CD.

En la cromatografía de capa delgada del complejo tris (benzohidroxamato)-Cr(III) resultaron dos bandas verdes, correspondientes a los isómeros trans y cis, cuyos valores  $R_{st}$  de dilución precisan a una de las bandas anchas café-rojizas del complejo de Fe(III). Como justamente se ha descrito, los isómeros geométricos del complejo de Fe(III) - se encuentran en solución en un equilibrio rápido, y como - un resultado, la mezcla de estos isómeros aparece como una banda con un valor  $R_{st}$  que es un peso promedio de los dos - isómeros individuales.

Los complejos tris (N-metil-1-mentoxiacetihidroxamato)-Cr(III), y el de Fe(II), con los de Cr(men)<sub>3</sub> y Fe(men)<sub>3</sub> también fueron purificados por cromatografía de capa delgada. El complejo de Fe da una banda ancha café-rojiza, cuyo valor de dilución  $R_{st}$  es precisado por la banda verde azul de los isómeros cis y trans del complejo de Cr(III). Como con el complejo tris (benzohidroxamato) esta conducta es causada por el equilibrio rápido de los complejos férricos cinéticamente lábiles.

Los isómeros de Cr(men)<sub>3</sub>, isomerizan con vidas medias de varias horas igualmente que los complejos de Cr(benz)<sub>3</sub>. La velocidad de isomerización de los complejos tris (hidroxamato) por lo tanto, no es sensible particularmente a la substitución de los átomos de nitrógeno del hidroxamato, desde luego el ligando "men" tiene un átomo ni-

trógeno alquilado. En la ausencia de una fuerza inductora, los complejos sideroforos correspondientes deberán isomerizarse muchos más lentamente por las contracciones estéricas de los ligandos.

Aunque cuatro disteroisómeros ( $\Lambda$ -cis,  $\Lambda$ -trans,  $\Delta$ -cis,  $\Delta$ -trans) son esperados para el  $\text{Cr}(\text{men})_3$ , en la cromatografía de capa delgada de los complejos producidos sólo aparecen tres bandas verde=azul. Dos de estas son las resueltas para los isómeros  $\Lambda$ -cis (10%) y  $\Delta$ -cis (21%), y la tercera (69%) es una mezcla sin resolver de los isómeros  $\Lambda$ -trans (31%) y  $\Delta$ -trans (8%).

Otra diferencia importante entre los iones férricos y crómicos son sus propiedades espectroscópicas. Desde luego, los iones férricos son iones de alto espín  $d^5$  en los complejos sideroforos, no hay transición electrónica d-d de espín permitido. Así, los espectros de absorción visible--UV de los sideroforos no son todos causados por los centros cromoforos del metal sino también por las transiciones metal-ligando y ligando-ligando (grandes transferencias de carga) que varían enormemente de un compuesto a otro, aunque la coordinación geométrica del  $\text{Fe}(\text{III})$  puede ser la misma. En contraste, complejos octaédricos (o aproximadamente-octaédricos) de  $\text{Cr}(\text{III})$  tienen dos bandas de absorción d-d bien establecidas que son localizadas sobre el cromoforo metálico y así son insensibles a cambios en el complejo metal ligando que están fuera de la esfera de coordinación inmediata del metal.

Complejos Ferricromos Crómicos. El espectro para el modelo de complejos hidroxamato crómicos se reproduce en la figura 63. Desde luego, el espectro visible y CD de los isómeros son totalmente dominados por el cromoforo metálico del complejo, este dato puede ser usado para caracterizar y

para identificar isómeros de coordinación de complejos formados por los sideroforos. La preparación y caracterización de los complejos crómicos de desferriferricromo han sido reportados. Aunque un examen de los modelos moleculares para ambos complejos muestra que dos isómeros de coordinación son posibles ( $\wedge$  cis,  $\Delta$  cis), ambos complejos crómicos consisten exclusivamente del isómero  $\wedge$  cis. Este resultado concuerda con investigaciones cristalográficas de rayos X de ferricrisina y ferricromo A que demuestran que cristalizan únicamente como el isómero  $\wedge$  cis. Los dos complejos crómicos tienen idéntico espectro CD el cual es el mismo que el del espectro  $\wedge$  cis  $\text{Cr}(\text{men})_3$  (fig. 63).

Complejos Ferrioxaminas Crómicas. La preparación y caracterización de los complejos crómicos de ferrioxamina B (fig. 60) han sido reportadas. Un examen de modelos moleculares, mostrado en la figura 64 describe cinco isómeros geométricos posibles (uno cis y cuatro trans). Cada uno de estos isómeros existe como una mezcla racémica, y se lleva a cabo la separación de los isómeros geométricos cis. Una segunda fracción fué aislada, la cual consiste de uno o más isómeros trans. Los isómeros geométricos fueron asignados sobre la base de sus espectros visible y UV (fig. 65) los cuales están superpuestos sobre aquellos de los complejos cis y trans de  $\text{Cr}(\text{men})_3$  (Fig. 63).

Los dos isómeros geométricos cis y trans de la isomerizada ferrioxamina B crómica en soluciones en equilibrio con vidas medias de varios días a un rango de temperatura. Estos son considerablemente más lentos que los encontrados para los complejos tris (hidroxamato) como  $\text{Cr}(\text{men})_3$  y son causados por las contracciones estéricas del ligando ferrioxamina B y su quelación hexadentada.

Sideroforos Catecolato. Complejos Catecol Simples.

Como anotamos anteriormente, los sideroforos comunes de bacterias entéricas son los triccatecol, enterobactina (fig. 61). En orden hacia una síntesis perfecta y para usar técnicas de separación con pequeñas cantidades de enterobactina útil, complejos de catecol simples fueron preparados como compuestos modelo. Datos espectroscópicos de estos compuestos modelo pueden ser usados en el señalamiento de geometrías para isómeros enterobactina. La literatura química anterior de complejos tris (catecol) de iones metálicos de transición es clave. La sola referencia reportada de un complejo crómico que fue rápidamente hidrolizado en solución diluida acuosa. Esto, de hecho, pudo impedir una pista de separación de los isómeros ópticos del tris quelato. Nunca antes estos complejos fueron reinvestigados, antes de preparar el complejo enterobactina crómica. Se descubrió que los complejos son muy estables en la ausencia de oxígeno. La usual sensibilidad del dianión catecol al oxígeno se descubrió que se incrementaba substancialmente en el complejo de cromo. (La fácil oxidación del catecol coordinado y de ligandos conexos ha sido demostrada para una serie de complejos metálicos ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  etc.) por Holm y colaboradores en relación al análogo 1,2 bencenoditiolato). Esta oxidación del complejo de cromo es la que causa el cambio de color de verde a rojo que se reporto previamente como hidrólisis. Todas las preparaciones y manipulaciones del complejo catecol de cromo se llevaron a cabo en condiciones de atmosfera inerte.

Aunque únicamente resoluciones parciales de soluciones de  $(\text{Cr}(\text{cat})_3)^{3-}$  fueron conseguidas a pH neutro, resoluciones completas se alcanzaron a pH 13 y a 5°C. La velocidad de pérdida de actividad óptica para el  $(\text{Cr}(\text{cat})_3)^{3-}$  resuelto, se encontró que dependía de la fuerte concentración del ion hidrógeno, variando la vida media desde varios minutos a horas entre pH de 7 a 13.

Comparación con Enterobactina Crómica. Los espectros visible y CD del  $(Cr(cat)_3)^{3-}$  y  $(Cr(enterobactina))^{3-}$  se muestran en las figuras 66 y 67. Los espectros de absorción son similares excepto por la transición del ligando localizado que ocurre a baja energía en el complejo enterobactina, y así enmascara la transición d-d  $4A_{2g} \rightarrow 4T_{1g}$  (para simetría  $D_h$ ), que aparece como un borde en la transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  más interna del ligando. Esto es aparentemente causado por el hecho que la enterobactina tiene anillos catecol substituidos en la posición orto por un grupo acilo.

Así, los espectros visible y UV de  $(Cr(cat)_3)^{3-}$  y  $(Cr(enterobactina))^{3-}$  son también diferentes para permitir comparaciones detalladas y predicciones confiables de estructura. Sin embargo, hay una situación diferente encontrada en la comparación del espectro CD del  $(Cr(cat)_3)^{3-}$  y  $(Cr(enterobactina))^{3-}$  y esta es que son substancialmente idénticos (fig. 67). Esto es porque la interferencia de la banda de transferencia de carga no está asociada con el centro cromoforo y entonces no contribuye a la actividad óptica.

La estructura molecular y cristalina de una sal de  $(Cr(cat)_3)^{3-}$  y la conocida configuración absoluta del  $(Cr(cat)_3)^{3-}$  dan los siguientes señalamientos: el isómero predominante de los complejos monoméricos de enterobactina-crómica tiene una configuración absoluta  $\Delta$  cis (fig. 62). La similitud de los complejos férricos y crómicos permite estos señalamientos por estar hechos para el complejo férrico también. Esto es la configuración absoluta opuesta del otro sideroforo ópticamente activo caracterizado por los datos. La configuración absoluta opuesta de enterobactina-crómica y ferricromo crómico, puede verse claramente en comparación de sus espectros CD (fig. 67). El papel de los sideroforos como permeasas celulares por el ion férrico en

consecuencia no depende siempre del complejo el que tenga una configuración  $\Lambda$  cis, aunque esta configuración u otras pueden ser específicamente transportadas en sistemas individuales microbio-ligando.

La estructura molecular de la enterobactina no ha sido establecida por técnicas de difracción y aunque la coordinación del ion férrico en la enterobactina previamente ha sido supuesta que es un complejo octaédrico que involucra sólo a las mitades de los ligandos catecol, evidencias estructurales poco firmes fueron utilizadas para esto. Además, el uso de Cr(III) en lugar de Fe(III) para facilitar los estudios de transporte de complejos siderocromos ópticamente activos han sido justificados sobre la base de que cada complejo puede ser isoestructural. El Fe(III) y Cr(III) de alto espín tienen aproximadamente  $0.03 \text{ \AA}$  de diferencia en radio iónico uno del otro pero la energía de estabilización de campo cristal (CFSE) para el complejo crómico ( $12 Dq$ ) es considerablemente mayor que para el ion férrico de alto espín ( $0 Dq$ ). Cualquier cambio del complejo crómico de la coordinación octaédrica hacia la de prisma trigonal como se ve por la torsión del ángulo trigonal, puede ser atribuido a este efecto de campo cristal.

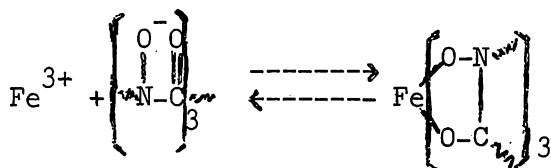
Geometría de los Complejos Catecol-Metal. Las geometrías de coordinación de  $(\text{Fe}(\text{cat})_3)^{3-}$  y  $(\text{Cr}(\text{cat})_3)^{3-}$  han sido determinadas por simples estudios de cristales de las sales  $\text{K}_3(\text{M}(\text{cat})_3) \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{M}=\text{Cr}, \text{Fe}$ ) en orden para explorar el efecto de campo cristal del ión crómico en la geometría de coordinación e indirectamente para determinar la geometría de coordinación de la misma enterobactina.

Los complejos  $(\text{M}(\text{cat})_3)^{3-}$  (fig. 68) son distorsionados de la geometría octaédrica con aproximadamente  $D_3$  punto simétrico molecular. Los parámetros estructurales de -

los complejos tris (catecol) por los datos reportados son comparados en la tabla VII. El ligando se sujeta (la proporción de la distancia O-O del anillo a la distancia M-O), al ángulo torcido trigonal, y la distancia de plano a plano trigonal varía uniformemente a través de la tabla con incremento del radio iónico. La geometría final representa un balance entre la distorsión del ángulo O-M-O y la distancia O-O del anillo y variaciones de la torsión del ángulo desde el octaedro a el prisma trigonal. En comparación las estructuras del catecol crómico y férrico, la diferencia en la longitud de unión M-O no es lo suficientemente grande para causar la diferencia aproximada en grados de la torsión del ángulo. Esto debe ser atribuido a la diferencia en energía de estabilización de campo cristal ( $\Delta$  CFSE) entre las geometrías octaédrica y prisma trigonal. Aunque significativo en términos de la precisión de las determinaciones estructurales, los complejos férricos y crómicos son completamente cercanos en geometría para relacionarlos con los complejos similares sideroforos substituidos con cromo con idéntica estructura a los complejos férricos naturales con propósitos biológicos.

Constante de Formación del Catecolato-Férrico. - La alta afinidad por el ion férrico que todos los sideroforos demuestran es esencial para cualquier acción de obtención del Fe para los microorganismos que usan el ligando. - Este es siempre acompañado en un medio que también contiene muchos otros agentes complejantes para el ion férrico. Entonces una constante de formación muy alta para el complejo sideroforo es esencial para la supervivencia en el mundo competitivo de los microorganismos. Como se describió anteriormente, los sideroforos hidroxamatos tienen constantes de formación para las reacciones del tipo:



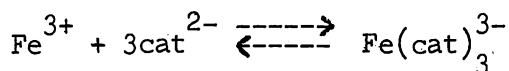


en el rango entre  $10^{30}$  y  $10^{32}$ . Estos valores son de dos a tres veces mayores en magnitud que los de las constantes de formación de los mecanismos,  $\beta_3$ , para los complejos tris - (monohidroxamato).

En contraste a los sideroforos hidroxamato, poco o nada es conocido de la constante de estabilidad para los sideroforos catecol enterobactina. Antes de determinar la constante de formación de la enterobactina (para lo cual la hidrólisis de los ligandos presentan un problema especial), la reacción del mismo catecol con el ion férrico ha sido investigada.

El catecol es un ácido muy débil y entonces a pH-bajos es un ligando pobre. La cinética y el equilibrio de sus reacciones con el ion férrico bajo condiciones ácidas - también se ha investigado. Bajo tales condiciones, igual - que con exceso de catecol, el ion férrico forma un complejo transitorio 1:1, que eventualmente sufre una reacción de oxido-reducción para dar el ion ferroso y ortoquinona como-productos. Esta reacción tiene un potencial de óxido-reducción mayor de cero a pH de 1. A pH altos la constante de formación es extremadamente grande del complejo tris catecol férrico e invierte fuertemente el potencial, cada ion ferroso reducirá ortoquinona a la forma del complejo tris catecol férrico. En ausencia de aire, los complejos tris catecol férrico y crómico son estables indefinidamente en solución acuosa básica.

La constante de equilibrio involucrada en la reacción:



fue determinada de la siguiente forma. Una solución acuosa de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $5.5 \times 10^{-3}$  M) y catecol ( $1.48 \times 10^{-2}$  M), inicialmente se hizo básica, con la adición de KOH, fué valorada con HCl 1.24 N en atmosfera libre de oxígeno a  $22^\circ\text{C}$  y potencial iónico (KCl) 0.16-0.22 M (fig. 69). La constante de disociación ácida para el catecol fué determinada independientemente (bajo condiciones experimentales similares) para ser  $\text{pK}_{a1} = 9.38$  y  $\text{pK}_{a2} = 13.28$  (todas las estabilidades y constantes de asociación mencionadas están corregidas por potencial iónico 0.1 M). Usando estas constantes y valores de literatura para las constantes de hidrólisis de Fe(III)- ( $\text{FeOH}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ ,  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ ), una gráfica clásica es la de Bjerrum de  $\log \beta$  contra  $\text{pL}$  que produjo valores aproximados de la constante de estabilidad metal-ligando. Mínimos cuadrados clasificaron la constante de estabilidad acumulativa que converge con los valores  $\log \beta_1 = 21.5$ ,  $\log \beta_2 = 36.6$  y  $\log \beta_3 = 45.9$ . La inclusión de la hidrólisis de Fe en la purificación del modelo primario afecto los valores calculados de  $\beta_1$ . La distribución de varias especies en solución como una función del pH se muestra en la figura 70.

La débil acidez del catecol hace esta constante de formación efectiva mucho menos de  $10^{45.9}$  aproximadamente a pH fisiológico. Sin embargo, un efecto quelato deberá tender hacer la constante de formación para enterobactina más grande para  $\beta_3$  de catecol. Así  $10^{45}$  puede ser considerado como una unión debil para la reacción  $\text{Fe}^{3+} + \text{ent}^{6-} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{ent})_3^{3-}$ .

## Resumen

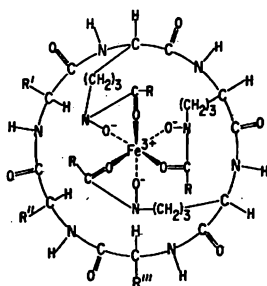
Este apunte se ha enfocado sobre la química de coordinación de los sideroforos con las siguientes conclusiones:

(1) Los complejos sideroforos substituidos con cromo pueden ser preparados, en contraste a los complejos férricos naturales y son cinéticamente inertes por isomerización o substitución del ligando.

(2) Los espectros visible y CD de los complejos sideroforos crómicos son muy parecidos a los espectros correspondientes de los modelos complejos de ligandos hidroxamatos o catecolatos. Estos proporcionan pruebas espectroscópicas para la estructura que indican la geometría de los complejos sideroforos.

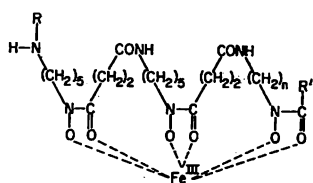
(3) La estructura y unión de los complejos férricos y crómicos (a pesar de sus diferencias en propiedades cinéticas) son suficientemente semejantes para considerarlos como idénticos para sistemas biológicos.

(4) Los sideroforos substituidos con cromo pueden ser usados para estudiar el mecanismo de transporte de Fe microbial. Estos estudios cuentan con la inactividad de los complejos crómicos y podrá ser imposible llevarlos a cabo usando otras técnicas o pruebas.



Siderochrome	R'	R''	R'''	R
Ferrichrome	H	H	H	CH <sub>3</sub>
Ferrichrysin	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	"	"
Ferricrocin	H	"	"	"
Ferrichrome C	"	CH <sub>3</sub>	"	"
Ferrichrome A	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>2</sub> OH	"	-CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H( <i>trans</i> )
Ferrirhodin	"	"	"	-CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH( <i>cis</i> )
Ferrirubin	"	"	"	-CH=C(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH( <i>trans</i> )
Albomycin B <sub>1</sub>	-CH <sub>2</sub> OSO <sub>2</sub> -N<img alt="Structure of a pyridine ring with a methyl group at the 2-position and a carbonyl group at the 3-position." data-bbox="395 405 455 445"/>	"	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>

Figura 59. Estructura de los ferricromos. La estructura básica es un hexapéptido cíclico con los tres ácidos hidroxámicos dispuestos en un tripéptido *N*-acil-  $\Delta$ -*N*-hidroxil-1-ornitina.



	R	n	R'
Ferrioxamine B	H	5	CH <sub>3</sub> -
Ferrioxamine D <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub> C(=O)-	5	CH <sub>3</sub> -
Ferrioxamine G	H	5	HO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
Ferrioxamine A <sub>1</sub>	H	4	HO <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -
Ferrimycin A <sub>1</sub>	<img alt="Structure of a substituted benzene ring with a hydroxyl group and a methyl group." data-bbox="225 735 335 765"/>	5	.CH <sub>3</sub> -

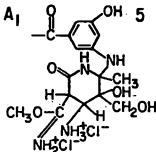


Figura 60. Estructura de las ferrioxaminas lineales.

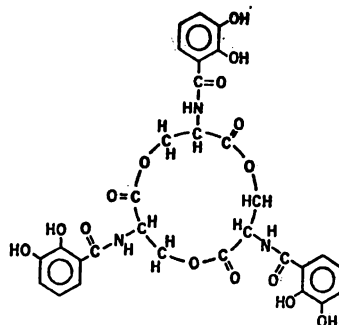


Figura 61. Diagrama estructural de enterobactina.

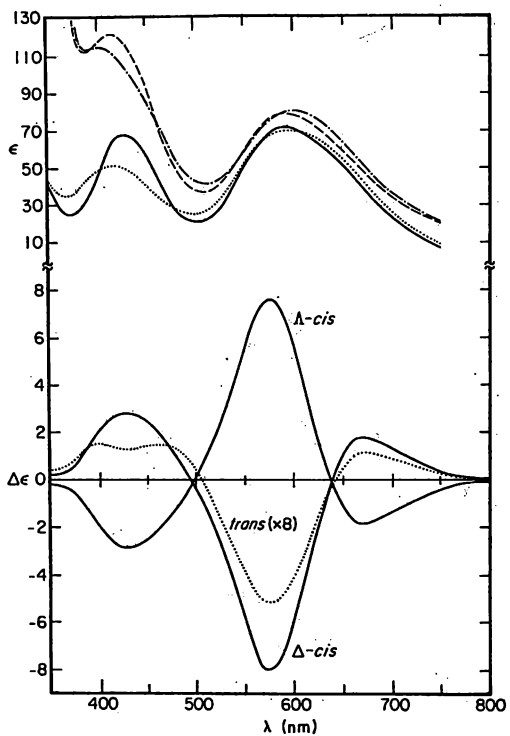


Figura 63. Espectro de absorción de  $\text{Cr}(\phi)_3$  en 17% de ETOH/cloroformo y espectro de absorción CD de  $\text{Cr}(\text{men})_3$  en la misma soluc. al 3%.

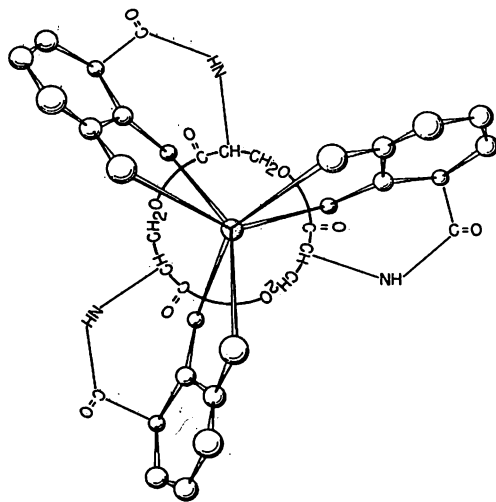


Figura 62. Esquema del isómero  $\Delta$  cis de la enterobactina férrica y crómica. El metal se apoya en el centro de un octaedro distorsionado formado por los átomos de oxígeno de los tres dianiones catecol.

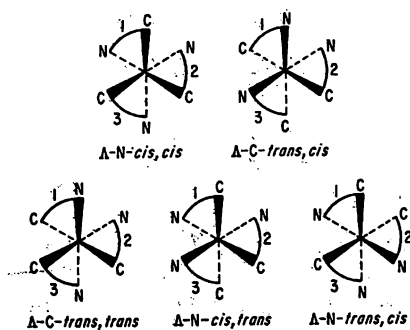


Figura 64. Geometría enantiomérica de los cinco isómeros de ferrioxamina B.

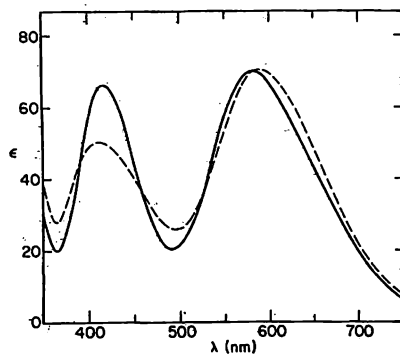


Figura 65. Espectro de absorción de los isómeros cis (—) y trans (---) de desferrioxamina B en  $\text{H}_2\text{O}$ .

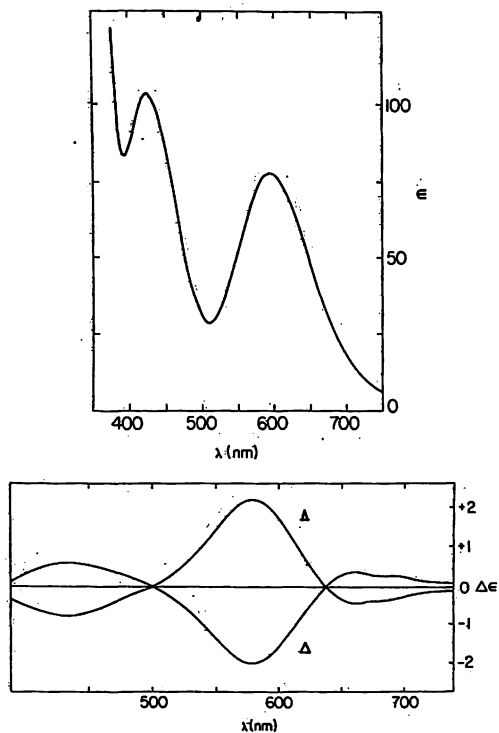


Figura 66. Espectro de absorción visible del  $\text{K}_3(\text{Cr}(\text{cat})_3)$  en agua (arriba). Espectro CD de las soluciones de  $\Delta$ - y  $\Lambda$ - $\text{K}_3(\text{Cr}(\text{cat})_3)$ .

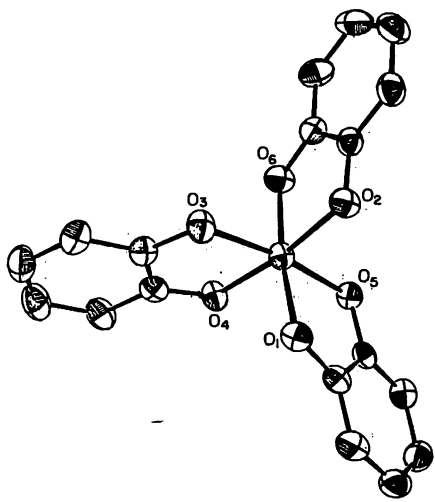


Figura 68. Una perspectiva molecular en el espacio del anión  $(M(O_2C_6H_4)_3)_3^-$ ,  $M = Cr, Fe$ .

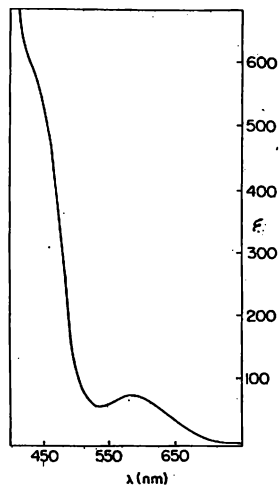


Figura 67. Espectro de absorción visible de  $(NH_4)_3(Gr(enterobactina))$  (arriba). Espectro CD de  $\Delta-(NH_4)_3(Gr(enterobactina))$  (—) y ferricromo cromo cromo ( $\bullet\bullet$ ) (abajo)

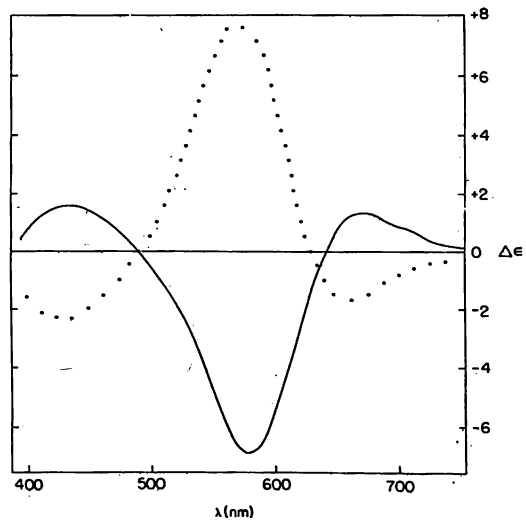


TABLA VII. Parámetros Estructurales para Complejos  $(M(cat)_3)^{n-}$

Charge, $n =$	$P^a$	$Si^b$	$As^c$	$Cr^d$	$Fe^e$
	1	2	1	3	3
Average M-O distance (Å)	1.723 (4)	1.784 (18)	1.843 (5)	1.986 (4)	2.015 (6)
Average ring O-M-O angle (°)	91.4 (2)	88.7 (2)	88.2 (5)	83.56 (14)	81.26 (7)
Average O-O ring distance (Å)	2.466 (6)	2.490 (6)	2.565 (7)	2.646 (6)	2.625 (2)
Ligand bite <sup>a</sup>	1.431	1.396	1.392	1.333	1.303
Trigonal twist angle (°) <sup>f</sup>	58.9	55.9 (5)	55.2 (10)	50.5 (6)	44.7 (10)
Plane-to-plane distance (Å) <sup>g</sup>	1.940	2.093	2.194	2.247	2.303

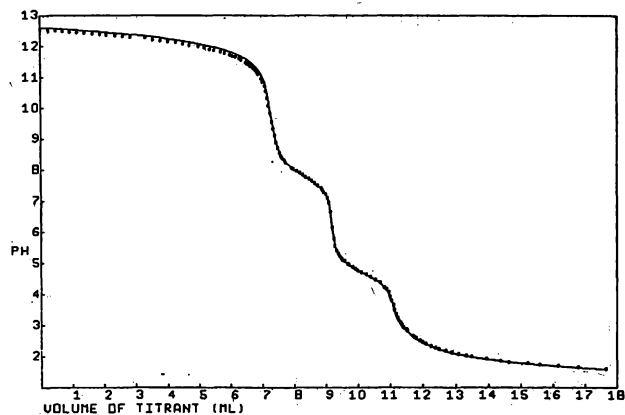


Figura 69. Curva de valoración. Solución básica de  $Fe^{3+}$  ( $5.5 \times 10^{-3} M$ ) y catecol ( $1.84 \times 10^{-2} M$ ) valorada con  $HCl$  1.24 M a  $22^\circ C$  en atmosfera libre de  $O_2$  (—).

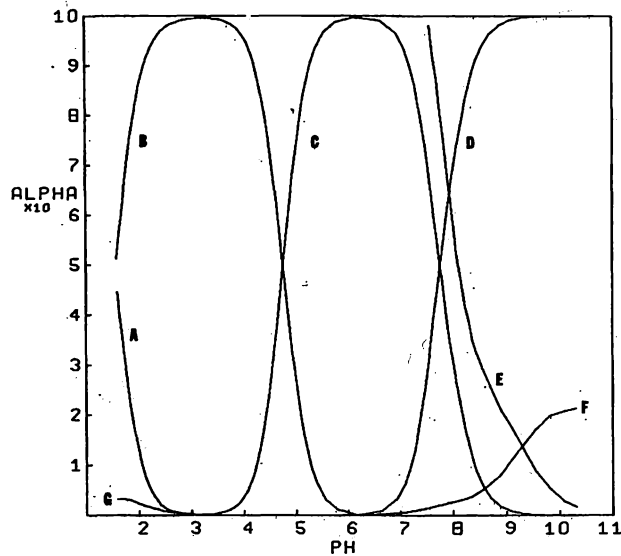


Figura 70. Curva de distribución, como una función de pH, de las especies formadas en la valoración de catecol-férrico.



## QUIMICA BIONIORGANICA DEL COBRE

### I

#### HEMOCIANINA

La hemocianina fué llamada de esta forma por el fisiólogo belga León Fredericq en 1878, cuando demostró que el color azul de la proteína era causado por la oxigenación del cobre que contiene la misma, la unión con el oxígeno se investigó en las especies de animales que tienen la hemocianina que son moluscos y artrópodos. Entre los artrópodos se encuentran los crustaceos decápodos (langostas, cangrejos, camarones) y entre los moluscos todos los cefalópodos (pulpos, calamares), sin embargo, en estas dos especies la distribución de hemocianina es muy variable. El caracol comestible "escargot" tiene gran cantidad de hemocianina, pero el de agua "dulce" Planorbis relativamente no tiene nada.

La hemocianina se encuentra en la sangre (sangre azul o de cobre). A diferencia de la hemoglobina de los vertebrados, no es confinada dentro de células especiales, pero existe como un soluto disuelto libremente. Su concentración puede ser apreciable en la sangre de algunos animales, por ejemplo, el pulpo y el cangrejo, pueden tener arriba de 10 g de hemocianina/100 ml. Esto es aproximadamente dos terceras partes de la concentración de hemoglobina en la sangre humana. Hay una profunda diferencia entre las hemocianinas de los moluscos y artrópodos. La primera contiene 0.25% de Cu en peso, y la segunda 0.17%.

El nombre es engañoso. La hemocianina a diferencia de la hemoglobina, no tiene grupos heme; el cobre está unido directamente a la proteína. La unión es fuerte; la -

constante de disociación para quitar el primer átomo de Cu- es del orden de  $10^{-20}$ . El sitio de la unión no es conocido, aunque por evidencias circunstanciales los grupos sulfhidrilos del amino ácido cisteína y los anillos imidazol de histidina han sido sugeridos como posible ubicación del metal.

El Cu en la hemocianina libre de oxígeno está en el estado de oxidación de  $1+$ . Hay varias evidencias de esto. Agentes quelantes específicos para  $\text{Cu}^+$  pueden cambiar al metal de la proteína y la actividad fisiológica de las moléculas de hemocianina puede ser reconstituida cuando la proteína a la que se le ha quitado el Cu se trata con iones cuprosos. En los espectros visibles y UV no hay bandas características del ion cúprico y no tiene señal de resonancia de espín electrónico que se hayan detectado en el pigmento deoxigenado (indicativo de configuración  $d^{10}$ ).

En la oxihemocianina, la situación es muy confusa. La biquinolina, un reactivo que da un complejo rosa con los iones cuprosos, reacciona con una mitad de Cu de la hemocianina, sugiriendo que la mitad del metal en el pigmento está como  $1+$  y el restante en el estado  $2+$ . En el espectro visible y UV hay bandas características de iones cúpricos que sugieren que un mínimo de Cu está en el estado de  $2+$ . Las dificultades aumentan en la interpretación del espectro de resonancia de espín electrónico. Los iones cúpricos tienen un número non de electrones debiendo mostrar una fuerte absorción ESR, sin embargo, soluciones frías preparadas de oxihemocianina no muestran tal absorción. La falta de una señal de ESR se atribuye a un acomplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de Cu de un dímero. También es probable que el metal es parte de un arreglo covalente ya que se comporta como tal, y recuerda a los iones cuprosos en algunas instancias y a los iones cúpricos en otras.

Las bandas de absorción del espectro visible de la oxihemocianina se encuentran a 700 ( $\epsilon$  75), 570 ( $\epsilon$  500), 440 ( $\epsilon$  65), y 347 nm ( $\epsilon$  8900). La forma de las bandas cerca de los 570 nm permite pocas dudas de que la oxihemocianina contiene Cu(II). El aumento en la intensidad de la banda de campo ligando sugiere un complejo dimérico de Cu(II). Por comparación con el dímero acetato Cu(II) tiene un aumento la intensidad de la banda de campo ligando y también tiene una banda extra cerca de los 370 nm. El origen de esta banda ha sido muy debatido pero una posibilidad es una excitación simultánea de un par electrónico (SPE). La banda intensa a 347 nm en la oxihemocianina puede tener un origen similar; más probablemente, con  $O_2^{2-}$  presente en el sitio de unión, podemos esperar una contribución muy grande en esta región que viene de la transferencia de carga  $O_2^{2-} \rightarrow Cu(II)$ .

Los datos espectrales de la oxihemocianina son completamente consistentes con el modelo de adición oxidativa de unión  $-O_2$  que se muestra en la figura 71. Como en el caso de oxihemeritrina, no es posible decir desde los datos espectrales hasta donde es un puente o una unión, si es ésta última probablemente otros grupos puente tales como el carboxilato deben servir para unir la unidad dimérica.

La molécula de hemocianina tiene N átomos de Cu, cuando está totalmente oxigenada, combinándose con  $N/2$  moléculas de oxígeno. Esta proporción,  $1 O_2/2 Cu$ , no es única entre los pigmentos respiratorios. De las seis moléculas respiratorias que se encuentran en la naturaleza además de la hemocianina, cuatro contienen un grupo heme, hemoglobina, mioglobina, eritrocruorina, y clorocruorina, unen una molécula de oxígeno por átomo de metal. Pero la hemeritrina un pigmento de Fe sin grupo heme, de bajo peso molecular y que se encuentra en algunos animales marinos primitivos,-

toma dos átomos de metal para unir una molécula de oxígeno, justamente como la hemocianina. En cuanto a la hemovanadina, un pigmento que contiene vanadio y que se encuentra en los *Ascidella aspersa* o tunicados, no se sabe cuantos vanadios son necesarios para unir una molécula de oxígeno.

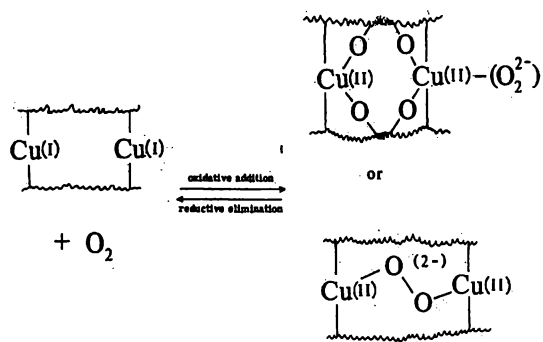


Figura 71. Modelo de adición oxidativa para la unión del  $\text{O}_2$  por hemocianina.

## II

## PLASTOCIANINA AZURINA Y ESTALOCIANINA

Las proteínas "azules de cobre" que se describen en este capítulo son, plastocianina de haba (*Phaseolus vulgaris*; peso molecular 10700; E 350 mV), azurina (*Pseudomonas aeruginosa* peso molecular 13900; E 330 mV), y estalocianina (*Rhus vernicifera*; peso molecular 20000; E 184 mV), se considera que todas tienen funciones de transferencia de electrón, aunque un modelo fisiológico no se conoce para la estalocianina. La plastocianina acepta un electrón del citocromo f en la cadena fotosintética de las hojas verdes, y la azurina se cree que es el oxidante fisiológico del ferrocitocromo c 551 en las *Pseudomonas aeruginosa*s y bacterias parecidas. Las proteínas "azules de Cu" son particularmente atractivas para estudios cinéticos sistemáticos, ya que básicamente el mismo cromóforo se extiende claramente en un amplio rango del potencial de reducción. El potencial que es adoptado depende aparentemente de finos detalles del medio de las proteínas "azules de Cu", permitiendo una oportunidad para correlacionar la reactividad de transferencia de electrón con diferencias estructurales.

## Consideraciones Estructurales

En un trabajo previo hecho por el mismo investigador Harry B. Gray sobre las proteínas "azules de Cu" reportó lo siguiente: las proteínas azules tienen Cu(II), presentan bandas de absorción en la región visible que son mucho más intensas que las bandas de campo ligando de los complejos modelo como  $\text{Cu}(\text{NH}_3)^{2+}$ . Medidas de resonancia de espín electrónico demuestran que las proteínas azules de Cu(II) también tienen constantes hiperfinas de poco Cu.

Las estructuras diméricas son establecidas como una explicación del aumento de intensidad de las bandas de campo ligando por que algunas de las proteínas tienen únicamente un átomo de Cu(II). El problema espectral es ilustrado por la proteína estalocianina que tiene un átomo de Cu(II), consiste de tres bandas en el visible, a 850 ( $\epsilon$  790), 604 ( $\epsilon$  4080), y 450 nm ( $\epsilon$  880). Es difícil pero no imposible entender la intensidad de la banda central (604 nm) donde se puede suponer cualquiera de las dos coordinaciones, cuadrada planar u octaédrica distorsionada tetragonalmente. Además, la banda de campo ligando del sistema es de alta energía para ser explicada por un modelo tetraédrico distorsionado.

Gray propone que las proteínas azules tienen un sitio de Cu(II) penta coordinado. Esta proposición está basada sobre el hecho de que las tres bandas en posición e intensidad, son muy similares a el espectro de campo ligando de varios complejos modelo penta coordinados de bajo espín de Ni(II). Recorriendo los sitios desde los tetra coordinados de bajo espín a los penta coordinados de bajo espín de Ni(II), se observan comunmente grandes aumentos en la intensidad de la banda de campo ligando. Basados en la experiencia de los sistemas de Ni(II) confiamos en obtener una síntesis de un complejo penta coordinado de Cu(II).

Hasta aquí, las primeras investigaciones de H.B.-Gray. Ahora veremos los resultados de las investigaciones posteriores. Como ya se apuntó anteriormente, una proteína típica de Cu(II) es caracterizada por un sistema de bandas de absorción electrónica intensas, con picos próximos a los 600 nm, así como por un parámetro espectral  $A_{\parallel}$  de resonancia paramagnética electrónica muy pequeño. Ninguna de estas propiedades espectrales ha sido duplicada satisfactoriamente en complejos de Cu(II) de bajo peso molecular. -

Centros cuadrados planares de Cu(II), en particular, presentan espectro óptico y resonancia paramagnética electrónica muy diferentes de aquellos observados para proteínas azules, muchos modelos tienen geometrías semejantes basados sobre coordinaciones 4 ó 5. Se han propuesto dos explicaciones diferentes de la banda de absorción intensa a 600 nm. Una explica que la banda se origina de una o más transiciones permitidas d-d en un centro asimétrico, y la otra atribuye la fuerte absorción a un proceso de transferencia de carga, probablemente del ligando al metal (LMCT).

Estudios espectroscópicos de derivados de Co(II)-de estalocianina, plastocianina y azurina han establecido que la interpretación de transferencia de carga es la más probable. Bandas intensas ( $\epsilon \geq 2 \times 10^3$ ) parecen ser análogas a las del sistema de proteínas azules de Cu en los 600-nm, observándose en los derivados de Co(II) en la región de 300 a 350 nm. El cambio de posición de las bandas cerca de los 16 kK (Cu(II)  $\ll$  Co(II)) concuerda bien con lo esperado para una transición LMCT. La absorción del visible y IR cercano, CD, y espectro MCD de los derivados de Co(II) de estalocianina, plastocianina y azurina han sido interpretados principalmente en términos de la transición d-d esperada para centros metálicos tetraédricos distorsionados (tabla VIII). Promedios de parámetros de campo ligando son los mismos para las tres proteínas con Co(II) ( $Dq=490$ ,  $B=730$   $\text{cm}^{-1}$ ), lo cual sugiere fuertemente que el átomo donador del grupo de un sitio azul no varía de un caso a otro, aún a pesar del potencial. Curiosamente, la división del estado  $^4T_1$  es más pequeña para el derivado de Co(II) de estalocianina, que es la proteína cuya forma natural presenta los bajos potenciales.

Nuevas absorciones y características espectrales-CD que son atribuidas a las transiciones d-d se han observado en la región del IR cercano para estalocianina, plasto-



cianina y azurina (tabla IX). Estas transiciones d-d se han analizado principalmente en términos de una geometría tetraédrica ligeramente achatada para centros azules de Cu. En cada una de las geometrías la energía electrónica ( $W$ ) de los estados de campo ligando de Cu(II) se incrementa de acuerdo a;  ${}^2B_2 < {}^2E < {}^2A_1$ . El valor del ángulo ( $\beta$ ) entre el eje Z y las uniones metal-ligando ( $\beta = 90^\circ$  en el límite  $D_{4h}$ ) para estalocianina fué fijado en  $60^\circ$  en orden para dar valores razonables para  $\Delta W({}^2A_1 - {}^2B_2)$  en el tetraédro y en la geometría limitante cuadrado planar. Tomando  $\Delta W({}^2E - {}^2B_2) = 5250$  y  $\Delta W({}^2B_2 - {}^2B_1) = 8750 \text{ cm}^{-1}$  ( $D_s = 765$ ,  $D_t = 444 \text{ cm}^{-1}$ ), los valores de  $\Delta W({}^2A_1 - {}^2B_2)$  se calcularon que son 22800 y 6915  $\text{cm}^{-1}$  en los límites  $D_{4h}$  y  $T_d$  ( $\beta = 54.74^\circ$ ), respectivamente. Las otras transiciones  $D_{4h}$ ,  ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2E_g$  y  ${}^2B_{1g} \rightarrow {}^2B_{2g}$  son pronosticadas a 24890 y 15550  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Todos los valores calculados  $D_{4h}$  deberán ser reducidos en aproximadamente 20% para permitir el ligero incremento ( $\sim 0.1 \text{ A}^\circ$ ) en la longitud de unión metal-ligando que es esperada para acompañar un cambio del tetraédro a la coordinación cuadrado planar. Los valores ajustados para las energías de transición d-d  $D_{4h}$  están en concordancia razonable con las posiciones de las bandas observadas en complejos cuadrados planares de Cu(II) que tienen como ligandos donadores a nitrógenos. En contraste, parámetros de campo ligando derivados de valores  $\beta$  con algunos grados cerca de  $60^\circ$  dan absurdas diferencias de energía en el límite  $D_{4h}$ . Por ejemplo,  $\Delta W({}^2A_1 - {}^2B_2)$  se calcula que es 58800  $\text{cm}^{-1}$  con  $\beta = 57^\circ$  y parámetros ( $D_s = 2240$ ,  $D_t = 505 \text{ cm}^{-1}$ ) y 5050  $\text{cm}^{-1}$  con  $\beta = 70^\circ$  ( $D_s = 77$ ,  $D_t = 320 \text{ cm}^{-1}$ ).

Los parámetros derivados de campo ligando ( $\beta = 60^\circ$ ,  $D_s = 765$ ,  $D_t = 444 \text{ cm}^{-1}$ ) pronosticados para  ${}^2A_1$  son 11540  $\text{cm}^{-1}$  cercano al estado basal  ${}^2B_2$  para estalocianina. Se observan cercanos a esta energía una banda de absorción y un máximo CD. La banda de absorción resuelta tiene un coeficien

te de extinción molar de 565 que es aproximadamente 5 veces más grande que la observada para el máximo a  $8750 \text{ cm}^{-1}$ . Se esperaba que la transición  ${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$  debiera ser más intensa, como lo es el dipolo-eléctrico permitido, puesto que  ${}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1$  no es.

Niveles de energía d excitados para plastocianina y azurina son muy similares, Tomando  $\Delta W({}^2E - {}^2B_2) = 5500$ ,  $\Delta W({}^2B_1 - {}^2B_2) = 10300 \text{ cm}^{-1}$  y  $\theta = 60^\circ$  para ambas proteínas, Ds y Dt se calcularon que son  $764$  y  $508 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente y la transición  ${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$  se pronostica a  $12520 \text{ cm}^{-1}$ . La plastocianina presenta un pico Gausiano resuelto a  $11940 \text{ cm}^{-1}$  (tabla IX) que puede ser atribuido a  ${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$ . En azurina, la banda relativamente intensa a  $13000 \text{ cm}^{-1}$  probablemente traslapada extensivamente con absorción debida a  ${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$ .

Investigaciones dirigidas a identificar los ligandos incluyendo el achatamiento del tetraédro del centro azul de Cu han sido muy intensas en el caso de la plastocianina. Hay evidencias directas de un ligando azufre que vienen de experimentos espectrales fotoelectrónicos de rayos X (XPS) en plastocianina de haba, donde fueron observados grandes cambios de energía del centro S2p del residuo cisteína (Cis-85) en la proteína sobre la incorporación del metal ( $164.5$  apo;  $169.8$  natural;  $168.8$  eV derivado de Co(II)). Las dos histidinas en plastocianina de espinaca presentan valores de pK entre 5 en experimentos de valoraciones de resonancia magnética nuclear, sugiriendo que ellas están coordinadas al Cu. Es razonable suponer, que también son ligandos los dos residuos análogos en la proteína del haba, His-38 y His-88. El cuarto ligando en el grupo donador propuesto para plastocianina de haba ha sido identificado en estudios extensos de espectro IR. Estos experimentos han revelado que una sección corta de la helice  $\alpha$  en apoplastociani

na está fuertemente perturbada por la incorporación del metal (Cu(II) ó Co(II)), por lo tanto, implica un apoyo esquelético de nitrógeno peptídico u oxígeno como ligando. La preferencia del Cu por donadores nitrógeno, así como evidencias de espectro (vide infra) de transferencia de carga, favorecen la coordinación por un nitrógeno peptídico desprotonado (N\*). Por consideración de la secuencia de lugares en la helice de la plastocianina de haba, por el apoyo esquelético del nitrógeno peptídico, y por los pocos residuos cercanos de His-38.

El modelo tetraédrico achatado de  $CuN_2N^*S$  también es razonable para la azurina. Experimentos recientes de XPS han demostrado que un azufre está unido al Cu en la azurina y las propiedades espectroscópicas electrónicas de las dos formas de la proteína con Cu y Co son muy similares a aquellas de los derivados análogos de la plastocianina de haba.

Es probable que el sitio de unión tetraédrico cercano en cada proteína azul de Cu es más rígido, como los factores de estabilización de campo ligando favorecen fuertemente a una geometría cuadrada planar para una coordinación de 4 del Cu(II). La rigidez de construcción del sitio en la estructura de la proteína debe vencer la energía de estabilización electrónica asociada con una distorsión de Jahn-Teller hacia la geometría cuadrada planar de Cu(II), de esta forma contribuye a la relativa inestabilidad del estado oxidado del sistema. Así los relativamente altos potenciales de reducción de las proteínas azules de Cu pueden ser atribuidos, como mínimo en parte, a los factores electrónicos asociados con la rigidez forzada, en el sitio de la estructura del tetraédro achatado  $CuN_2N^*S$ .

Se han obtenido fuertes evidencias de la coordina

ción de azufre de cisteína en la estalocianina en experimentos de XPS. La coordinación de un tioeter no es posible en este caso, ya que la proteína no tiene metionina, es probable que los otros ligandos sean similares, pero no necesariamente idénticos, a los de plastocianina de haba.

Se ha presentado una interpretación de las bandas de absorción intensas cercanas a los 13000, 16000, 22000  $\text{cm}^{-1}$  en las proteínas azules de Cu. El análisis está basado en la suposición de que las energías más altas son ocupadas por los orbitales de los ligandos en una unidad  $\text{CuN}_2\text{N}^*\text{S}$  y decrecen de acuerdo a  $\pi\text{S} > \sigma\text{S} > \pi\text{N}^* > \pi\text{N}$ . Los estados excitados de transferencia de carga derivados de transiciones del tipo  $\pi \rightarrow d_{x^2-y^2}$  las dos son dipolo-eléctrico y magnético permitidos. La transición  $\sigma\text{S} \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , en otro caso, es sólo dipolo eléctrico permitido. La fuerza rotacional (R) de una banda CD es relacionada por los momentos-dipolo eléctrico ( $\vec{\mu}_{\text{el}}$ ) y dipolo magnético ( $\vec{\mu}_{\text{mag}}$ ) por:

$$R = \text{Im}(\psi_i^* \vec{\mu}_{\text{el}} \psi_f \text{ dr} \cdot \int \psi_i^* \vec{\mu}_{\text{mag}} \psi_f \text{ dr}) \quad (1)$$

donde  $\psi_i$  y  $\psi_f$  son los estados inicial y final, respectivamente. También puede ser determinada la fuerza rotacional desde las cantidades experimentales  $\Delta\epsilon$ ,  $\epsilon_1 - \epsilon_r$  de acuerdo a la ecuación 2:

$$R = 22.9 \times 10^{-40} \int (\Delta\epsilon/\nu) d\nu \quad (2)$$

Además, la fuerza dipolo (D) está relacionada por el coeficiente de extinción  $\epsilon$  por:

$$D = 91.8 \times 10^{-40} \int (\epsilon/\nu) d\nu \quad (3)$$

y  $4R/D$ , el factor de anisotropía de Kuhn. Moscovitz ha aproximado la integral  $\int (\epsilon/\nu) d\nu$  como el  $\ln 2 \sqrt{\pi \epsilon_0^2 / \nu^2}$ ,

donde  $\mathcal{E}^\circ$  es el valor máximo de  $\mathcal{E}$ ,  $\mathcal{E}^\circ$  es la mitad de la amplitud de acuerdo con la mitad del máximo, y  $\nu^\circ$  es la frecuencia de  $\mathcal{E}^\circ$ . Suponiendo que  $\mathcal{E}^\circ$  y  $\nu^\circ$  son las mismas para las absorciones correspondientes y bandas CD,  $\gamma$  puede ser calculada de la ecuación 4:

$$\gamma = |\Delta\mathcal{E}/\mathcal{E}| \quad (4)$$

las bandas asociadas con el dipolo magnético permitido, de las transiciones de transferencia de carga  $\pi$  se espera tengan valores  $\gamma$  mucho más grandes que aquellos atribuibles a  $\sigma$   $S \rightarrow d_{x^2-y^2}$ , como el mecanismo dado de intensidad en el caso anterior es de origen puramente dipolo eléctrico. Valores de  $\gamma$ ,  $\Delta\mathcal{E}$ , y  $\mathcal{E}$  para los espectros electrónicos semejantes de estalcianina, plastocianina y azurina están enlistados en la tabla IX. Los resultados indican claramente que las bandas próximas a los 13000 y 22000  $\text{cm}^{-1}$  son señaladas como transferencia de carga  $\pi$ , de acuerdo con que ellas tienen valores relativamente grandes de  $\gamma$ . Señalamientos específicos son  $\pi S \rightarrow d_{x^2-y^2}$  al 13000  $\text{cm}^{-1}$  y  $\pi N^* \rightarrow d_{x^2-y^2}$  a 22000  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 16000  $\text{cm}^{-1}$  en cada proteína presenta un valor  $\gamma$  conveniente abajo de 0.005 y es atribuido a una transición de transferencia de carga  $\sigma S \rightarrow d_{x^2-y^2}$ .

### Espectro Ultravioleta

Este grupo de proteínas azules de Cu han sido sis temas convenientes para probar aspectos estructurales del sitio de unión del metal. Ahora, el problema se estudiará monitoreando las pruebas intrínsecas de estas proteínas, por el examen de las propiedades espectrales en la región ultravioleta.

Como ya se observó anteriormente es probable que un ligando azufre esté involucrado en la esfera de coordinación del Cu, en estudios recientes se encontraron alteraciones características que son causadas probablemente por el cromoforo S-Cu(I) con cambios de diferencias conformacionales entre los estados reducido y oxidado de la proteína, estos estudios espectrales se hicieron en derivados donde fue cambiado el Cu por Co en la proteína natural.

La naturaleza del sitio azul de Cu puede ser comprendida como el resultado de un compromiso entre la energía libre requerida para la estructura de coordinación preferida del ion metálico en sus dos estados de óxido-reducción y la conformación óptima del polipéptido formado. Por lo tanto, se esperan cambios en el estado del Cu que pueden ser expresados en algunas de las propiedades de los residuos aminoácido, particularmente en aquellos que están relacionados con el sitio de unión. Así, entre otros de los estudios realizados se ha demostrado una correlación entre los estudios de óxido-reducción del Cu tipo I y la fluorescencia esencial de Rhus lacasa. Se han comparado las propiedades espectrales UV de tres proteínas azules de Cu (Pseudomonas aeruginosa azurina, Alcaligenes faecalis azurina, y Rhus estalocianina) en sus estados oxidado, reducido y libre de Cu, usando absorción, diferencia de absorción, dicroísmo circular y fluorescencia. La comparación entre las dos especies de azurina, es de especial significancia, ya que son proteínas homólogas, sin embargo, ciertos residuos son de particular interés (ej: el triptofano) que ocupa diferentes posiciones en la secuencia de amino ácidos.

La figura 72 muestra el espectro de diferencia de absorción de la azurina Pseudomonas aeruginosa reducida y oxidada. Como es bien sabido, en la región visible la banda característica azul desaparece al reducirse, y no obser-

va ningún otro cambio. Sin embargo, cambios complejos y - pronunciados son observados en la región UV. Al reducirse se encuentra un decremento cerca de los 330 nm, mientras - que debajo de esta longitud de onda la azurina reducida tie - ne un coeficiente de extinción alto. Esto es consistente - con el resultado de un experimento preliminar reportado por Yamanaka. El pico en la diferencia de espectros a 294 nm - es causado por un cambio pequeño a rojo de la banda fina es - tructural bien resuelta de triptofano a 292 nm. Un incre- - mento uniforme en la extinción de la proteína reducida con- relación a la oxidada se desarrolla en longitudes de onda - bajas produciendo una diferencia de aproximadamente 5000 -  $M^{-1}$  a 250 nm. Este incremento es modulado por ligeras, pe- ro claras variaciones en la estructura fina de las bandas - de absorción aromáticas (275-290 nm) y por una banda ancha - o panza a 270 nm. Se han hecho medidas que son esencialmen - te similares en la proteína reducida y oxidada para azurina A. faecalis y estalocianina. Los puntos isobáticos están - un poco cambiados con el azul (324 nm para la primera, 304- nm para la segunda), y el pico en 294 nm es sólo una banda - achatada, que es una consecuencia de la transición del trip - tofano a 292 nm no estando resuelto en estas proteínas. Pe - ro un marcado incremento de la diferencia de extinción con- decremento de la longitud de onda y una banda achatada a - 270 nm están de acuerdo con las investigaciones previas. - Además, los valores ( $\epsilon_{red} - \epsilon_{oxi}$ ) encontrados son totalmen - te similares (tabla X). Los valores un tanto superiores pa - ra estalocianina a 260 y 270 nm son causados por una banda - achatada mucho más pronunciada a 270 nm.

También se han hecho medidas de espectro CD de - las tres proteínas en sus formas reducida y oxidada; el es - pectro de dos de ellas son presentados en las figuras 73 y 74. El grupo complejo de las bandas dicroicas en la región de - las transiciones aromáticas, es conservado totalmente en to

dos los casos en la reducción, y sólo la magnitud de las -  
eleptocidades es afectada. La pequeña pero significativa -  
diferencia a 310 y en 293 nm, lo mismo que el gran incremen-  
to de la elepticidad a 280 nm encontrado para azurina Ps. -  
aeruginosa (fig. 73) son exactamente análogas a las cambios-  
encontrados para azurina A. faecalis reducida comparada con  
la proteína oxidada. El espectro CD de azurina Ps. aerugi-  
nosa oxidada y azurina A. faecalis (fig. 73 y 75) son esen-  
cialmente similares. Presentan exactamente la misma forma-  
de la banda, excepto por algunos cambios pequeños y difie--  
ren sólo en las elipticidades de varias bandas. La mayor -  
diferencia y la única en las propiedades del espectro CD de  
estas dos proteínas es la respuesta de la banda positiva a-  
260 nm en la forma reducida. Mientras en la azurina A. fae-  
calis esta banda cambia poco en la reducción, un cambio pro-  
nunciado ocurre hacia la elepticidad negativa en el caso de  
la azurina Ps. aeruginosa (fig. 73). El efecto de reducción  
en el espectro CD de estalocianina (fig. 74) es limitado a -  
las amplitudes de las diferentes bandas, manteniendo su posi-  
ción practicamente inalterada. El incremento de más del do-  
ble en la elepticidad de la banda negativa punteada cerca -  
de los 265 nm está probablemente relacionado a la misma -  
transición que produce una banda achatada pronunciada a 270  
nm en el espectro de diferencia de absorción reducido menos  
oxidado.

Las propiedades espectrales de las tres proteínas  
en el UV están fuertemente influenciadas por los estados de  
óxido-reducción del Cu. Aunque esto es probablemente ver-  
dad para todas las proteínas azules de Cu, se ha prestado -  
muy poca atención a estos cambios. La similitud mecánica -  
de la relación de cambios de óxido-reducción en el espec-  
tro de absorción y el CD, sugieren que muchos de los cam- -  
bios son comunes a las tres proteínas y están relacionados-  
con algunas propiedades estructurales comunes, involucrando



muy probablemente al sitio del Cu. Se han interpretado los resultados de varios estudios espectroscópicos y químicos - que indican que el Cu está coordinado con un S. Los descubrimientos de estos estudios son consistentes con tales conceptos. La conducta general de los espectros de diferencia de absorción de reducido menos oxidado es similar al espectro de absorción del cromoforo Cu(I)-S como se observa de - sus valores de extinción (tabla X) derivados del espectro - de tioneína-Cu(I). Sin embargo, la forma química del ligando S en las proteínas azules no está totalmente estableci--do, pero generalmente ha sido propuesto un grupo sulfhidri--lo de un residuo de cisteína. Sin embargo, se deberá considerar la posibilidad de que la metionina puede servir como--ligando. Algunas suposiciones para esta hipótesis vienen - del estudio de un modelo donde el complejo quelato de un - tioeter con Cu(II) se ha descubierto que presenta una banda de absorción intensa, similar a la descubierta en las pro--teínas de Cu. En nueve especies diferentes de azurinas - (Pseudomonas, Bordetella, y Alcaligenes) y en ocho especies diferentes de plastocianinas (semillas, papas y algas ver--des), metionina 121 (en la plastocianina es 97), está invari--ablemente, en la secuencia de la cadena y tiene algunos - residuos distantes que conservan cualquiera de sus caracte--res aromáticos o hidrofóbicos (Tir 108, Fen/Tir 110, Fen/ - Tir 111, Leu/Val/Ile 125, Leu/Val 127) aparte del invari--ble Gli 123 y del residuo cisteína 112. Esto puede indicar la involucración de ambas cisteína y metionina en la esfera de coordinación del Cu, hasta que son utilizadas.

Los efectos adicionales en la región aromática de la diferencia de espectro (250-300 nm) son probablemente - causados por transiciones aromáticas que están influencia--das por el estado de óxido-reducción del Cu. Las bandas - achatadas que ocurren a 270 nm en las tres proteínas, pue--den resultar de un incremento en la absorción de la tirosi-

na. En este contexto, es interesante notar que la Tir 108- (número de la azurina), que está relativamente cerca de los ligandos propuestos al Cu, Cis 112 y Met 121, son completamente invariables en la azurina y plastocianina y pueden ser además, ser un constituyente obligatorio del sitio del Cu.

Los cambios inducidos de óxido-reducción en el espectro CD de la región aromática no parecen estar relacionados a un cromoforo de Cu, porque no son uniformes en las tres proteínas. En cambio, probablemente ellos aparecen de las diferencias en los efectos conformacionales directos o indirectos del estado de óxido-reducción del Cu en el di-croisma de varias transiciones aromáticas. Los cambios comparativamente pequeños en el rango 285-295 nm sugieren que las transiciones de triptofano son menos afectadas que aquellas de tirosina y de fenilalanina. Los cambios cerca de los 250 nm pueden involucrar grupos disulfuro que producen efectos Cotton en esta longitud de onda.

Para ciertas proteínas azules de Cu hace tiempo se propuso que un Cu(II) o que la banda relacionada al Cu(II) estaba presente entre 300 y 350 nm, pero a pesar de las implicaciones potenciales ha atraído muy poca atención- el estudio de oxidasas que tienen Cu. Se presenta un resumen de las medidas espectrales en la región 300-350 nm en la figura 76. Al cambiar el Cu casi desaparece la absorción en esta región. Esto es confirmado por el espectro CD donde el problema de obtención espectral de soluciones muy claras de holo y apoproteínas en igualdad de concentración es menos decisivo que para el espectro de absorción o diferencia de absorción. La extinción de las proteínas naturales en esta región en el rango  $200-700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  comparada con la extinción de aproximadamente  $1 \times 10^4$  (azurina) ó  $2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (estalocinaina) en 280 nm. Estos problemas experimentales hacen difícil obtener datos precisos sobre-

la forma de la banda de Cu(II) abajo de 305 nm, donde principia la absorción aromática. Medidas de azurina reconstituida se compararon con las de apoazurina, se estimó que la extinción dependiente del Cu no excede a  $450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en 280 nm, pero falta ser determinado si pasa a través de un máximo entre esta longitud de onda y 320 nm. Un candidato probable para el ligando, que en conjunción con el Cu(II) da un aumento en la absorción en esta región, es un nitrógeno peptídico. Varios complejos involucran la coordinación de un nitrógeno peptídico desprotonado con el Cu(II), se estaban investigando para ver si absorben en esta región. La banda moderadamente intensa se ha atribuido a una transición de transferencia de carga ligando-metal. Un sistema modelo interesante presenta una banda similar, es el complejo poli-L-histidina Cu(II) formado en soluciones neutras o ligeramente ácidas. Este logro es de significancia especial en vista de los datos de resonancia magnética nuclear de las proteínas azules de Cu que sugieren a dos nitrógenos, uno peptídico y el otro de imidazol como ligandos a el Cu.

Considerando ahora el espectro de diferencia de absorción de reducido menos oxidado, se hace claro que el punto isobático cambia a una longitud de onda corta cuando vamos de la azurina a estalocianina, porque la absorbancia de la estalocianina oxidada es más alta que la de las azurinas oxidadas. Fundamentalmente, por supuesto, el espectro del Cu(I) tiene una intensidad similar en las tres proteínas, como mínimo en esta región. La respuesta de la intensidad en la emisión de fluorescencia para la reducción del Cu se puede explicar sobre las mismas bases. La azurina Ps. aeruginosa tiene su emisión centrada cerca de los 308 nm. Cuando la proteína está reducida, la absorbancia en esta región de longitud de onda se incrementa. Además, algún efecto de extinción es originado desde la transferencia de ener

gía interna no radioactiva entre el residuo excitado triptofano y el cromoforo de Cu y se espera que se agrande, con lo que decrezca el quantum producido. Exactamente lo opuesto sucede con la estalocianina. Aquí la proteína reducida absorbe menos en la región de la emisión máxima, aumentando su intensidad. El espectro de emisión de azurina *A. faecalis* ( $\lambda_{ex}=280$  nm), difícilmente cambia en la reducción, probablemente porque los efectos de extinción y aumento son aproximadamente compensados. Recordando que el residuo de triptofano de azurina *A. faecalis* no tiene homólogo a el triptofano de azurina *Ps. aeruginosa*, es un hecho que puede contribuir a la diferencia en el espectro de fluorescencia de las proteínas naturales y en la diferente respuesta a la reducción.

Al cambiar el ion Cu sólo se producen efectos moderados en la parte aromática del espectro CD (fig. 74 y 75), una región espectral que es en general menos afectada por el movimiento del Cu que por la reducción. Esto indica que la integración estructural de las proteínas azules de Cu dependen poco de la presencia del ion Cu hasta que estos residuos aromáticos son afectados. Un resultado similar se ha obtenido de la comparación de la fluorescencia del triptofano en azurinas *Ps.* libres de Cu y naturales. La conclusión es que la interacción entre el ion Cu y la proteína, como se dijo al principio, es muy dominada por la conformación de la última.

TABLA VIII. Energías del Estado de Campo Ligan-  
do de Derivados de Proteína Co (II)

Protein	${}^4T_2$	${}^4T_1$ (4F)		Avg.	${}^4A_1$ (4P)		Avg.
Stellacyanin	5000	6800	9700	8250	15,500	18,500	17,000
Azurin	<sup>a</sup>	6600	10,150	8375	15,700	19,200	17,400
Plastocyanin	<sup>a</sup>	6900	10,000	8450	15,200	19,700	17,400

TABLA IX. Datos Espectrales CD y de Absorción de Proteínas de Cu Azules.

Protein	$\tilde{\nu}(cm^{-1})$	$\Delta\epsilon(M^{-1} cm^{-1})$	$\epsilon(M^{-1} cm^{-1})$	$\gamma$	Assignment
Stellacyanin	5250	0.45	~ 100	~ 0.018	${}^2B_2 \rightarrow {}^2E$
	8750	-0.35	~ 100	~ 0.014	${}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1$
	11,470	2.4	565	0.017	${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$
	13,040	-5.0	341	0.059	$\pi S \rightarrow d_{xy}, s^2$
	16,580	3.6	3549	0.0041	$\sigma S \rightarrow d_{xz}, s^2$
	17,840	0.75	1542	0.0019	
	22,570	-7.35	942	0.031	$\pi N^* \rightarrow d_{xy}, s^2$
Plastocyanin	5500	0.125	~ 100	0.005	${}^2B_2 \rightarrow {}^2E$
	10,300	-0.165	200	0.0033	${}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1$
	14,940	~ 1.5	1162	0.0052	${}^2B_2 \rightarrow {}^2A_1$
	13,540	-3.78	1289	0.012	$\pi S \rightarrow d_{xy}, s^2$
	16,600	4.08	4364	0.0037	$\sigma S \rightarrow d_{xz}, s^2$
	18,140	0.4	1163	0.0014	
	21,540	-1.32	300	0.018	$\pi N^* \rightarrow d_{xy}, s^2$
Azurin	23,640	1.26	~ 100	~ 0.050	
	10,300	-0.475	82	0.023	${}^2B_2 \rightarrow {}^2B_1$
	12,940	-3.6	686	0.021	$\pi S \rightarrow d_{xy}, s^2$
	15,940	3.96	3798	0.0042	$\sigma S \rightarrow d_{xz}, s^2$
	17,770	0.72	504	0.0057	
20,840	-1.11	185	0.024	$\pi N^* \rightarrow d_{xy}, s^2$	

<sup>a</sup> From Ref. 13. Absorption for each blue protein are taken from a Gaussian resolution of the 35 K near-infrared and visible absorption spectrum.

<sup>a</sup> Not assigned.

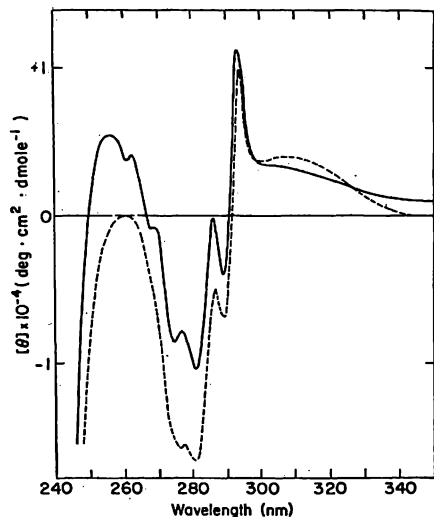


Figura 73. Espectro CD de azurina *Ps. aeruginosa* oxidada (—) y reducida (---) con  $1.2 \times 10^{-4}$  M de proteína en 0.05 M de fosfato de potasio pH 7. Reducción con ascorbato y diálisis extensiva. Fase óptica 10 mm.

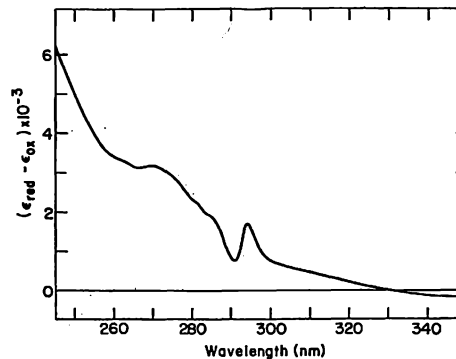


Figura 72. Espectro de diferencia de absorción oxidado menos reducido de azurina *Ps. aeruginosa*. Celda de referencia con  $6.8 \times 10^{-5}$  M de soluciones de proteína reducida y oxidada - resp. Catalizador hidrógeno con platino negro. Medio fosfato de potasio 0.1 M. pH 7.

TABLA X. Extinción Ultravioleta de Proteínas de Cobre Reducidas.

Protein	Value Measured ( $M^{-1} cm^{-1}$ )	Wavelength (nm)			
		250	260	270	280
<i>Ps. aeruginosa</i> azurin	$\epsilon_{red} - \epsilon_{ox}$	5050	3450	3200	2350
<i>A. faecalis</i> azurin	$\epsilon_{red} - \epsilon_{ox}$	4250	3050	2950	2250
Stellacyanin	$\epsilon_{red} - \epsilon_{ox}$	5150	4300	4250	3500
Cu <sup>+</sup> - thionein*	$\epsilon_{red}$	3650	3050	2650	2200

\* Values calculated from spectral data reported by Rupp and Weser (24).

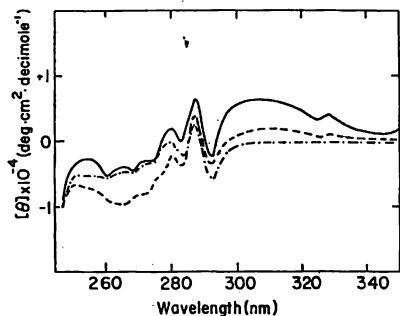


Figura 74. Espectro CD de estalocianina oxidada (—), reducida (---), y libre de Cu (-.-). Solución de proteína:  $5 \times 10^{-5}$  M en fosfato de potasio 0.1 M pH-7. Fase óptica, 10 mm.

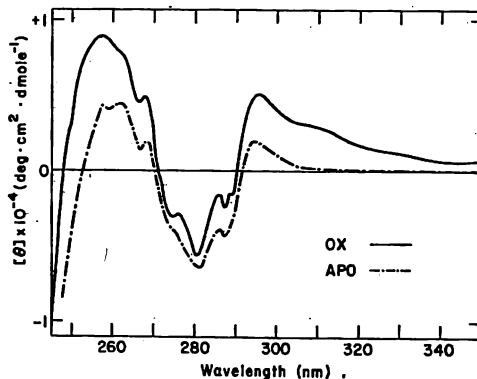


Figura 75. Espectro CD de azurina A. Faecalis natural (—) y libre de Cu(---). Solución:  $9 \times 10^{-5}$  M en 0.1 M de fosfato de potasio pH 7. - Fase óptica, 10 mm.

	ABS. OX/APO	CD. OX/APO	ABS. RED-OX	CD. OX/RED	EMISSION OX
Azurin from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Azurin from <i>Alcaligenes faecalis</i>					
Stekocyanin from <i>Rhus verrucifera</i>					

Figura 76. Propiedades ópticas de las tres proteínas azules de Cu en el rango 300-350 nm. Proteína oxidada (—), reducida o libre de Cu(---).

## III

GALACTOSA OXIDASA  
SUPEROXIDO DISMUTASA

El cobre es un elemento esencial para muchas formas de vida. En los seres humanos es el tercer elemento más abundante en proporción de trazas; sólo el fierro y el zinc están presentes en mayor cantidad. La utilización del Cu usualmente involucra un sitio activo de una proteína que cataliza una reacción de oxidación crítica, por ejemplo, citochrome oxidasa, amino oxidasa, superóxido dismutasa, ferroxidasas, dopamina  $\beta$  hidroxidasas y tirosinasas. En efecto, los animales presentan un mecanismo único homeostático para la absorción, distribución, utilización y excreción del Cu. Además, como mínimo se conocen dos enfermedades hereditarias potencialmente letales debido al metabolismo del Cu: la enfermedad de Wilson's y el Síndrome del Cabello de Menkes's Kinky.

Los sitios del Cu(II) en las proteínas se han clasificado en tres tipos con base en sus propiedades espectrales. Los sitios tipo I de Cu(II) que son característicos por sus muy altos valores de absorbitividad molar por las bandas en el visible cercanas a los 600 nm (165 kK). En efecto, las proteínas que tienen el sitio tipo I son llamadas frecuentemente proteínas azules de Cu ya que en cualquier solución son azules con concentraciones típicas de enzima ( $10^{-5}$  -  $10^{-4}$  M). La banda en la región de los 600 nm se ha sugerido como origen de una transferencia de carga  $n \rightarrow \pi^*$  ( $\sigma^*$ ) que implica una unión cisteína-Cu. Se han dirigido estudios de reemplazo del metal y de modelos recientes para establecer propiedades. Parámetros de resonancia de espín electrónico para estos sitios de tipo I son diferentes que para los complejos de Cu particularmente los -



bajos valores inusuales para los parámetros de espín Hamiltonianos  $A_{zz}$ , que son típicamente menores de 100 G. Los átomos de  $\text{Cu(II)}$  se cree que están en estos sitios en un medio trigonal (de coordinación 4 ó 5) y la actividad funcional está asociada con un cambio en el estado de oxidación del Cu.

Las proteínas tipo II de  $\text{Cu(II)}$ , o proteínas azul débil de cobre, son menos coloreadas que las de concentraciones comunmente investigadas. Este sistema ha recibido menos atención que el tipo I. Sin embargo, el Cu cúprico azul débil puede igualmente poseer absorbitividades molares altas comparadas contra complejos de coordinación de  $\text{Cu(II)}$ . Los sitios de  $\text{Cu(II)}$  en estas proteínas también producen valores  $A_{zz}$  normalmente grandes, más de 140 G, más similares a los complejos cuadrados planares de  $\text{Cu(II)}$  de bajo peso molecular. La única proteína de Cu utilizable en la estructura cristalina, es aquella proteína azul débil de eritrocito bovino superóxido dismutasa. Los dos átomos de Cu en esta proteína, cada uno está coordinado por cuatro nitrógenos de histidina en un orden aproximado cuadrado planar.

Pocos ejemplos son útiles para las proteínas tipo III de  $\text{Cu(II)}$ . Estos sistemas son inactivos en resonancia de espín electrónico, aunque el  $\text{Cu(II)}$  está presente no se obtiene espectro. Resultados recientes de sensibilidad magnética indican que el tipo III de  $\text{Cu(II)}$  en Rhus lacasa es un acoplamiento antiferromagnético de un dímero de  $\text{Cu(II)}$ . Poco, sin embargo, es conocido de los ligandos al Cu ó de la naturaleza de la interacción dimérica.

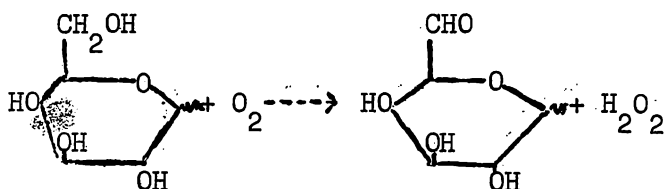
El sitio activo metálico completo en una metaloproteína consiste del metal quelato más positivo de todos los grupos en la proteína que contribuye a sus propiedades espectrales y catalíticas. Una proteína de Cu tiene especificidad catalítica y propiedades espectrales muy especia-

les. La premisa de estas investigaciones es que ambas propiedades catalíticas y espectrales deben reflejar la misma y única característica de los ligandos al metal, la geometría del complejo metálico, las propiedades del sitio activo y los grupos de la proteína y el medio general del sitio activo. Como último objetivo es el de descubrir la interrelación pertinente entre estos parámetros. La variación en uno o en todos estos factores pueden ser la base fundamental para distinguir las propiedades químicas y espectrales de las dos clases de Cu paramagnético en proteínas de Cu.

#### Galactosa Oxidasa-Antecedentes

Recientemente se ha centrado el interés sobre la enzima de hongo galactosa oxidasa, que puede ser la única proteína de Cu en un sistema no azul de Cu(II) (en la familia de las no azules) y que no tienen otros grupos prostéticos. (Se han examinado los parámetros de resonancia espín electrónico establecidos en las familias de los sitios cúpricos. Operacionalmente, una meta de las investigaciones de las proteínas de Cu es la de determinar precisamente cuáles son las constantes y las variables entre los diferentes ejemplos de cada tipo en el Cu(II)). Se puede hacer un resumen de las propiedades de esta enzima. La galactosa oxidasa fué aislada primeramente por Cooper en 1959. Casi toda la literatura útil de la enzima fué producida por Horecker. La enzima es producida por *Dactylium dendroides* y es una proteína extracelular. Recientemente se ha establecido su peso molecular que es de  $68000 \pm 3000$  daltons. Se ha reportado un análisis de amino ácidos. La proteína tiene un punto isoeléctrico cerca de un pH-12. El único átomo de Cu (II) puede ser rápidamente cambiado por coordinación del dietil ditiocarbamato o por  $H_2S$ . La apoenzima es estable, y la reconstitución de la enzima resulta en una total reactivación. Como su nombre lo indica, la enzima cataliza la-

oxidación de galactosa por oxígeno molecular como se indica en la reacción:



Un alcohol primario sirve como sustrato con la excepción - del metanol y el etanol. Ferricianuro, porfiróxido y hexacloroiridato (IV) pueden reemplazar al oxígeno como oxidante.

El hexacloroiridato (IV) es consumido con la eliminación de oxígeno en mezclas aeróbicas. Cuando el hexacloroiridato (IV) y el  $H_2O_2$  sirven como oxidante y reductor respectivamente, la reacción normal, vis-a-vis  $H_2O_2$  es reversible y se produce oxígeno.

El primer estudio espectral de galactosa oxidasa fue el reportado de un espectro de resonancia espín electrónico por Blumberg. Y más recientemente Cleveland reportó un espectro de resonancia espín electrónico que se basó sobre el acoplamiento del espectro a una computadora. Los - dos concluyeron que cuatro nitrógenos estaban unidos al átomo de  $Cu(II)$ .

Ligandos al Metal en Galactosa Oxidasa: Estudios de Modelo y de Resonancia Espín Electrónico.

Los sistemas modelo pueden ser muy usados en las investigaciones de los átomos ligados al  $Cu$ . Se ha propuesto un complejo como la base de Schiff  $N_2O_2$  de  $Cu$  como modelo pseudo cuadrado planar para la coordinación ecuatorial -

del Cu(II) en galactosa oxidasa. Este complejo modelo imita algunas de las propiedades espectrales de la enzima de Cu(II). En apoyo de este modelo, el espectro de resonancia espin electrónico de la enzima se ha obtenido totalmente resuelto. La figura 77 muestra el tiempo promedio del espectro de resonancia espin electrónico de la galactosa oxidasa a 100°K. Una banda con 5 líneas superfina sobre las líneas paralelas ( $A_{zz}$  componente) causado por nitrógenos está claramente indicada. Estas conclusiones demostraron que como mínimo dos átomos de nitrógeno deben estar ligados al átomo de Cu; la presencia de cuatro nitrógenos parece poco probable. (Recientemente se han obtenido datos de espin que son consistentes con la coordinación de Cu(II) con dos átomos de nitrógeno de imidazol de histidina. (Trabajo en colaboración con J. Peisach y W. Mims).

Sin embargo, al complejo de base de Schiff le falta estabilidad en la reducción con  $CN^-$  que es lo característico del Cu(II) de galactosa oxidasa. Mientras la enzima une un  $CN^-$  lo mismo que en un exceso de  $CN^-$ , el Cu(II) en el modelo es reducido por el ligando. Para fijar las bases estructurales de los componentes que estabilizan la enzima de Cu(II) en la reducción con  $CN^-$ , fué preparado un modelo penta coordinado (fig. 78) que tiene simetría cuadrada bipyramidal. (Las condiciones y procesos del sistema reportados por Busch, para el complejo  $N_4S$  no producen el complejo reportado. Pero probablemente el complejo que ellos obtuvieron fué uno en el cual un lado del grupo puente -O-C-C-S-C-C-O- está atacando a la columna TAAB, y el otro al fenol que está libre, probablemente como alcohol. Un detalle de discusión es la preparación en el proceso sintético del complejo). De un modo cualitativo, átomos de oxígeno y nitrógeno producen uniones de ligazón iónicas con Cu(III). Así en un sistema  $N_4S$ , que cinéticamente es más fácilmente aprovechado, probablemente servirá para el mismo propósito un siste-

ma  $N_2O_2S$ . La utilidad del modelo radica en que circundan - dos posibilidades importantes de aspecto estructural, ligazón axial del S y una jaula protectora sobre la posición axial de los ligandos exógenos. La tabla XI resume los datos útiles de espectro de resonancia espín electrónico y  $CN^-$ . En efecto, ninguno de estos complejos macrocíclicos de Cu(II) unen  $CN^-$  según todas las evidencias de estudios de absorbanza óptica y de resonancia espín electrónico. Así, aunque sean estables en  $CN^-$ , cualquier estabilidad es causada por una falta total de reactividad hacia los  $CN^-$ , muy poco probable en la enzima. También como lo indica la tabla XI, hay pocas evidencias de ligazón axial por el S ó por O como lo prueban los parámetros de resonancia espín electrónico. De estos datos se concluye que la unión de los ligandos exógenos requiere acceso en un sitio de coordinación ecuatorial esencial y que el macrociclo también está rígido en estas substitución. La aparente falta de coordinación axial por el S por los tioeteres un poco más debiles de afinidad al Cu(II) no determina la ligazón marcapuro en la proteína. Sin embargo, la magnitud de los parámetros de espín Hamiltoniano cuando se comparan con otros sistemas y la falta de un efecto substancial de campo eléctrico lineal (LEFE) sobre los valores g hace poco probable esa ligazón de S, y si se presenta es ecuatorial. De esta forma limitada, el sistema  $N_4S$  es geométricamente, si no químicamente apropiado.

Galactosa Oxidasa: Transiciones Ópticas y Unión de Anión.

Dada alguna idea de la naturaleza de los ligandos endógenos podemos preguntarnos como los ligandos exógenos - perturban al átomo de Cu y que puede significar en la transición electrónica presentada por el Cu(II) en galactosa oxidasa.

Como mínimo cinco transiciones electrónicas pueden ser detectadas por absorbancia, diferencia de absorbancia y por espectro dicroísmo circular (CD) para galactosa oxidasa previo a la resolución por análisis de la computadora o estudios magnéticos CD. Esto ocurre con energías que corresponden a 314, 395, 500, 630, y 775 nm (tabla XII). Notables entre estas bandas son las transiciones próximas a los 650, 450, y 800 nm que son presentadas por todas las proteínas de Cu. En un evento, por lo tanto sólo un máximo de cuatro transiciones d-d son permitidas, como mínimo una de las transiciones presentadas por galactosa oxidasa debe ser de transferencia de carga en la proteína natural. Además, aunque el sistema pseudo cuadrado planar que es probable en la galactosa oxidasa pudiera no presentar transiciones de baja energía, el CD y el espectro magnético CD en la región del IR cercano se deberá obtener como se reportó recientemente en el sistema tipo I de Cu(II).

Es interesante considerar el efecto de los ligandos exógenos (los cuales se ha demostrado previamente que se unen al átomo de Cu(II) en la esfera interior por estudios de resonancia de espín electrónico) en el espectro óptico de la galactosa oxidasa. (Hasta que no fueron indicados en reportes previos, estudios de unión de anión, como ocurría la unión en la esfera de coordinación interior, y más recientemente detección superfina de ligandos exógenos ciertamente unidos que verifican este hecho. Además cambios en el componente  $A_{zz}$  son totalmente similares en los estudios excelentes de Coleman sobre proteínas artificiales de Cu(II), donde los ligandos exógenos dan estructura superfina en el espectro de resonancia de espín electrónico. La azida por ejemplo, con un exceso molar de 100:1 causa un cambio muy grande en el azul y la banda de los 775 nm aquí no aparece, las de absorbancia en los 630 nm y 445 nm (fig. 79) también sufren cambios. La máxima absorbancia cerca de

los 380 nm con la azida se ha atribuido a un complejo de transferencia de carga, en otras proteínas, el cambio en los 445 nm es el mismo como para la banda de los 630 nm en términos de energía y que sugiere que esta banda a 380 nm es parecida a la banda de los 450 nm. También el cianuro cambia uniformemente el azul de las tres transiciones de baja energía. Más importante, es que los ligandos exógenos como aniones comunes afectan principalmente la intensidad de las transiciones en los 314 nm, pero no su energía. Generalmente, la intensidad de la transición se incrementa dos o tres veces con la unión de tales aniones. El simple hecho de que los aniones afectan la energía de las transiciones de baja energía igualmente sugieren primero, que éstas son de carácter d-d mientras las transiciones de los 314 nm pueden ser una transición con carácter único de transferencia de carga.

Todos los aniones que se unen al Cu(II) en galactosa oxidasa bajan los valores  $g_{zz}$  y  $A_{zz}$ . Esto es consistente (pero no necesario) con un cambio azul en la transición d-d. El  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  es el único anión entre los limitados que se han estudiado que produce un cambio rojo en las bandas ópticas. En proporciones molares de 1:1 5:1 y 100:1 de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  a enzima se obtiene el mismo espectro de diferencia de absorción, y es consistente con la formación de complejos entre galactosa oxidasa y el anión. Las llamadas, bandas de diferencia positiva a 455, 830, y 650 nm indican cambio a rojo de las transiciones de Cu. Similarmente a los otros aniones estudiados, el ferricianuro también produce un incremento relativamente grande en la absorbancia. Análogos a los efectos de la azida, por ejemplo, los efectos de intensidad del ferricianuro son más pronunciados sobre las transiciones de los 445 y 775 nm que sobre la banda de los 630 nm. La evidencia de apoyo para un complejo proteína- $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  es la observación de que el cambio de anión

es muy difícil, por ejemplo, por tratamiento con una resina intercambiadora de aniones.

El  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  también aparentemente se une a la proteína; el espectro de diferencia de absorción (fig. 80) indica un pequeño cambio rojo. Nuevamente, el incremento en la proporción molar de ferrocianuro no causa cambios en la absorbancia. Los dos aniones adicionados en iguales proporciones molares de 5:1 a la enzima, causan un espectro diferente consistente con una unión competitiva a la proteína; la resultante diferencia de absorbancia es aquella esperada para una igual proporción de la enzima entre los dos aniones (fig. 80).

Resultados similares se obtuvieron por monitoreo de relajación del intermediario de  $\text{Cu}(\text{II})$  al adicionar  ${}^{19}\text{F}^-$  o un volumen de  $\text{H}_2\text{O}$ . Por ejemplo, el  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  decrece la relajatividad del  $\text{Cu}(\text{II})$  hacia los protones del agua en 60% mientras el  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$  tiene poco efecto. La adición de iguales cantidades molares de estos aniones produce un 30% de reducción. Efectos como estos ocurren hasta proporciones molares de 1:1.

Estos resultados pueden ser atribuidos a un cambio en el estado de óxido-reducción de la enzima de  $\text{Cu}$ . Sin embargo, el espectro de resonancia de espín electrónico en proporciones molares de 1:1 y 6:1 de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  a enzima indican pocos cambios en la intensidad del espectro (fig. 81). Así, los efectos observados en absorbancia y relajación de espín nuclear en estas proporciones no pueden lógicamente ser atribuidos a una oxidación del  $\text{Cu}(\text{II})$  a  $\text{Cu}(\text{III})$ , por ejemplo. El hecho de que la diferencia de absorbancia no cambia sobre una proporción molar de 100:1 sugiere que al menos la energía de campo ligando del  $\text{Cu}$  enzimático y las probabilidades de transición son consideradas, la adición -



de más  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  es poco importante. Esto es de interés y entonces la señal de resonancia de espín electrónico del  $\text{Cu}(\text{II})$  (como en la fig. 81) desaparece en estas altas proporciones. Así, los efectos del ferricianuro sobre la absorbanza óptica y espín característicos del  $\text{Cu}(\text{II})$  son aparentemente distintos. Si o no las diferencias son relacionadas a las diferencias en la observación de temperatura usada, mientras una posible explicación, mantiene una cuestión intrigante sin resolver. Además, información sobre los efectos del  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  pueden ser probados por experimentos de espectroscopia de rayos X actualmente en progreso.

El tiempo depende, aparentemente de la reducción del  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  para la holo y apoenzima y está indicado por medidas de diferencia de absorbancia, como en la figura 80. En una proporción molar de 1:1 de ferricianuro-enzima, el espectro diferente (fig. 80) cambia lentamente ( $T_{1/2}=7$  hrs) para producir una banda de diferencia negativa a 420 nm, la  $\lambda_{\text{max}}$  para  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ . La solución, pierde su característico color amarillo causado por el  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  durante este período. El hecho de esta reducción es independiente de la presencia del Cu en la enzima y que con la holoenzima, la única banda diferente es aquella atribuible a la reducción del  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$  (hay diferentes bandas que no son de Cu) indican que la proteína, y no el  $\text{Cu}(\text{II})$ , está involucrada en la reacción de óxido-reducción. Este producto proteínico no se ha caracterizado.

### Grupos del Sitio Activo No-Ligados

Otros grupos proteínicos que contribuyen a la dinámica molecular total del sitio activo de Cu deben ser complementarios a la coordinación de ligandos de la esfera interior del átomo de Cu. Uno de los resultados más dramáticos, los cuales primero sugirieron que un residuo de tripto

fano pudiera estar dentro del foco del sitio activo fueron los espectros del UV cercano y CD de la galactosa oxidasa - en la presencia de dihidroxiacetona (que es un excelente - substrato) o el aldehído producto de la reacción de la galactosa, cada uno en ausencia de oxígeno. La unión de un - substrato o producto tiene enormes efectos sobre la actividad óptica del triptofano en la región 285-300 nm. Además, la incorporación del Cu en la apoenzima causa un 29% de reducción en fluorescencia del triptofano. Un espectro de diferencia de absorbancia de haloenzima-apoenzima también demuestra claramente la perturbación del medio ambiente del - triptofano por el Cu. Al mismo tiempo estos resultados pueden reflejar interacciones muy indirectas, la oxidación selectiva de los triptofanos en la galactosa oxidasa con n-bromosuccinamida (NBS) revelaron un papel crítico estructura-función para un mínimo de un residuo. La galactosa oxidasa es inactivada cuando exactamente dos de sus 18 triptofanos son oxidados. Además, el perfil de la inactivación - implica que justo uno de los residuos más reactivos de la - enzima está probablemente asociado con la inactivación. - Una manifestación de la especificidad de la reacción es la observación de que la actividad óptica del triptofano se asocia solamente a el extremo en 290 nm que es donde se afecta. La banda a 295 nm no es afectada (fig. 82). Un nuevo extremo en 250 nm refleja actividad óptica del oxindol producto de la reacción de oxidación. La fluorescencia también es - notablemente afectada; el primero de los dos residuos oxidados cuenta por un 48% del total de fluorescencia de la enzima que además indica que el residuo más reactivo de triptofano tiene propiedades únicas.

Lo más interesante de esta modificación es que su giere la interacción molecular dentro del sitio activo del - Cu. Experimentos previos establecieron que con la enzima - natural, la galactosa en ausencia de oxígeno reduce marcada

mente la actividad óptica del Cu, pero el oxígeno en la ausencia de galactosa no tiene efectos significativos. El hecho de que la galactosa también reduce marcadamente la actividad óptica del Cu involucra un efecto sobre la catálisis-específicamente mejorando esta unión. La misma influencia puede ser deducida de los datos de fluorescencia. Aquí, lo interesante es que mientras la unión de los ligandos exógenos comunes, invariablemente producen una reducción uniforme en cada una de las transiciones de actividad óptica, la inactivación por oxidación selectiva del triptofano está asociada con un decremento en 314 nm, pero un incremento en los 600 nm. Mientras varios aspectos alternativos son posibles por el incremento en los 600 nm, una de estas posibilidades es cambio de la química del sitio del Cu que es ejemplificada por la abolición de la catálisis que en este caso puede reflejar una conversión de la geometría normal pseudo cuadrada planar a un medio ambiente caracterizado por un decremento en la densidad electrónica desaparecida axial (ver tabla XIII). Esto puede ser condicionado por el cambio de unión y/o efectos estereoquímicos, los cuales pueden afectar la densidad electrónica axial.

Es interesante, que el ion cúprico en esta proteína modificada es rápidamente reducido por el cianuro. En una proporción molar de 10:1, los CN<sup>-</sup> efectúan una completa reducción (tabla XIII). Análisis de absorción atómica demostraron que el Cu está también presente en la enzima. Estos dos hechos se ajustan con el incremento de intensidad en la región de los 600 nm y pueden ser interpretados o sugieren que una distorsión estereoquímica acompañe a la oxidación del triptofano en la galactosa oxidada. Por ejemplo, una depresión del medio planar puede esperarse para bajar el potencial de reducción del acoplamiento de Cu(II) a Cu(I).

Se ha examinado en detalle el sitio activo de una mitad de la proteína. En el primer trabajo reportado de galactosa oxidasa, se obtuvieron datos de velocidad-pH que implicaban un grupo imidazol. La dependencia de pH de la reacción enzimática lo mismo que la inactivación de la enzima por iodoacetoamida refleja la ionización esencial de un ácido conjugado,  $pK_a = 6.3$  (fig. 83). La inactivación es causada por la alquilación específica de una histidina con sus 3 nitrógenos. La dependencia del pH alcalino puede reflejar la ionización de una unión de Cu con una molécula de  $H_2O$  (vide supra). Probablemente la proteína modificada con NBS, la enzima alquilada también una al sustrato azúcar, como se indica en los experimentos de fluorescencia. Así, únicamente es afectada otra vez la catálisis. Además, los  $CN^-$  se unen normalmente y no reducen al Cu(II). Correlacionado a esto es el parámetro de espín-Hamiltoniano de las formas natural y alquilada (tabla XIII). Además, la apoenzima no reacciona con iodoacetoamida. De este modo, el imidazol afectado muy probablemente no está ligado al Cu. La apoenzima resultante sugiere, sin embargo, que existe un enlace o relación entre la reactividad de la histidina y el átomo de Cu. Además, la proteína oxidasa con NBS no está alquilada, lo cual establece una probabilidad crítica entre el triptofano reactivo y el residuo de histidina, que probablemente están dentro del foco del sitio activo.

Resultados con galactosa oxidasa ilustran que es extremadamente peligroso confiar en un método espectral para evaluar una perturbación de un sistema metálico. La resonancia de espín electrónico ha sido una prueba sensitiva para ligandos de esfera de coordinación interior pero aparentemente de una relativa pobreza de información del metal quelato en galactosa oxidasa. La diferencia de espectro que está registrada con la enzima alquilada como referencia y la enzima natural como ejemplo es indistinguible -

de los espectros de absorbancia de las enzimas naturales, - en la alquilación desaparece virtualmente la absorbancia - del Cu (fig. 84). Se detectan algunas transiciones magnéticas y/o eléctricas con la enzima alquilada por medio de CD- (fig. 85). La falta de cambios en las energías de las transiciones en la absorbancia del Cu y además argumentos contra un cambio en la ligazón. El decremento en transición - probablemente puede estar mejor racionalizado para el Cu - quelato suponiendo una geometría más centrosimétrica. En - un evento, en adición a sus partes como una base específica catalítica, la histidina afectada probablemente también influya la actividad a través de una parte crítica en el mantenimiento de la conformación del quelato de Cu.

La galactosa oxidasa puede ilustrar cuantos li-- gandos, geometría y grupos del sitio activo que simultáneamente proporcionan las bases para las propiedades de estructura-función de un sitio activo metálico. La figura 86 resume las interacciones recíprocas que pueden pertenecer al quelato de Cu y los grupos del sitio activo en la oxidasa.

Una representación del sitio activo que tiene estos elementos estructurales se observa en la figura 87. De estudios espectrales y de modelos se ha sugerido a los li-- gandos en el plano. La influencia del Cu en el triptofano se muestra por diferencia de absorbancia y en el quantum de fluorescencia producido. En la modificación con NBS se - vuelve a demostrar la influencia crítica del triptofano en el quelato de Cu. La sobreposición espectral entre el es-- pectro de fluorescencia del triptofano y la absorbancia del Cu en los 314 nm permitió estimar la distancia entre estos grupos por cálculos de transferencia de energía Förster. - El triptofano probablemente está a 12 Å, pero a esta misma distancia pudiera haber un contacto de unión con un subs- - trato de azúcar. Más probablemente, el anillo indol es un

componente del agrupamiento del sitio activo de las cadenas laterales hidrofóbicas que son críticas a la conformación del sitio activo completo.

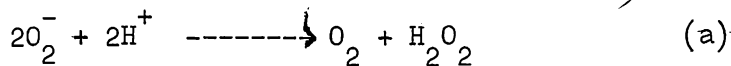
Se ha sugerido que la actividad de la estructura-función corresponde únicamente a los residuos de triptofano en otras proteínas de Cu. Además, el triptofano que es extinguido por la inducción del átomo de Cu en la azurina no está aparentemente en contacto con el anillo indol, como es probado por el cambio del metal y los resultados de fosforescencia.

La oxidación de este triptofano en la galactosa oxidasa también impide la alquilación del residuo histidina que puede transformar notablemente y afectar la producción del quantum de fluorescencia de este triptofano y casi desaparece la absorbancia del átomo de Cu, y este mismo átomo de Cu es esencial para la reactividad de esta histidina. Así, parece que tenemos un grupo consistente de componentes altamente interdependientes. Inesperadamente el sitio de Cu no puede ser totalmente entendido sin considerar sus interacciones con grupos proteínicos no ligados.

#### SUPEROXIDO DISMUTASA

Hay un gran interés en la bioquímica y en la relevante química de coordinación de las proteínas de Cu, las cuales están ampliamente distribuidas entre las plantas y animales involucradas en el metabolismo del oxígeno, en su transporte y uso.

Una de estas proteínas más activamente estudiadas es la superóxido dismutasa de eritrocito bovino. Esta enzima cataliza la dismutación del ión superóxido, como lo indica la siguiente reacción.



Por la expulsión del  $\text{O}_2^-$ , se propuso a la superóxido dismutasa como la protectora respiratoria de las células contra la peligrosa reactividad de este ion. Conocida por sus propiedades antiinflamatorias la enzima es utilizada comercialmente como la droga "orgoteina" usada para el tratamiento de - desordenes ortopédicos en caballos y perros. Actualmente - es investigada para un posible uso humano bajo el nombre co - mercial de "ontoseina".

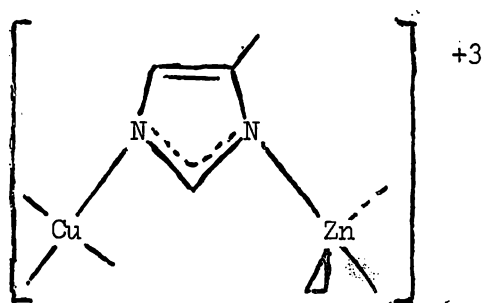
Probablemente se ha conocido más de la superóxido dismutasa que de cualquier otra proteína de Cu, y es sólo - una de las cuales es utilizada para información estructural por rayos X (tabla XIV).

#### Estructura del Sitio Activo

La secuencia de aminoácidos completa (tabla XV), - estructura de subunidades, y estructura cristalina de rayos X a una resolución de 3 Å se conocen de la superóxido dismutasa de eritrocito bovino. La enzima consiste de dos subunidades idénticas de un peso molecular de 15700 daltons, - cada una de las cuales tiene un átomo de Cu y uno de Zn. - Se muestra esquemáticamente una descripción de la cadena - peptídica en la región del sitio activo (fig.88). La geometría de coordinación del Cu es cuadrada planar distorsionada con átomos donadores nitrógeno contribuyendo desde imidazoles de cadenas laterales de cuatro residuos de histidina. La cadena peptídica His-Val-His con His 44 y 46 en posición trans, bloquean completamente uno de los lados del plano de coordinación de ataques de ligandos. El lado opuesto es - utilizado para unir un quinto ligando y hay evidencias de - coordinación de anión y agua en el sitio en la enzima natural. El ion Zn tiene un medio tetraédrico, con cuatro áto-

mos donadores, tres nitrógenos de histidina y un oxígeno de Asp 81. Ambos, Cu y Zn pueden ser cambiados reversiblemente por diálisis contra EDTA a un pH bajo para formar la apo proteína.

Una característica notable de la estructura del sitio activo de la superóxido dismutasa bovina es el anillo imidazol desprotonado de His 61 que hace puente entre los dos iones metálicos:



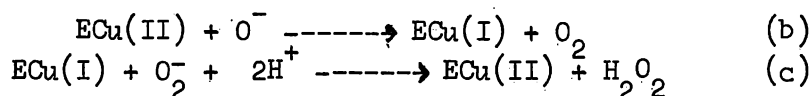
Los anillos imidazol de His 44, 46 y 118 son aproximadamente normales a el plano de coordinación del Cu, mientras la mitad del imidazolato de His 61 está girado aproximadamente paralelo al plano y no puede ser precisamente coplanar con el. Datos adicionales de rayos X de alta resolución deberán proporcionar más detalles de la estructura del sitio activo.

#### Mecanismo y Cinética de la Enzima: Acción del Cobre

El Cu tiene acción directa en el mecanismo catalítico. El cambio completo del Cu y el Zn destruye la actividad de la enzima que puede ser restaurada por adición del ion cúprico pero no de otro metal. Se han usado métodos de pulso radiolítico para generar el ion superóxido y seguir la cinética de la enzima. La reacción es de segundo orden con una constante de velocidad de  $2.37 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a  $-25^\circ$ , independiente del pH en el rango 4.8-9.5. El mecanis-



mo que ha sido propuesto se sigue en dos pasos para explicar la actividad de la enzima:



En este mecanismo, el cobre divalente es reducido por el ion superóxido en el primer paso y reoxidado en el segundo-paso con el acompañamiento de la reducción del ion superóxido a peróxido de hidrógeno. La protonación del ion  $\text{O}_2^-$  generada en la reacción c proporciona la fuerza de impulso termodinámico. Como se muestra en la tabla XVI, los iones metálicos tienen un potencial de reducción entre  $-0.36 \text{ V}$  (para el acoplamiento  $\text{O}_2/\text{O}_2^-$ ) y  $+0.90 \text{ V}$  (para el acoplamiento  $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ ) que son capaces termodinámicamente de catalizar la dismutación del ion superóxido. Ambos, el ion cúprico libre y de la enzima que une Cu caen en este rango, y son utilizados discusiones de los hechos que afectan los potenciales de reducción de los complejos de Cu. El peróxido de hidrógeno producido en la reacción c puede ser peligroso para las células vivas, pero es expulsado por la enzima catalasa. La catalasa y la superóxido dismutasa se cree actúan acopladas para proteger la respiración celular de los productos tóxicos en el metabolismo de oxígeno.

### Acción del Zinc

Hasta entonces sólo el Cu está involucrado en el mecanismo de la enzima, pero la acción del Zn también es de interés. Una posibilidad es que principalmente tiene una acción estructural, organizando la conformación polipeptídica en la región del sitio activo. Esta posibilidad es su-puesta por estudios de estabilidad térmica y por recientes-trabajos químicos de resonancia magnética nuclear. El -

reactivo dietilpirocarbonato (DEP) reacciona con histidina en las proteínas para producir una fuerte absorbancia en el UV a 242 nm (fig.89). En el caso de la unión de histidina - al Cu o Zn, es probable que la unión metal-imidazol se impidiera en esta reacción. El doblamiento de la cadena también puede impedir o inhibir la reacción de DEP con la histidina. Puesto que, seis de los ocho residuos de histidina por subunidad de superóxido dismutasa están en el sitio activo (tabla XV, fig.88), el reactivo DEP ofrece un camino - para probar la estructura química del sitio activo. Como se ve en la figura 90, las 8 histidinas por subunidad están etoxiformiladas cuando al DEP se le permite reaccionar con la apoenzima. En la enzima natural sólo un residuo histidina por subunidad puede ser modificado, como se reportó anteriormente. La modificación más probable ocurre en His 19, - la cual por estudios estructurales de rayos X ha mostrado - estar expuesta al solvente. La adición de uno o más equivalentes por subunidad de Zn divalente en la apoproteína reduce el número de residuos histidina etoxiformilados a uno. - Este resultado sugiere que el Zn sólo puede reconstruir mucho de la estructura original de la cadena peptídica en la región del sitio activo, bloqueando el acceso al reactivo - DEP.

La mejor base para esta interpretación, sin embargo, se deriva de estudios de resonancia magnética nuclear - de protón MHz-220 de superóxido dismutasa bovina en H<sub>2</sub>O. - Como se ve en la figura 91, resonancias bien resueltas son - observadas entre 7 y 11 partes por millón en campo reducido desde el disolvente. El espectro de resonancia magnética nuclear de la enzima natural consiste de dos absorciones anchas características debidas a la presencia del ion Cu(II)-paramagnético. En contraste, el espectro de la forma reducida Cu(I) de la enzima natural tiene varias bandas de resonancia bien resueltas en esta región. Estas son señaladas-

como protones (pirrol) de histidina N-H sobre las bases del efecto del ion paramagnético y el cambio químico. Puesto que, la His 19 está expuesta al disolvente, su velocidad de cambio es probablemente muy rápida para permitir la observación de sus hidrógenos pirrólicos por resonancia magnética nuclear. Esta conclusión es supuesta por el espectro de resonancia magnética nuclear de la enzima natural etoxiformilada reducida, que es idéntica a la superóxido dismutasa sin modificar. El espectro de resonancia magnética nuclear de protón de la aporpotéina es ancho y relativamente característico (fig. 91). En ausencia de los iones metálicos, la estructura del sitio activo está aparentemente desorganizada, lo cual puede permitir rápidos cambios de protones de histidina y entonces las líneas se hacen anchas. La adición de únicamente 1 mol de Zn(II) por subunidad, resulta en una serie de líneas estrechas algo más similares a las de la enzima natural reducida y ayuda la adición de Cu a la solución para la reconstrucción del espectro de resonancia magnética nuclear de la superóxido dismutasa oxidada. Además, parece que el Zn sólo puede doblar la cadena peptídica alrededor del sitio activo en una conformación que recuerda a la proteína natural. Más aun, la cualidad del espectro mostrada en la figura 91 sugiere que la resonancia magnética nuclear de protón será usada en estudios futuros destinados para probar los detalles del mecanismo de la enzima.

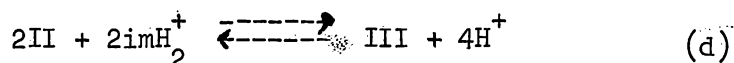
Otra acción del Zn es sugerida por la conocida habilidad de los iones metálicos para atenuar los valores de  $pK_a$  de los hidrógenos pirrólicos del grupo imidazol. El  $pK_a$  de estos hidrógenos es 14.4 en histidina, 11.7 en Cu(L-His)<sub>2</sub>, y 10.8 en ((en)Pd(L-His))<sup>+</sup>. La substitución del hidrógeno pirrólico por un ion metálico ocurre aproximadamente a un pH de 9.6 en solución neutra de complejos de Ni(II), Cu(II), y Pd(II) de glicil L-histidina y a valores de pH bajo para cationes como (Cu<sub>2</sub>(bpim)(im))<sub>2</sub><sup>+4</sup>. Así en -

la enzima, el Zn substituido en el anillo imidazol de histidina 61 puede preferir unirse a la mitad  $((\text{His})_3\text{Cu}(\text{II}))$  en lugar de a un protón, pero puede unirse a un protón en preferencia de  $((\text{His})_3\text{Cu}(\text{II}))$ , el cual es el producto del paso de reducción en la reacción b. Esto probablemente requiera que el puente imidazolato esté roto durante la reorganización de la enzima produciendo el mecanismo mostrado en la figura 92. No hay sin embargo una evidencia directa para este mecanismo, pero se ha sugerido que el puente imidazolato en la enzima oxidasa puede estar roto a pH bajo. La reducción química de la enzima es acompañada por la captura de un protón por subunidad, y una reacción de desdoblamiento del puente pudiera concordar con los resultados. El mecanismo mostrado en la figura 92 fue recientemente postulado independientemente de un reporte de la inactivación del peróxido de hidrógeno por superóxido dismutasa bovina. Una ventaja en la abertura del puente durante la reacción b es que la reacción c puede proceder por un mecanismo de transferencia de electrón en la esfera interior, con el ion superóxido uniéndose en el sitio vacío en la esfera de coordinación del Cu antes de transferir su electrón. Si el puente (o alguna otra) unión del Cu no es rota en la reacción b, el ion superóxido puede presumiblemente ser reducido por un proceso de esfera exterior en la reacción c, puesto que el Cu(I) es poco probable que se convierta al estado de transición penta-coordinado. Estudios cinéticos de la oxidación de compuestos cuprosos parecidos con oxígeno, mostraron que la reacción ocurre por un mecanismo de transferencia de electrón en la esfera interior.

#### Puente Imidazolato con Complejos de Cu(II)

Estudios cinéticos han mostrado que el ion cúprico libre en solución acuosa puede catalizar la dismutación del ion superóxido a una velocidad con exceso de enzima. -

La velocidad puede ser substancialmente disminuida cuando - el Cu está atacando a los ligandos aminoácidos quelatos, - sin embargo, sugerencias en algunos aspectos del sitio activo de la enzima que conserva la habilidad inherente del - ion cúprico a catalizar la reacción a. La presencia de un - ligando imidazolato como puente es uno de tales aspectos - que pueden ser probados en un sistema modelo. Estudios recentes, sintéticos y estructurales del puente imidazolato - en la especie II de dicobre(II) sugieren que la dimeriza-ción es reversible en la presencia de imidazol (imH) para - formar III, en la reacción d.



Estudios estructurales de rayos X del  $(\text{Cu}(\text{bpim})(\text{im}))_2(\text{NO}_3)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  establecen la presencia de puentes imidazolato en - III, figura 93. Soluciones de este compuesto reversible toman cuatro protones entre los puntos finales a pH 9.75 y - 4.25, consistente con la reacción d. Estudios de sensibilidad magnética muestran que los centros de Cu(II) en III están acoplados antiferromagnéticamente, como un resultado - análogo al descubierto en la forma 4 de Cu(II) en superóxido dismutasa bovina. Estudios continuados de esto y de solubilidad relativa, en los complejos de puente imidazolato - pueden ayudar a proporcionar evidencias en el mecanismo catalítico de la histidina unida al centro del sitio activo - Cu-Zn de la superóxido dismutasa bovina.

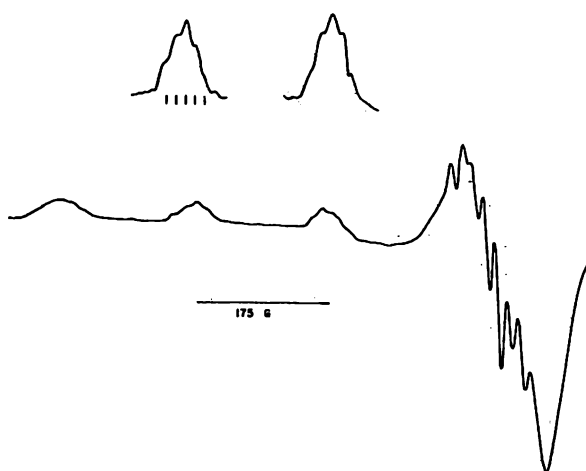
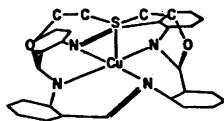


Figura 77. Espectro ESR de oxidasa galactosa a  $5 \times 10^{-4}$  M.  $T=100^\circ\text{K}$  en 6 registros promedio. Arriba se muestra la segunda y tercera líneas y las 5 líneas superfinas.



Cu (TAAB) + S  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ONa})_2$

Figura 78. Modelo Cu  $(\text{N}_4\text{S})$

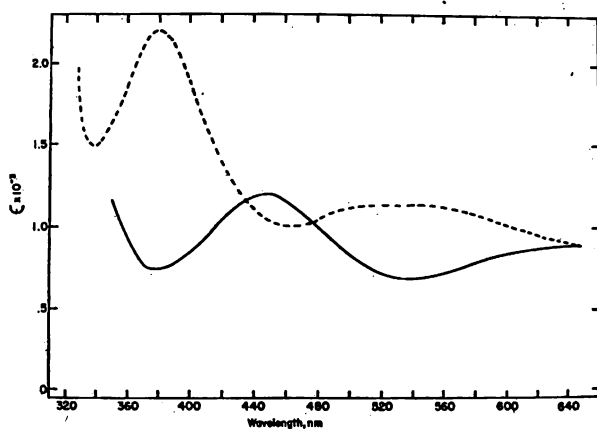


Figura 79. Espectro de absorbancia de Cu en oxidasa galactosa (—) y la enzima en presencia de azida de sodio (---). Registro en una celda de 5 cm.

TABLA XI. Estereoquímica de la Ligadura del  $CN^-$  (y Estabilidad de Oxido-Reducción) de Complejos 4- y 5-Coordinados de  $Cu(II)$ .

Complez	Ligand Type	Symmetry	$A_{22} - \epsilon_{22}$	CN <sup>-</sup> Effects	
				1:1 Complez	Excess
Cu(TAAB)[S(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>a</sup>	N <sub>4</sub> S	C <sub>4v</sub> (pseudo)	144/2.160 <sup>a</sup>	no	stable
Cu(TAAB)[O(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	N <sub>4</sub> O	C <sub>4v</sub> (pseudo)	145/2.159 <sup>a</sup>	no	stable
Cu(TAAB)[CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CJ <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	N <sub>4</sub> N	C <sub>4v</sub> (pseudo)	179/2.171 <sup>a</sup>	no	stable
Cu(TAAB)[CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	N <sub>4</sub>	C <sub>4v</sub> (pseudo)	144/2.160 <sup>a</sup>	no	stable
Cu(tren-OH)BPh <sub>4</sub> <sup>a</sup>	N <sub>4</sub> O	C <sub>3v</sub> (pseudo?)	163 <sup>a</sup>	?	reduces Cu(II) → Cu(I)
Cu(F <sub>3</sub> Ac) <sub>2</sub> en <sup>b</sup>	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	rhombic planar (C <sub>2v</sub> )	187.2/2.220 <sup>b</sup>	no	reduces Cu(II) → Cu(I)
Cu(Ac) <sub>2</sub> en <sup>c</sup>	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	rhombic planar (C <sub>2v</sub> )	211/2.186 <sup>c</sup>	no	reduces Cu(II) → Cu(I)
Cu(tren-NH <sub>2</sub> Ph)BPh <sub>4</sub> <sup>a</sup>	N <sub>4</sub> N	C <sub>3v</sub> (pseudo)	163/2.244 <sup>a</sup>	?	reduces Cu(II) → Cu(I)
Galactose oxidase	N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (?)	rhombic planar (C <sub>2v</sub> )	173/2.273	yes	stable

<sup>a</sup> Values in Gauss.

<sup>b</sup> See Figure 2 and Refs. 23 and 24 for explanation of terminology.

<sup>c</sup> tren-NH<sub>2</sub>Ph-(2,2',2''-triiminotriethylamine-phenylamine)copper(II).

<sup>d</sup> Ph = -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

<sup>a</sup> (F<sub>3</sub>Ac)<sub>2</sub>en = N,N'-ethylenebis(trifluoroacetylacetoniminato)copper(II).

<sup>b</sup> (Ac)<sub>2</sub>en = N,N'-ethylenebis(acetylacetoniminato)copper(II).

<sup>c</sup> Data in DMF solvent.

<sup>d</sup> Data in C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH solvent.

TABLA XIII. Transiciones Electrónicas Presentadas por Galactosa Oxidasa.

Absorbance			Circular Dichroism		
$\lambda$ (nm)	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	$[\theta]$ ((deg cm <sup>2</sup> )/ dMol)
314	31,800	1,370	314	31,800	+18,900
445	22,500	1,155	395	25,300	+3,000
630	15,900	1,015	500	20,000	+1,500
775	12,900	905	610	16,400	-8,200

<sup>a</sup> Data from Ref. 27.

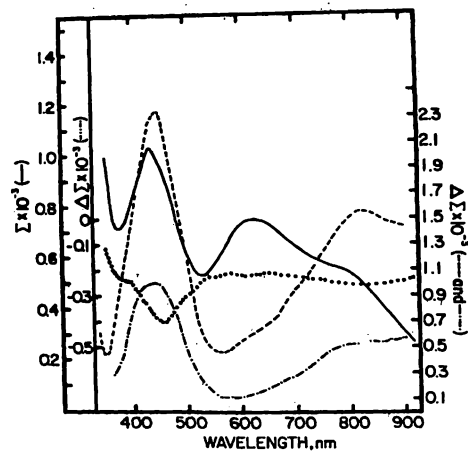


Figura 80. Espectro de absorbancia visible de galactosa oxidasa (—) y espectro de diferencia - absorbancia con proporciones molares de 5:1 de - ferricianuro (---), ferrocianuro (···), y de ambos (-.-).

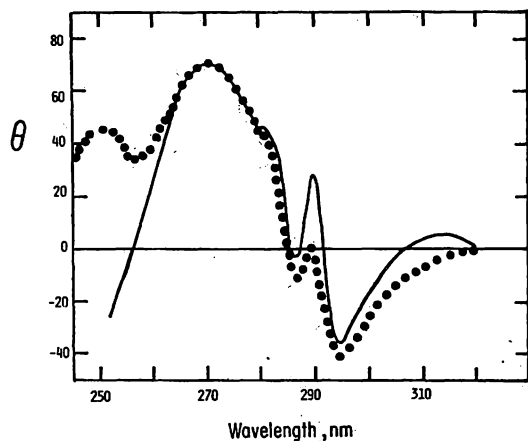


Figura 82. Espectro CD en el UV-cercano de galactosa oxidasa en 0.1 M de fosfato de sodio pH 7 (—) y la enzima modificada con NBS (..).

TABLA XIII. Parámetros de Espin Hamiltoniano para Galactosa Oxidasa Natural Ligada y No-Ligada.

Enzyme Form/Ligand (Ratio)	$A_{xx}$	$g_{xx}$	$A_{yy}$	$g_{yy}$	$A_{zz}$	$g_{zz}$
Native <sup>a</sup>	176.5	2.273	28.8	2.048	30.1	2.058
CN <sup>-</sup> (1:1)	155.8	2.226	41.6	2.035	45.2	2.048
N <sub>3</sub> <sup>-</sup> (100:1)	166.8	2.262	27.2	2.049	27.9	2.040
NBS oxidized <sup>b</sup>	166.0	2.267	38.0	2.055	43.0	2.065
CN <sup>-</sup> reduces Cu (II)						
Iodoacetamide alkylated <sup>c</sup>	177.8	2.268	30.5	2.035	30.6	2.064
CN (1:1)	160.1	2.234	38.8	2.041	43.0	2.051

<sup>a</sup> Spectra were obtained on a Varian E-9 X-band spectrometer at 110°K with a 100-KHz modulation amplitude of 2 Gauss and a microwave power of 30 mw at 9.5 GHz with proton Gauss meter and frequency counter for spectral marking.

<sup>b</sup> (22).

<sup>c</sup> (42).

<sup>d</sup> (44).

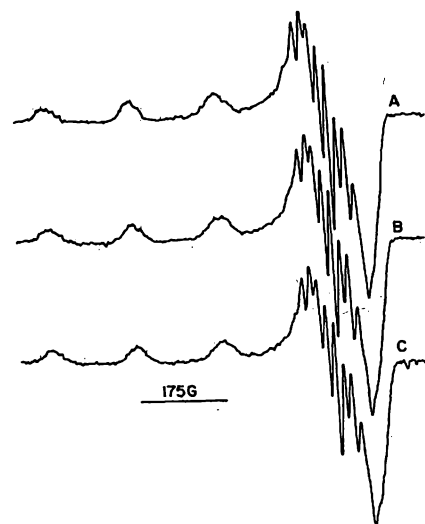


Figura 81. Espectro ESR de galactosa oxidasa (A) y galactosa oxidasa con ferricianuro 1:1 (B) y 1:6 (C) moles



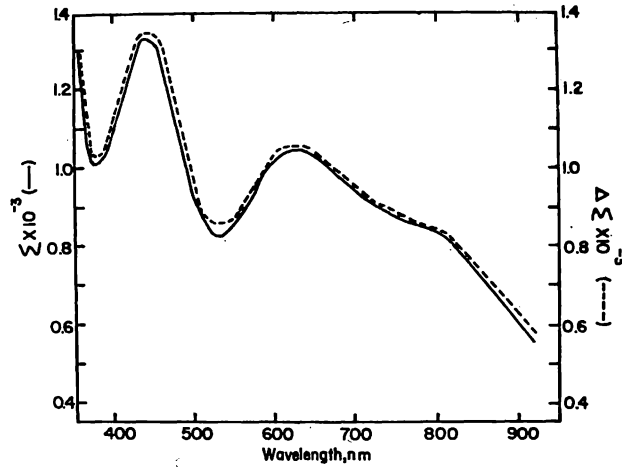


Figura 84. Espectro de absorbanca de Cu de galactosa (—) y diferencia de absorbanca con la enzima alquilada como referencia y sin modificar como problema (----).

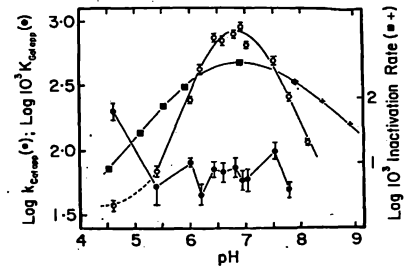


Figura 83. Gráfica de los valores dependientes del pH para la velocidad de oxidación de -me til-D-galactopiranosida en 1.4 mM O<sub>2</sub> por galactosa oxidasa y la velocidad de inactivación de galactosa oxidasa por 1 mM yodoacetamida.

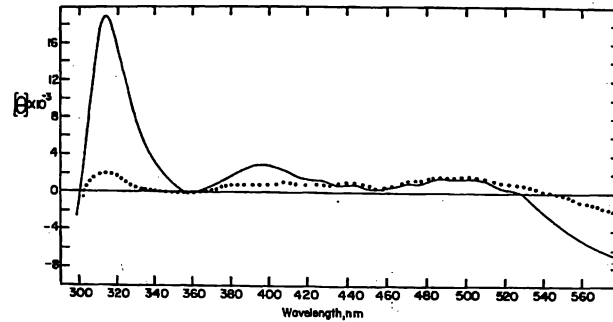


Figura 85. Espectro CD de galactosa oxidasa (—) y enzima alquilada (...).

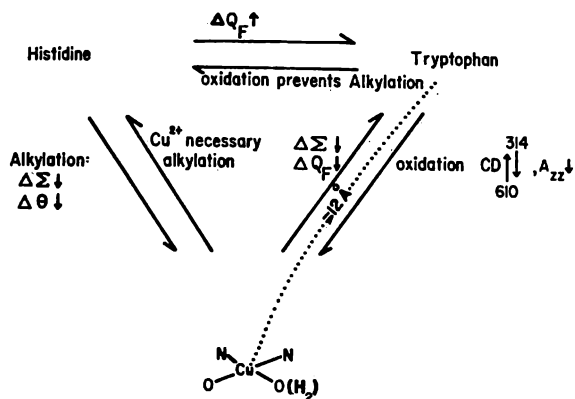


Figura 86. Resumen de las interacciones interdependientes entre los tres grupos propuestos para el sitio activo.  $Q_F$  = quantum de fluorescencia.  $\Delta E$  = diferencia de absorbancia.  $\Delta \theta$  = cambio en elipticidad (CD). La estimación de la distancia es derivada de métodos de transferencia de energía fluorescente.

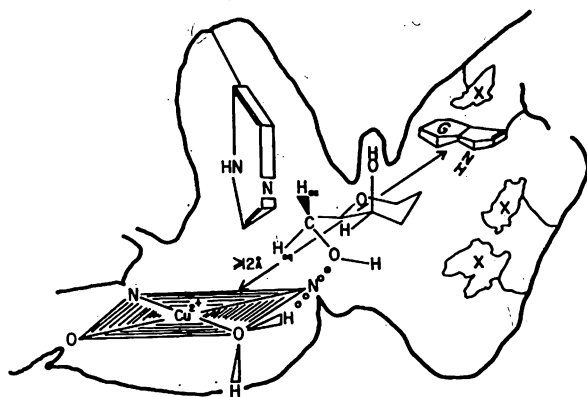


Figura 87. Representación gráfica del sitio activo que incluye un complejo de Cu tetra-coordinado, unido a la esfera exterior un sustrato azúcar con el Cu, anillos imidazol e indol, y una lateral no polar (X).



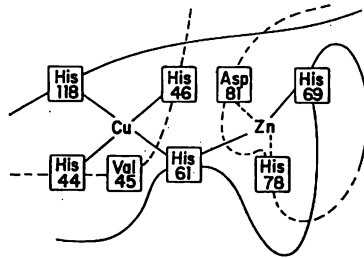


Figura 88. Sitio activo de la superóxido-dismutasa mostrando la coordinación de amino ácidos y una parte parcial de la cadena peptídica.

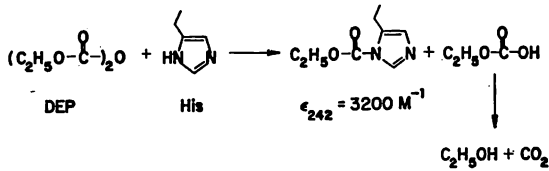


Figura 89. Reacción del dietilpirocarbonato (DEP) con histidina.

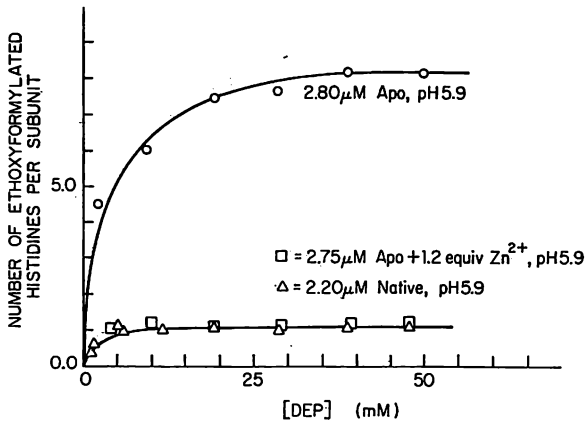


Figura 90. La etoxiformilación del residuo histidile en SOD bovina como función de la concentración inicial de DEP, pH 5.9. Las concentraciones de proteína apo y natural fueron 2.8 M y 2.2 M respectivamente.



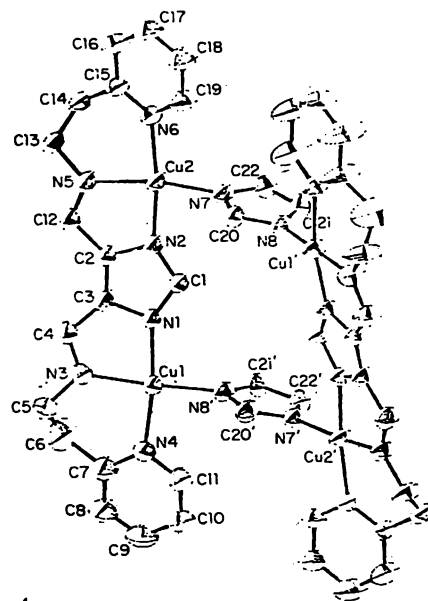
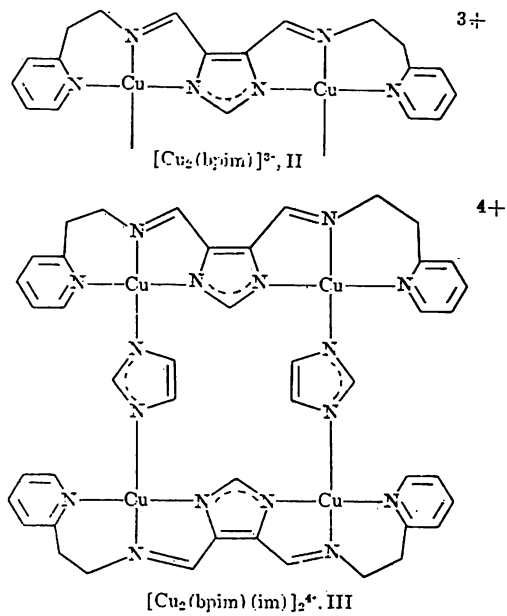


Figura 93. Estructura del dímico (Cu<sub>2</sub>(bpim)(im))<sup>2+</sup> determinada en un estudio de rayos X.

## IV

## COMPLEJOS PEPTIDICOS DE Cu(II) Y Cu(III)

Ya se conocía hace algún tiempo la unión del Cu - (II) a la cadena polipeptídica por coordinación de nitrógenos peptídicos desprotonados, pero recientemente se ha descubierto que esta coordinación facilita la formación de - Cu(III). En este capítulo se consideran estudios de complejos peptídicos de Cu(II), en particular aquellos reportados de una revisión general de este tema por Margerum y Dukes, - y resume el conocimiento presente de los complejos peptídicos de Cu(III).

La presencia de L-histidina como el tercer residuo aminoácido en complejos tripeptídicos de Cu(II) decrece fuertemente su sensibilidad al ataque nucleofílico y al ataque ácido. Así, el complejo doblemente desprotonado glicilglicil-L-histidina ( $\text{Cu}(\text{H}_{-2}\text{gli-gli-his})^-$ ) se muestra en la estructura I y es relativamente lento para reaccionar con el nucleófilo trietilenotetramina (trien) por lo tanto esta - reacción es siete veces más lenta que la reacción correspondiente con  $\text{Cu}(\text{H}_{-2}\text{gli-gli-gli})^-$ . La velocidad de disociación ácida del complejo gli-gli-his también es muchas veces más lenta que la del complejo gli-gli-gli. Sin embargo, se han descubierto caminos que son una combinación de ataque - por  $\text{H}^+$  y  $\text{H}_2\text{trien}^{+2}$ . Este mecanismo nucleofílico con un - protón asistente proporciona un tercer mejor camino para la transferencia del Cu(II) desde complejos peptídicos y es un buen camino para el cambio de unión del Cu(II) en el suero de albúmina. Los complejos peptídicos que tienen histidina proporcionan evidencias de importancia de la coordinación - axial al Cu(II) por grupos carboxilato. En adición, para - las reacciones a pH bajo, ocurre protonación "exterior" para dar  $(\text{Cu}(\text{H}_{-2}\text{gli-gli-his})\text{H})$  y  $(\text{Cu}(\text{H}_{-2}\text{gli-gli-his})\text{H}_2)^+$ , donde el oxígeno peptídico agrega protones.

Se ha propuesto al Cu(III) como un intermediario de alta reactividad para un número de oxidaciones orgánicas donde se usa Cu. Se han identificado pocos complejos de Cu(III) en estado sólido; por ejemplo:  $\text{KCuO}_2$ ,  $\text{K}_3\text{CuF}_6$ ,  $\text{Na}_3\text{KH}_3(\text{Cu}(\text{IO}_6)_2) \cdot 14\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CuBr}_2(\text{S}_2\text{CN}(\text{C}_4\text{H}_9)_2)_2$ . Se da una estructura cristalina detallada para los compuestos anteriores con el grupo ditiocarbamato (dtc) y dos  $\text{Br}^-$  formando una geometría cuadrada planar distorsionada alrededor del Cu(III). En el complejo peryodato cuatro de los oxígenos del peryodato forman un plano cuadrado alrededor del Cu(III) (Cu-O, 1.9 Å), y una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  (Cu-O, 2.7 Å) forma una quinta unión. Excepto para el  $\text{CuF}_6^{3-}$  los complejos de Cu(III) parecen estar en bajo espin, aunque  $\text{CuBr}_2(\text{dtc})$  tiene un momento magnético de 0.5 B.M.

Olson y Vasilekskis oxidaron electroquímicamente complejos macrocíclicos de tetramina en soluciones de acetonitrilo para dar especies de Cu(III) que son moderadamente estables pero sufren reducción espontánea a Cu(II). Mayers tein hizo complejos de Cu(III) de aminas y aminoácidos extremadamente reactivos en solución acuosa por pulsos de radiólisis. En el trabajo de Levitski, Anbar y Berger se usó el  $\text{IrCl}_6^{2-}$  como oxidante de péptidos de Cu(II). Los péptidos de Cu(III) se propusieron como intermediarios de la especie anterior en apoyo de la oxidación y fragmentación del péptido. Aislaron complejos cristalinos de Cu(III) de biuret y oxamida Bour, Birker, y Steggerda y proporcionaron algunas de las primeras evidencias de que el Cu(III) puede ser estabilizado por desprotonación de los grupos amida. Todos los compuestos fueron diamagnéticos.

La tabla XVII resume algunas de las propiedades espectrales del visible y UV de complejos de Cu(III). Se han observado bandas espectrales de alta intensidad, atribuidas a transiciones de transferencia de carga, para todos los -



complejos de Cu(III) en  $360 \pm 60$  nm. Sin hacer caso de los grupos de coordinación todos los complejos enlistados tienen como mínimo una banda de absorción en esta región espectral.

Burce, Paniago y Margerum fueron los primeros en observar la formación de un complejo peptídico de Cu(III) en la reacción de oxígeno con tetraglicina ( $G_4$ )-Cu(II) en solución neutra. Anteriormente con la tetraglicina-Ni(II) se catalizó la captura de oxígeno. La reacción de tetraglicina-Cu(II) con oxígeno es inusual ya que es inhibida por la luz. Falta que sea establecida la naturaleza exacta de esta inhibición fotoquímica, pero en la oscuridad un color verde amarillo intenso se forma al reaccionar con el oxígeno. Esta especie amarilla pasada continuamente por una columna intercambiadora de iones Chelex, que cambia cuantitativamente todas las formas de Cu(II). El líquido amarillo contiene Cu y tiene propiedades oxidantes. En la solución estándar se genera Cu(II) y tetraglicina lo mismo que algunos productos de oxidación peptídica.

Otros agentes oxidan y pueden convertir al ( $G_4$ )-Cu(II) a ( $G_4$ )-Cu(III) incluyendo al  $S_2O_8^{2-}$  y el  $IrCl_6^-$ . La reacción con  $IrCl_6^-$  es cuantitativa bajo condiciones adecuadas y se usó para probar que los complejos peptídicos de Cu(III) pueden ser formados y caracterizados en soluciones acuosas. La oxidación electroquímica es más eficiente y evita la necesidad de quitar el complejo de Ir. Los complejos peptídicos de Cu(III) se han caracterizado por:

(1) Pérdida de bandas espectrales de Cu(II) y la formación de bandas de absorción intensa en 350-370 nm.

(2) Pérdida de señal de resonancia paramagnética de electrón.

(3) Reacciones de óxido-reducción reversibles Ir(IV)-Ir(III) como función del pH.

(4) Reacciones lentas con ácidos y con resinas - cambiadoras de ion Chelex.

(5) 100% de recuperación del péptido original después de la reacción con agentes reductores.

(6) Capacidad de óxido-reducción con una variedad de substratos.

(7) Determinaciones de absorptividad molar

(8) Voltametría cíclica.

(9) Cinética de descomposición en ácidos y bases.

(10) Cambios espectrales y determinaciones de  $pK_a$  en base fuerte.

Estos estudios mostraron que los complejos peptídicos de Cu(III) tienen potenciales de electrodo relativamente bajos y sugieren que el Cu(III) puede ser un estado de oxidación mucho más común que los que se habían pensado como posibles. Además, las reacciones de descomposición de los péptidos de Cu(III) indican que la transición de dos electrones dan especies de Cu(I) que son posibles. Las reacciones de óxido-reducción de dos electrones en sistemas biológicos son intrigantes porque tienen alta energía, se evitan intermediarios de radicales libres. Sin embargo, se conoce muy poco de los posibles complejos de Cu(I). Son necesarios estudios con varios complejos modelo ya que el estado de oxidación es muy poco caracterizado en solución acuosa.

Hamilton ha sugerido al Cu(III) como un probable intermediario en la reacción catalizada por galactosa oxidada

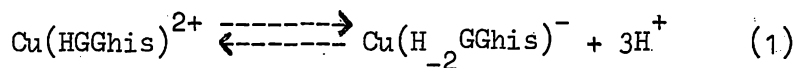
sa. Kosman observa una variación con esta interpretación.- Indiferentes de los éxitos de estas disputas y confiando en las pruebas de la existencia y propiedades de los complejos peptídicos de Cu(III) se animaron más las investigaciones - de la presencia de cobre trivalente en sistemas biológicos. Los trabajos demuestran que este estado de oxidación es alcanzado bajo condiciones biológicas.

### Complejos Peptídicos de Cu(II)

Constantes de estabilidad. Se han revisado previamente las constantes de formación de poliglicina-Cu(II). Se han redeterminado algunas de estas constantes pero básicamente están de acuerdo con los trabajos originales. Nuevas constantes son utilizadas para amidas peptídicas y para tripéptidos que tienen  $\beta$  alanina y glicina. La tabla XVIII resume las constantes acumulativas y de afinidad (log. de constantes de estabilidad y log de valores  $K_a$  para la formación de especies desprotonadas). Se han determinado algunas constantes para complejos bis-peptídicos. Los tripéptidos que tienen  $\beta$  alanina forman complejos más estables que las especies correspondientes de  $\alpha$  alanina o glicilo. Las estabildades relativas de los sistemas de anillo fundido en los quelatos desprotonados están en el orden 5-6-5(G.  $\beta$  -A. G)  $\gg$  6-5-5 ( $\beta$  -A'G'G)  $\gg$  5-5-6(G.G. $\beta$ -A)  $\gg$  5-5-5(G.G.G). Este efecto es similar al observado en complejos poliamina de Cu(II) y Ni(II) donde el quelato 5-6-5 es mucho más estable que el quelato 5-5-5 con anillos consecutivamente unidos y por la dificultad de formar la geometría cuadrada-planar más favorable alrededor del ion metálico.

Incluidas en la tabla XVIII están las constantes de estabilidad de gli-gli-L-His y sus derivados N-acetilo. En soluciones ácidas ambos ligandos usan el grupo imidazol para iniciar cualquier coordinación con el Cu. Las únicas -

constantes medidas para el modelo corresponden a la reacción 1 donde tres protones (uno de grupos amino protonados y dos de cadenas peptídicas) son perdidos simultáneamente - con  $K_3 = 10^{-14.65} M^3$ .



Aunque se estimaron constantes de afinidad para las constantes de ionización peptídica, estas se calcularon sobre bases estadísticas. Los valores de las constantes para N-acetilglicilglicil-L-histidina sugieren que estos calculos no son válidos. Aquí se estimo la constante de estabilidad acumulativa para  $Cu(H_{-2}GGhis)^{-}$  dada por la ecuación 2:

$$\frac{(Cu(H_{-2}GGhis)^{-}) (H^{+})^2}{(Cu^{2+}) (GGhis^{-})} = 10^{-2.2} M \quad (2)$$

desde la combinación de la primera constante de complejación para el grupo amino de  $GGhis^{-}$  ( $10^{8.22}$ ), y la constante para la reacción 1. Así, el complejo  $Cu(H_{-2}GGhis)^{-}$  es  $10^{4.5}$  veces más estable que el complejo  $Cu(H_{-2}GGhis)^{-}$  (que también tiene un sistema de anillos 5-5-6 miembros) porque el nitrógeno del imidazol forma una fuerte unión con el Cu más que con el grupo carboxilato.

#### Banda de Absorción d-d del Cu(II)

Billo correlacionó datos espectrales de los complejos peptídicos de Cu(II) con el tipo de grupos coordinados. La longitud de onda de la banda de absorción observada entre 500 y 740 nm varía con el número de grupos peptídicos desprotonados y grupos amina. La  $\nu_{max}$  (kK) de la banda d-d (espectro en solución acuosa) puede estar expresada como la suma de la contribución de campo ligando individual de los cuatro átomos donadores que definen el plano cuadra-

do con el Cu. En la ecuación 3 las n's se refieren al número de cada tipo de átomo donador.

$$V_{\text{obs}} = n_a V_{\text{N(peptido)}} + n_b V_{\text{N(amino)}} + n_c V_{\text{N(imidazol)}} + n_d V_{\text{o(carboxilato)}} + n_e V_{\text{o(peptido, H}_2\text{O ó OH}^-)} \quad (3)$$

(n = 4), y  $V_{\text{N(peptido)}} = 4.85$ ,  $V_{\text{N(amino)}} = 4.53$ ,  $V_{\text{N(imidazol)}} = 4.3$ ,  $V_{\text{o(carboxilato)}} = 3.42$ , y  $V_{\text{o(peptido, H}_2\text{O ó OH}^-)} = 3.01$ . El efecto de la coordinación axial por hidróxido, carboxilato o grupos amino es el cambio a energía baja de 1kK.

#### Coordinación Axial para Complejos Peptídicos de Cu(II)

Aunque la coordinación en un plano domina la termodinámica, la cinética y propiedades espectrales de los péptidos de Cu(II), la coordinación axial también es importante. Mientras los grupos carboxilato en  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{GG})^{-2}$  y  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{GGHis})^{-}$  (estructura I) no pueden alcanzar un sitio de coordinación axial, no es el caso para gli-gli-his-gli (estructura II) o para asp-ala-his-lis (estructura III) donde la coordinación axial cambia la reactividad química de los complejos. La constante de equilibrio para la proporción de carboxilato unido-libre,  $K_{\text{libre}}^{\text{unido}}$  es aproximadamente 100 para el  $\text{COO}^-$  terminal en estos tetrapéptidos. El aspartilo en la cadena lateral grupo  $\text{COO}^-$  tiene un valor  $K_{\text{libre}}^{\text{unido}}$  de 30, pero se reduce hasta 4 cuando otro grupo  $\text{COO}^-$  es trans como en la estructura III. Estas constantes se determinaron en estudios cinéticos.

Protonación "Exterior". Cuando los complejos peptídicos metálicos son puestos en solución ácida, se diso

cian. Los iones metálicos que son inactivos en sus reacciones de sustitución, como Ni (II), Pd(II) y Co(II) añaden protones a los oxígenos peptídicos antes de la disociación de la unión N-peptídico-metal. Se ha observado que cinéticamente es suficientemente inactivo el Cu(II) ( $H_{-2}GGhis$ ) en sus reacciones con ácido para permitir protonación exterior. Se han medido constantes de protonación de  $10^{4.2}$  y  $10^{2.3}$  y se cree que corresponden a las estructuras IV y V. La unión interna del hidrógeno del grupo carboxilato del residuo histidilo ayuda a estabilizar la forma protonada externa.

#### Cinética de Substitución de los Complejos Peptídicos de Cu(II).

Se han descubierto tres caminos principales de reacción para el desplazamiento del Cu de los complejos peptídicos-(1) transferencia de protón al grupo peptídico, (2) ataque nucleofílico sobre el Cu, y (3) una combinación de transferencia de protón y ataque nucleofílico. En cada caso hay un acompañamiento o subsecuente ruptura de la unión N-peptídico-metal. La velocidad de reacción para los tres mecanismos difiere en su dependencia del pH, general dependencia ácida, y dependencia nucleofílica.

Mecanismo de Transferencia de Protón. Los ácidos pueden reaccionar con el grupo N-peptídico-metal por adición rápida al oxígeno peptídico dando una especie protonada externa, que se rearregla por ruptura de la unión nitrógeno-metal. Alternativamente los ácidos pueden transferir un protón directamente a el átomo de nitrógeno desprotonado acompañado por la ruptura de la unión nitrógeno-metal. La reacción anterior es más lenta que las velocidades normales de transferencia de protón pero puede a pesar de esto ser el camino cinético preferido por la rápida ruptura de la

unión nitrogen-metal. Diferentes complejos peptídicos de  $\text{Cu(II)}$  muestran diferentes mecanismos. Cuando la reacción de transferencia de protón directa es el paso de velocidad-determinante, también se observa una catálisis ácida general. Este es el caso para la reacción de  $\text{Cu(H}_2\text{H}_3)^-$  con ácidos. En otro caso las reacciones de  $\text{Cu(H}_2\text{GGhis)}^-$ ,  $\text{Cu(H}_2\text{GGhisG)}^-$ , y  $\text{Cu(H}_2\text{asp-ala-his-lis)}$  no son catalizadas generalmente por ácidos y en un pH bajo muestran evidencias cinéticas de protonación externa como se observa en la figura 94. El paso determinante de la velocidad para estos complejos peptídicos que tienen histidilo requiere dos protones que se adicionen a los nitrógenos peptídicos, mientras la amina y el imidazol finales de los oligopeptidos son coordinados, así como en la disociación, el  $\text{Cu(II)}$  puede ser descrito como un "saltador" sobre el ligando para dar la estructura - VI.

**Ataque Nucleofílico.** Estas reacciones son caracterizadas por una dependencia de la concentración del nucleófilo y por un incremento de la velocidad debido a un incremento en el pH. La dependencia del pH para la reacción de trien con  $\text{Cu(H}_2\text{G}_3)^-$  es típica y está dada por la curva A en la figura 95 para la reacción de  $3 \times 10^{-3}$  M de trien. La utilidad de un sitio ecuatorial (de un grupo que es desplazado fácilmente desde un sitio ecuatorial) es importante en el ataque nucleofílico. Ligandos amina quelatos son particularmente efectivos como nucleófilos, pero estas reacciones son sensibles a los efectos estéricos bloqueando el sitio ecuatorial útil. El correspondiente ataque nucleofílico directo pro trien sobre  $\text{Cu(H}_2\text{GGhis)}^-$  es siete veces más lento y está dado por la línea A' (pH 10-12) en la figura 95. Como resultado de la lenta reacción nucleofílica con  $\text{Cu(H}_2\text{GG-his)}^-$  y su inactividad a la reacción de disociación ácida (curva B') es posible observar otro mecanismo de reacción, el camino nucleofílico de asistencia de protón, desde un pH de 6 a 9 (curva C).

### Mecanismo Nucleofílico de Asistencia de Protón.

La velocidad de reacción entre trien y  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{Gghis})^-$  se incrementa abajo de un pH de 9 (curva C, figura 95) en contraste a la conducta de  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{G}_3)^-$  (curva A). La velocidad nucleofílica de asistencia de protón ( $\text{M seg}^{-1}$ ) es igual a  $1.7 \times 10^9 (\text{H}^+) (\text{H}_2\text{trien}^{2+}) (\text{Cu}-(\text{H}_2\text{GGhis})^-)$ . Como se incrementa la concentración de trien, la dependencia de la velocidad en trien desciende directamente (fig. 96) y la velocidad de transferencia de protón se vuelve limitada. Abajo de un pH de 7 empieza a formarse  $\text{H}_3\text{trien}$ , efectivamente cambiando el nucleofilo y en la vecindad de un pH de 5-6 el camino de disociación ácida (curva B' fig. 95) tomá lugar sobre del camino nucleofílico de asistencia de protón. El mecanismo total se describe en la figura 97. La causa de que el camino nucleofílico de asistencia de protón no fuera detectado para la reacción de trien con  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{G}_3)^-$  puede ser observada en la figura 95. El camino nucleofílico directo (curva A) y el camino de disociación ácida (curva B) son también favorables y el camino nucleofílico de asistencia de protón contribuye muy poco. Sin embargo, para los péptidos que tienen histidina el camino de asistencia de protón es muy importante para reacciones con trien, EDTA, e histidina.

Transferencia del  $\text{Cu}(\text{II})$  desde Suero de Albúmina.- La cinética de transferencia del  $\text{Cu}(\text{II})$  desde sus complejos con suero de albúmina humana, suero de albúmina bovina, gli-gli-his, gli-gli-his-gli, y asp-ala-his-lis con trien, todos presentan conducta similar. Los modelos péptidos que tienen histidina en el primer sitio de unión del  $\text{Cu}(\text{II})$  en los sueros de albúminas, donde el  $\text{Cu}(\text{II})$  está coordinado a la terminal amina, a dos nitrógenos peptídicos desprotonados y al nitrógeno del imidazol del residuo histidilo. La coordinación de imidazol altera grandemente la conducta cinética del complejo de  $\text{Cu}(\text{II})$ . Todos los complejos reaccionan por un meca

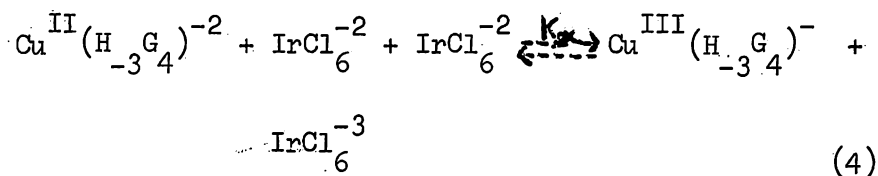


nismo nucleofílico de asistencia de protón a un pH fisiológico y los complejos de suero de albúmina son más seguros para transferir  $\text{Cu(II)}$  que los complejos tetrapéptidos. Así en la figura 98 la reactividad relativa a un pH de 7 a 8 es  $\text{gli-gli-his} \gg \text{BSA} \gg \text{gli-gli-his-gli} \gg \text{asp.alá.his.lis}$ . El sitio de unión del  $\text{Cu(II)}$  en BSA parece estar totalmente expuesto a la solución igual que cuando la proteína experimenta el cambio conformacional N a B entre un pH de 7 a 9. Las reacciones con trien y con otros nucleófilos involucran desplazamientos iniciado en posiciones peptídicas no terminales. Estas reacciones son sensibles a los ácidos, son relativamente insensibles a factores estéricos peptídicos y son influenciadas por coordinación axial de grupos carboxilato-útiles.

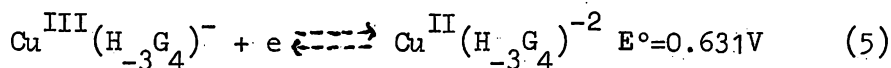
Complejos Peptídicos de  $\text{Cu(III)}$ . El oxígeno molecular reacciona con tetraglicina ( $\text{G}_4$ )  $\text{Cu(II)}$  en solución neutra para producir una especie amarilla con una banda intensa de absorción en 362 nm. Como el oxígeno es consumido en la solución, la cantidad de la especie amarilla decae (fig. 99). El espectro visible y UV, la absorptividad molar, la cinética de disociación en ácido y en base, y la conductividad de óxido-reducción de estas especies amarillas son similares a las de  $\text{Cu(III)} (\text{H}_3\text{G}_4)^-$ , que es generada por  $\text{IrCl}_6^{2-}$  o por oxidación electrolítica del complejo de  $\text{Cu(II)}$  correspondiente. Los productos peptídicos después del decaimiento del oxígeno que genero la especie amarilla también son similares a los formados cuando el  $\text{Cu(III)} (\text{H}_3\text{G}_4)^-$  decae en solución neutra. Estos productos incluyen una recuperación substancial de  $\text{G}_4$  sin reaccionar (50-70% dependiendo del pH) lo mismo que fragmentos peptídicos oxidados como glicilglicilnamida y glioxilglicina.

El complejo tetraglicina de  $\text{Cu(II)}$  es oxidado a  $\text{Cu(III)}$  por el  $\text{IrCl}_6^{2-}$  (fig. 100). El equilibrio de óxido-re-

ducción es reversible con cambio del pH. La dependencia del pH es un resultado del grado variable de protonación de los complejos tetraglicina de Cu(II), considerando que el complejo de Cu(III) está presente sólo como complejo peptídico triplemente desprotonado. Las curvas en la figura 100 corresponden a el equilibrio de óxido-reducción en la reacción 4 balanceada por el equilibrio ácido-base y de la complejación entre  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{HG}_4$ ,  $\text{CuG}_4^+$ ,  $\text{CuH}_- \text{G}_4$ ,  $\text{CuH}_- \text{G}_4^-$ , y  $\text{CuH}_- \text{G}_4^{2-}$ .



El valor de  $K_{\text{ox}}$  es  $2.7 \times 10^4$ , y el potencial de electrodo resultante para  $\text{Cu}^{\text{III,II}}$  es dado en la reacción 5. El bajo potencial y la estabilidad relativamente alta de esta especie de Cu(III) en solución acuosa es de interés especial.



Para confirmar que el Cu(III) estaba presente, se hicieron antes y después de la oxidación espectros de resonancia paramagnética de electrón (fig. 101). En este caso el complejo de pentaglicina se oxidó electroquímicamente a pH de 10 usando una columna con una capa de grafito trabajando el electrodo con un voltaje aplicado de 0.9V. La desaparición de la señal de resonancia paramagnética de electrón del Cu(II) sobre la correspondiente oxidación a la formación esperada de un complejo de bajo espín  $d^8$  de Cu(III).

El iridio puede ser quitado de las soluciones peptídicas de Cu(III) al pasarla continuamente por columnas cambiadoras de aniones. El complejo  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_- \text{G}_4)^{-}$  es mu--

cho más lento para descomponerse en ácido que el complejo -  $\text{Cu(II)} (\text{H}_{-3}\text{G}_4)^{-2}$ . En soluciones neutras a 25°C la vida media del  $\text{Cu(III)} (\text{H}_{-3}\text{G}_4)^{-}$  es aproximadamente de 1 hora. La velocidad de descomposición se incrementa lo mismo en la base que en el ácido. La cinética de sustitución del complejo de  $\text{Cu(III)} \text{d}^8$  es claramente más lenta que la correspondiente a los complejos  $\text{Cu(II)}$ . Este hecho fue usado en la selección de resinas cambiadoras de iones Chelex para quitar el  $\text{Cu(II)}$  del  $\text{Cu(III)}$  y en orden para determinar la absorptividad molar de  $\text{Cu(III)} (\text{H}_{-3}\text{G}_4)^{-}$ . Estos valores de  $7200 \pm 300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 365 nm fueron chequeados por otros métodos.

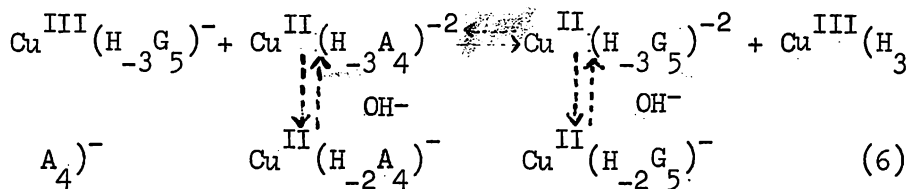
La voltametría cíclica es un camino conveniente para medir los valores de  $E^\circ$  para el acoplamiento  $\text{Cu}^{\text{III,II}}$ . Un electrodo de pasta de carbono da una conducta cuasi-reversible como se muestra en la figura 102. Para comprobar estos valores de  $E^\circ$  se hicieron experimentos voltamétricos que son válidos, cinco complejos peptídicos fueron examinados por dos métodos con  $\text{IrCl}_6^{-2}$  -pH limitado y electroquímicamente (tabla XIX). El acuerdo de los valores de  $E^\circ$  determinados por los dos métodos es excelente igual que la separación de pico a pico de la oxidación y ondas de reducción ( $\Delta mV$ ) que fueron significativamente más grandes de 60 mV. El efecto de variación, la naturaleza de los grupos coordinados sobre el  $\text{Cu}^{\text{III,II}}$  y el potencial se observan en la tabla XX. Como el número de grupos peptídicos desprotonados se incrementan, los valores de  $E^\circ$  decrecen. Los derivados N formilo con el equivalente de cuatro grupos peptídicos desprotonados coordinados al Cu tienen un valor  $E^\circ$  más bajo de 0.55 V. Los derivados N-formilo consistentemente bajan los valores de  $E^\circ$  (tabla XXI). El uso de residuos alanilo y valilo en lugar de residuos glicilo en la cadena peptídica también bajan los valores de  $E^\circ$ . Como se observa en la tabla XXII, la efectividad relativa dada en potenciales ba

jos es  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \gg \text{CH}_3 \gg \text{H}$ . El volumen del grupo R favorece la coordinación al pequeño ion metálico ( $\text{Cu}(\text{III})$ ) que puede ser un factor.

El efecto de pH alto sobre soluciones de complejos poliglicina de  $\text{Cu}(\text{III})$  es esencial porque hay un cambio de color amarillo a rojo en un pH de 11 a 12. Este cambio de color puede ser observado hasta el cuarto y último por adición alternativa de ácido y base. El espectro del complejo rojo es difícil obtenerlo por los métodos convencionales por la rápida reacción de óxido-reducción de la especie de  $\text{Cu}(\text{III})$  en pH alto. En 28 seg toda la especie de  $\text{Cu}(\text{III})$  desaparece. Sin embargo, la figura 103 muestra el espectro obtenido por la técnica videcon de flujo-detenido. En la figura 103A el espectro de  $\text{Cu}(\text{III})(\text{H}_{-3}\text{G}_3\text{a})$  se muestra con un pico de absorción en 365 nm. El espectro tomado 5 seg después de mezclar con 1.0 M de  $\text{OH}^-$  tiene picos nuevos en 310 y 525 nm y el pico inicial en 365 nm desapareció. Este cambio de espectro no ocurre cuando reaccionan el  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-4}\text{Nformil-G}_4)^{-2}$  con 1M de  $\text{OH}^-$  (fig. 103B). Además, el cambio de amarillo a rojo no ocurre con  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-3}(\text{CH}_3)_2\text{N-G}_4)^-$  donde no hay hidrógenos en la amina terminal. De este modo, el cambio de espectro a pH alto es atribuido a la ionización de un hidrógeno de amina como se ve en la figura 104 para  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-3}\text{G}_3\text{a})$ . Un tipo similar de ionización y cambio de espectro se ha reportado para  $(\text{Au}^{\text{III}}(\text{H}_{-1}\text{dien})\text{X})^+$ . La figura 105 muestra que la constante de ionización del hidrógeno de la amina puede ser medida desde cambios de absorbancia en 525 nm, y se obtiene por extrapolación del valor inicial antes de mezclar  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_3\text{G}_3\text{a})$  con cantidades variables de NaOH. Los valores  $\text{pK}_a$  para pérdida de hidrógeno de amina para cuatro complejos peptídicos de  $\text{Cu}(\text{III})$  (Tabla XXIII) son inferiores a 11.3. Es interesante, como un gran efecto de coordinación al  $\text{Cu}(\text{III})$  se tiene sobre esta reacción de ionización que es raramente observada en solución acuosa.

El potencial de reducción para este complejo  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-4}\text{L})$  de crece con el incremento de pH porque el hidrógeno de la amina no está ionizado desde el complejo de Cu(II) correspon--diente. Desafortunadamente la base fuerte necesaria para -formar el complejo  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-4}\text{L})$  también causa una rápida des-composición porque se oxida el ligando que cataliza la base por el cobre. La reducción del Cu(III) no es causada por -la oxidación del disolvente porque ni el oxígeno o peróxido pueden ser detectados. Sólo un 25% de los ligandos coordi-nados con oxidados en el caso de  $\text{G}_4$  y el 75% es recuperado-intacto. Esta y otras peculiaridades de la naturaleza de -los productos sugieren que las reacciones de cambio de elec-trón entre los complejos peptídicos de Cu(II) y Cu(III) son rápidas.

La reacción 6 de transferencia de electrón se mi-dio por el método flujo-detenido de dicroisma circular a un pH de 7.7. Sólo el complejo de tetra-L-alanina es activo -



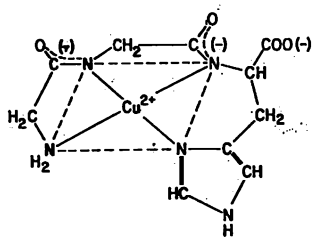
en CD, y se muestra en la figura 106 el cambio de espectro-CD cuando el complejo de Cu(II) es oxidado a Cu(III). Bajo las condiciones usadas (pH 7.7 y  $2 \times 10^{-4}$  M de  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_{-3}\text{G}_5)^-$ ) la velocidad del mecanismo fué de primer orden con una cons-tante de velocidad de  $0.1 \text{ seg}^{-1}$ , dependiendo unicamente de-la conversión de  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_{-2}\text{A}_4)^-$  a  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{H}_{-3}\text{A}_4)^{-2}$ . De ahí que, la constante de velocidad del cambio de electrón debe de -ser mayor de  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ . Estudios adicionales que han -progresado confirman que la reacción del cambio de electrón de este tipo es muy rápida.

Se ha examinado la reducción del  $\text{Cu}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{G})^-$  con un número de substratos incluyendo  $\text{I}^-$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ,  $(\text{tert Bu})_2\text{NO}$ , ácido ascorbico, cisteína, hidroquinona, y  $\text{SO}_3^{2-}$ . Todas las reducciones son rápidas y parece que proceden por el paso de un electrón. Reacciones de transferencia de dos electrones entre el  $\text{Cu}(\text{III})$  y el  $\text{Cu}(\text{I})$  pueden ser muy interesantes, porque evitan altas energías e intermediarios de radical libre, pero sin embargo no se tienen ejemplos de esta conducta de oxidación biológica.

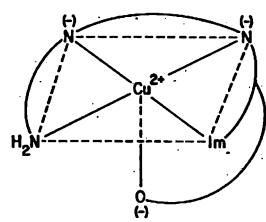
En resumen, el  $\text{Cu}(\text{III})$  es estabilizado por la unión de péptidos desprotonados y el estado de oxidación trivalente es mucho más accesible en solución acuosa en la cual se ha producido. Variaciones en los valores de  $E^\circ$  de más de 500 mV se producen en los acoplamientos de óxido-reducción del  $\text{Cu}^{\text{III,II}}$  por la naturaleza del cambio de grupos de coordinación. Si el  $\text{Cu}(\text{III})$  existe en la naturaleza, es probable como mínimo que esté coordinado a péptidos desprotonados que juegan un papel importante en la estabilización del estado de oxidación trivalente.

TABLA XVII. Bandas de Absorción Visible y Ultravioleta de Complejos de Cu(III)

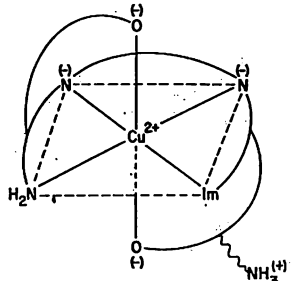
$Cu^{III}$ Complex	$\lambda_{max}$ nm ( $\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$ )	Media	References
Cu(trans-tetramine) <sup>3+</sup>	425 (15,000)	CH <sub>3</sub> CN	21
	375 (12,000)		
	275 (6,700)		
Cu(trans-diene) <sup>3+</sup>	395 (14,530)	CH <sub>3</sub> CN	21
	335 (12,690)		
	300 (2,500)		
Cu(en) <sub>2</sub> <sup>3+</sup>	310 (7,800)	H <sub>2</sub> O	22
Cu(gly) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	414 (12,000)	H <sub>2</sub> O	22
Cu(IO <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> <sup>7+</sup>	560 (2,400)	H <sub>2</sub> O	19
CuBr <sub>2</sub> (dte)	370 (26,500)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	20
KCu(bi) <sub>2</sub>	244 (strong)	BaSO <sub>4</sub> reflectance	24
	340 (v. strong)		
KCu(3-Rbi) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	461 (weak, sh)	DMSO	24
	270 (5,000)		
	373 (8,500)		
	490 (weak, sh)		



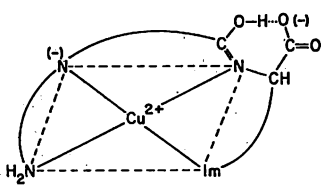
I



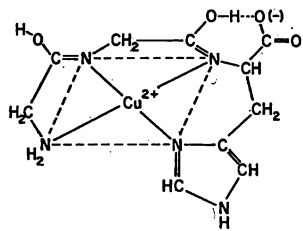
II



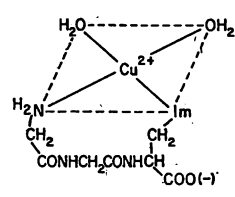
III



IV



V



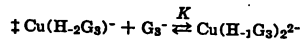
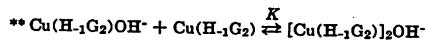
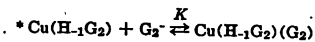
VI

TABLA XVIII. Constantes de Desprotonación y Estabilidad ACumulativa de Complejos Péptido-Cu(II)

Species	$\log \beta$ (or $\beta \ddagger$ )	$\log K$ (or $K_a$ )	Reference
CuGa <sup>2+</sup>	5.29	5.29	37*
Cu(Ga) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	9.45	4.16	
Cu(H <sub>1</sub> Ga)(Ga) <sup>+</sup>	2.54	-6.91	
Cu(H <sub>1</sub> Ga) <sub>2</sub>	-5.58	-8.12	
Cu(H <sub>1</sub> Ga) <sup>+</sup>	-1.63	-6.92	
CuG <sub>2</sub> a <sup>2+</sup>	4.88	4.88	37*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> a) <sup>+</sup>	-0.19	-5.07	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>2</sub> a)	-8.20	-8.01	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>2</sub> a)(OH) <sup>-</sup>	-18.02	-9.82	
CuG <sub>3</sub> a <sup>2+</sup>	4.77	4.77	37*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>3</sub> a) <sup>+</sup>	-0.51	-5.28	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>3</sub> a)	-7.50	-6.99	
Cu(H <sub>3</sub> G <sub>3</sub> a) <sup>-</sup>	-16.19	-8.69	
CuG <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	5.56, 5.68, 5.50	5.56, 5.68, 5.50	31, 32, 34*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>	1.50, 1.47, 1.40	-4.06, -4.21, -4.10	
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )(OH)	-7.79, -7.77	-9.29, -9.24	31, 34
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> )(G <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>	4.34	2.84*	31
[Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (OH) <sup>-</sup>	-4.14	2.15**	31
CuG <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	5.12, 5.08, 5.25	5.12, 5.08, 5.25	31, 32, 33*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>	0.01, -0.08, 0.02	-5.11, -5.16, -5.23	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>2</sub> )	-6.67, -6.82, -6.71	-6.68, -6.74, -6.73	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>2</sub> )(OH) <sup>-</sup>	-18.68, -18.32	-12.0, -11.5	
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	-4.43	2.24†	38*
CuG <sub>4</sub> <sup>+</sup>	5.13, 5.16	5.13, 5.16	31, 35*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>4</sub> )	-0.28, -0.36	-5.41, -5.52	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>4</sub> ) <sup>-</sup>	-7.09, -7.14	-6.81, -6.78	
Cu(H <sub>3</sub> G <sub>4</sub> ) <sup>2-</sup>	-16.24, -16.30	-9.15, -9.16	
CuG <sub>3</sub> <sup>+</sup>	5.32	5.32	36*
Cu(H <sub>1</sub> G <sub>3</sub> )	-0.68	-6.00	
Cu(H <sub>2</sub> G <sub>3</sub> ) <sup>-</sup>	-7.58	-6.90	
Cu(H <sub>3</sub> G <sub>3</sub> ) <sup>2-</sup>	-15.62	-8.04	
CuGGβA <sup>+</sup>	5.25	5.25	32*
Cu(H <sub>1</sub> GGβA)	-0.02	-5.27	
Cu(H <sub>2</sub> GGβA) <sup>-</sup>	-6.10	-6.08	
CuGβAG <sup>+</sup>	5.60	5.60	32*
Cu(H <sub>1</sub> GβAG)	0.24	-5.36	
Cu(H <sub>2</sub> GβAG) <sup>-</sup>	-5.50	-5.74	
CuβAGG <sup>+</sup>	5.28	5.28	32*
Cu(H <sub>1</sub> βAGG)	-0.04	-5.32	
Cu(H <sub>2</sub> βAGG) <sup>-</sup>	-5.58	-5.54	
CuβAG <sup>+</sup>	5.50	5.50	
Cu(H <sub>1</sub> βAG)	1.40	-4.10	
CuGGA <sup>+</sup>	5.08	5.08	39*

TABLA XVIII. Continuación.

Species	$\log \beta$ (or $\beta \ddagger$ )	$\log K$ (or $K_a$ )	References
Cu(H <sub>1</sub> GGA)	-0.02	-5.10	
Cu(H <sub>2</sub> GGA) <sup>-</sup>	-6.91	-6.89	
CuGAG <sup>+</sup>	5.18	5.18	39*
Cu(H <sub>1</sub> GAG)	-0.14	-5.32	
Cu(H <sub>2</sub> GAG) <sup>-</sup>	-6.76	-6.62	
Cu(H <sub>2</sub> GAG)(OH) <sup>2-</sup>	-18.16	-11.4	
CuAGG <sup>+</sup>	4.81	4.81	39*
Cu(H <sub>1</sub> AGG)	-0.17	-4.98	
Cu(H <sub>2</sub> AGG) <sup>-</sup>	-7.01	-6.84	
Cu(H <sub>2</sub> AGG)(OH) <sup>2-</sup>	-18.2	-11.2	
Cu(HGGhis) <sup>2+</sup>	-14.65(β <sub>3</sub> )'	—	
Cu(H <sub>2</sub> GHis) <sup>-</sup>	-2.2(est.)'	—	12, 41*
Cu(N-acetyl-GHis)	4.24	4.24	
CuH <sub>1</sub> (N-acetyl-GHis)	-2.26	-6.50	
CuH <sub>2</sub> (N-acetyl-GHis)	-9.61	-7.35	
CuH <sub>3</sub> (N-acetyl-GHis)	-18.86	-9.25	



\* 25.0° and 0.10M NaClO<sub>4</sub> or KNO<sub>3</sub>

\* 0.10M (NaClO<sub>4</sub>)

\* 0.10M (KNO<sub>3</sub>)

\* 0.10-0.17M (NaClO<sub>4</sub>)

\* 0.16M KCl

\* See Reaction 1

\* See Equation 2



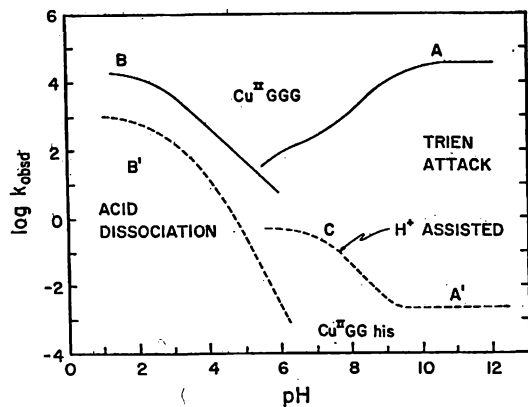


Figura 95. Constantes de velocidad de primer orden para la reacción de  $\text{Cu(II)} (\text{H}_2\text{GGG})^-$  (—) y de  $\text{Cu(II)} (\text{HGGhis})^-$  (---) con: (A, A') trien (ataque nucleofíli-  
co); (B, B')  $\text{H}^+$  (disoc. ácida).

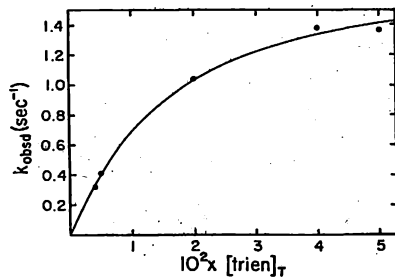


Figura 96. Dependencia de la constante de velocidad de primer orden observada de  $\text{Cu(II)} (\text{H}_2\text{GGhis})^-$  con la concentración de trien. A altas concentraciones de trien la constante de velocidad es limitada a la transf. protón.

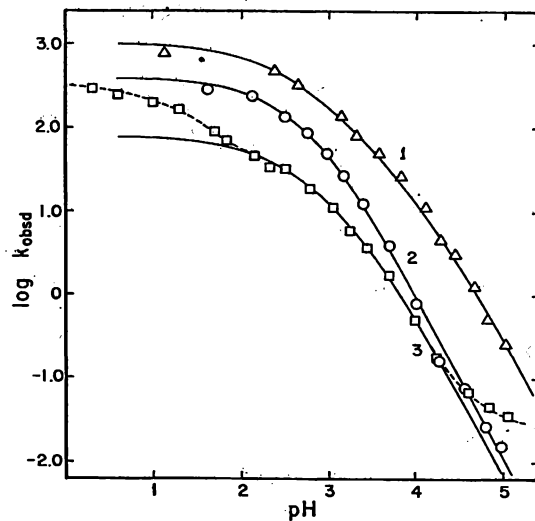


Figura 94. Constantes de velocidad de disociación de primer orden observadas a pH bajo en la adición de dos protones "exteriores". Hay una  $(\text{H}^+)^2$  dependiente del pH alto. (1)  $\text{Cu(II)}\text{-gli-gli-his}$ ; (2)  $\text{Cu(II)}\text{-gli-gli-his-gli}$ ; (3)  $\text{Cu(II)}\text{-asp-ala.his.lis}$ .

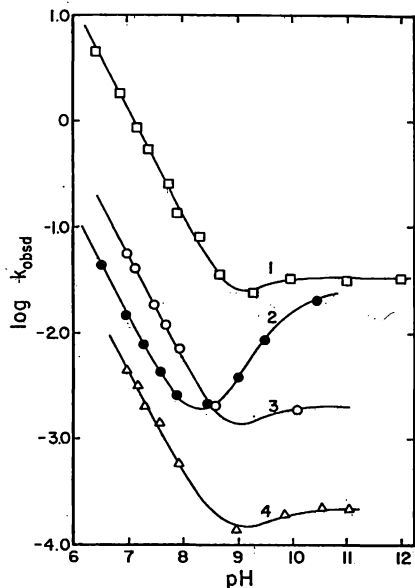


Figura 98. Constante de velocidad de primer orden observada para la reacción del complejo de Cu(II) con 0.07 M. de trien. (1)  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{GGhis})$ ; (2)  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{GGhis})^-$ ; (3)  $\text{Cu}(\text{sue-ro de albúmina bovina})$ ; (4)  $\text{Cu}(\text{H}_2\text{asp.ala. - his.lis})^-$ .

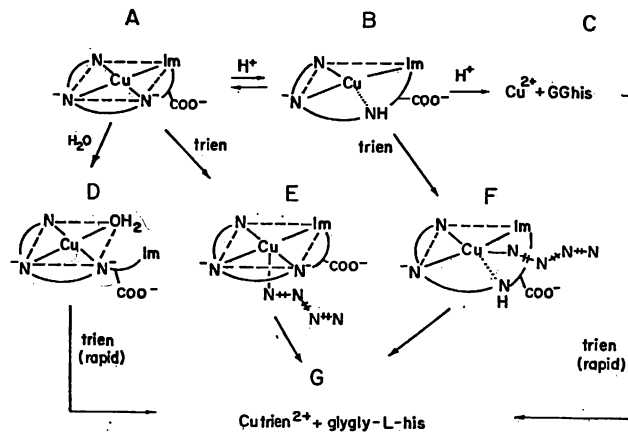


Figura 97. Mecanismo propuesto para la transf. de Cu(II) desde gli-gli-L-his a trien. El camino predominante es el de proton-ataque mu cleofilico.

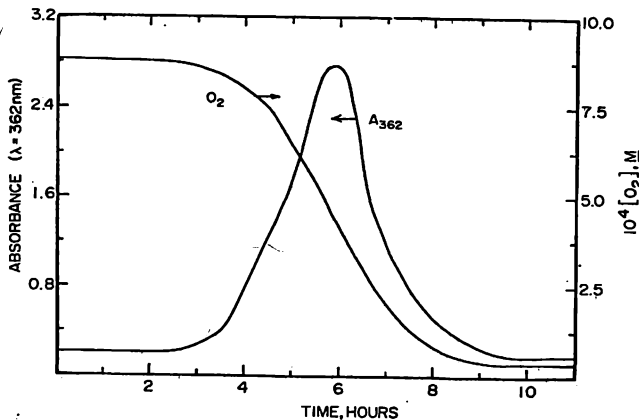


Figura 99. Captura de O<sub>2</sub> comparada con la formación y decaimiento de la especie amarilla (Cu III) en la reacción de O<sub>2</sub> con Cu(II)G<sub>4</sub>.

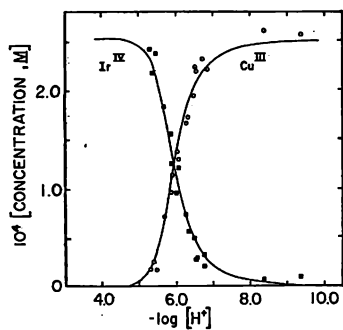


Figura 100. Formación de  $\text{Cu(III)}$   $(\text{H}_3\text{G}_4)^-$  y pérdida de  $\text{Ir(IV)Cl}_6^-$  como una función de  $(\text{H}^+)$

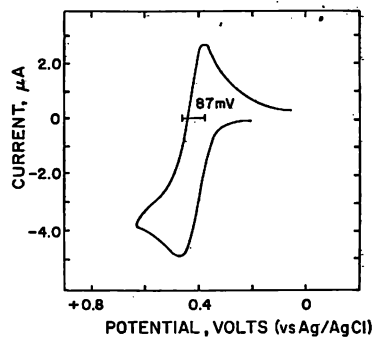


Figura 102. Voltamograma cíclico de  $-\text{Cu}(\text{H}_3\text{G}_4)$  a 100 mV con electrodo de carbón y potencial de electrodo 0.63.

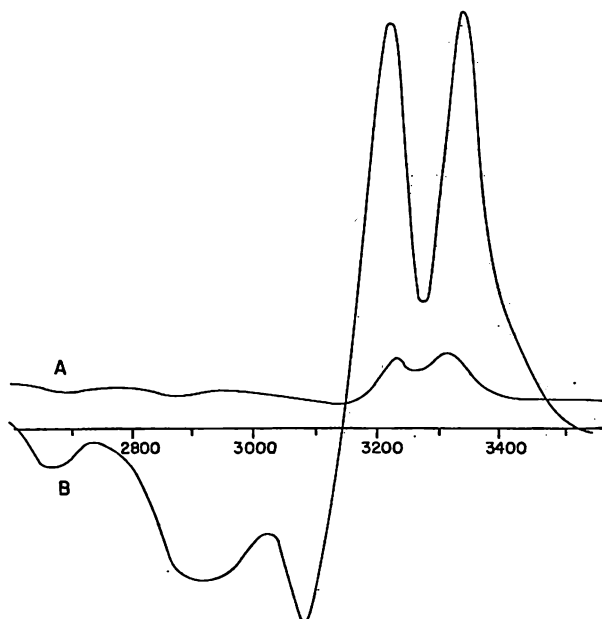


Figura 101. Espectro EPR de pentaglicina de  $\text{Cu}$  a temperatura de  $\text{N}_2$  líquido y 9.075 GHz. (A) Después de la oxidación electrofítica de  $\text{Cu(III)}$   $(\text{H}_3\text{G}_5)^-$ ; (B) Antes de la oxidación  $\text{Cu(II)}(\text{H}_3\text{G}_5)^{2-}$

TABLA XIX. Potenciales de Electrodo (vs. NHE) para Cu<sup>III,II</sup>

<i>Cu(III)-Peptide</i>	<i>Cyclic Voltammetry*</i>		<i>Ir<sup>IV</sup>-pH Equil.</i>
	$\Delta mV$	$E^\circ (V)$	$E^\circ (V)$
Cu(H <sub>3</sub> hexaglycine) <sup>-</sup>	95	0.67	0.67
Cu(H <sub>3</sub> pentaglycine) <sup>-</sup>	80	0.66	0.65
Cu(H <sub>3</sub> tetraglycine) <sup>-</sup>	85	0.63	0.63
Cu(H <sub>3</sub> triglycinamide)	72	0.64	0.64
Cu(H <sub>2</sub> di-L-alanylammide) (OH)	165	0.80	0.78

TABLA XX. Efecto de Grupos de Coordinación en E° de Cu<sup>III,II</sup>

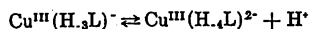
<i>Cu(III)-Peptide</i>	<i>pH</i>	$E^\circ (V) (NHE)^*$
Cu(H <sub>2</sub> glycylglycyl-L-histidine)	7.5	0.98
Cu(H <sub>3</sub> triglycine)	7.7	0.92
Cu(H <sub>2</sub> diglycinamide) (OH)	9.2	0.89
Cu(H <sub>3</sub> triglycinamide)	9.5	0.64
Cu(H <sub>3</sub> triglycine) <sup>-</sup>	9.3	0.63
Cu(H <sub>4</sub> N-formyltetraglycine) <sup>2-</sup>	11.5	0.55

TABLA XXI. Efecto Derivativo de N-Formilo en E° de Cu<sup>III,II</sup>

<i>Cu(III)-Peptide</i>	$E^\circ (V) (NHE)^*$
Cu(H <sub>3</sub> tetraglycine) <sup>-</sup>	0.63
Cu(H <sub>4</sub> N-formyltetraglycine) <sup>2-</sup>	0.55 <sup>b</sup>
Cu(H <sub>3</sub> triglycinamide) <sup>-</sup>	0.64
Cu(H <sub>4</sub> N-formyltriglycinamide) <sup>2-</sup>	0.49 <sup>a</sup>
Cu(H <sub>3</sub> triglycine)	0.92 <sup>a</sup>
Cu(H <sub>3</sub> N-formyltriglycine) <sup>-</sup>	0.75

TABLA XXII. Efecto del Ligando Grupo-R en la Substitución sobre -  
el E° de Cu<sup>III,II</sup>

<i>Cu(III)-Peptide</i>	$E^\circ (V) (NHE)^*$
Cu(H <sub>3</sub> tetraglycine) <sup>-</sup>	0.63
Cu(H <sub>3</sub> tetra-L-alanine) <sup>-</sup>	0.60
Cu(H <sub>3</sub> tetra-L-valine) <sup>-</sup>	0.51
Cu(H <sub>3</sub> pentaglycine) <sup>-</sup>	0.66
Cu(H <sub>3</sub> penta-L-alanine) <sup>-</sup>	0.61

TABLA XXIII. Constantes de Ionización de Hidrógenos de Amina -  
Coordinados a Complejos Péptido-Cu(III).

<i>L</i>	<i>pK<sub>a</sub></i>
G <sub>3</sub> a	12.6
G <sub>4</sub>	12.1
G <sub>5</sub>	11.6
G <sub>6</sub>	11.3

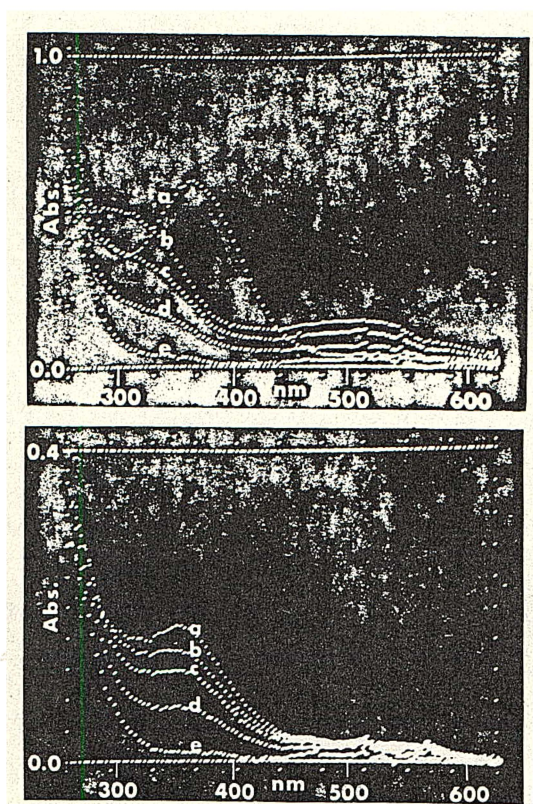


Figura 103. Espectro vidicon de  $\text{Cu(III)} (\text{H}_3\text{G}_3\text{a})$  y  $\text{Cu(III)} (\text{H}_4\text{G}_3\text{a})^-$  (arriba). Espectro vidicon de  $\text{Cu(III)}-(\text{H}_4\text{N-formilo-G}_4)^{2-}$  (abajo).

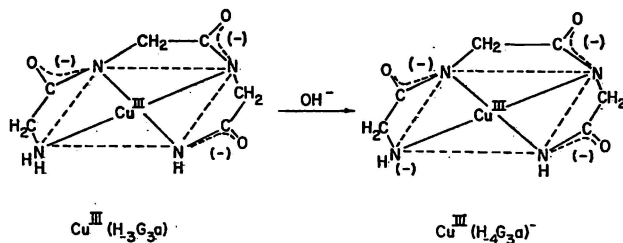


Figura 104. Ionización propuesta para el hidrógeno de amina causante del cambio de coloración de amarillo a rojo cuando se adiciona base a el complejo peptídico de  $\text{Cu(III)}$ .

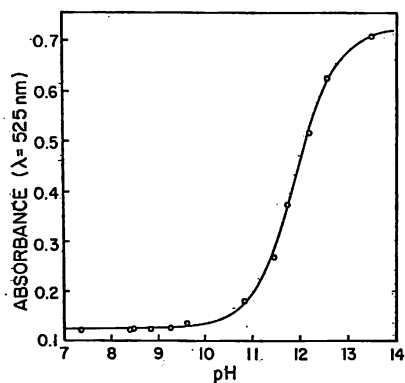


Figura 105. Curva de absorbancia (525 nm) vs. pH para la ionización de hidrógeno de amina desde  $\text{Cu(III)}(\text{H}_3\text{G}_3\text{a})$ .

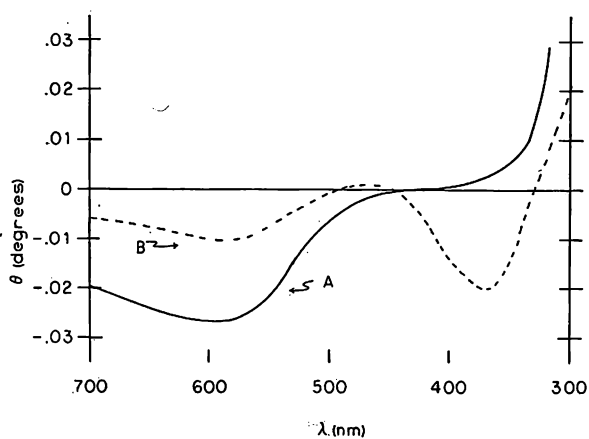


Figura 106. Espectro CD mostrando la reacción de transferencia de electrón para formar  $\text{Cu(III)}(\text{H}_3\text{A}_4)$  (A)  $\text{Cu(II)}\text{A}_4$ ; (B) Después de mezclar volúmenes iguales de  $\text{Cu(III)}(\text{H}_3\text{G}_5)$  y  $\text{Cu(II)}\text{A}_4$ .

BIBLIOGRAFIA

## Introducción

- (1) Hanzlik, Robert P., "Inorganic Aspects of Biological and Organic Chemistry", London, Engl., 1976.
- (2) Ochiai Ei-ichiro, "Environmental Bioinorganic Chemistry", Journal of Chemical Education, 51 (4), 235-238 (1974).
- (3) Ainscough, E.W., "The Role of Metal Ions in Proteins and other Biological Molecules", Journal of Chemical Education, 53, (3), 156-158 (1976).
- (4) McQuate, Robert S., "Carbonic Anhydrase and Metalloderivatives", Journal of Chemical Education, 54, (10), 645-648 (1977).
- (5) Beckmann, B.A., Buchman, A., and Pasternack, R.F., "An-Advanced Laboratory Experiment in Bioinorganic Chemistry", Journal of Chemical Education, 53 (6), 387-389 (1976).
- (6) Rayner, Canham, G.W., and Lever A.B.P. "Bioinorganic Chemistry. Simple models of iron sites in some biological systems", Journal of Chemical Education, 49 (10), 656-660 (1972).
- (7) Dujardin, Esther, Lazlo, Pierre, and Sacks David, "The-Chlorophylls", Journal of Chemical Education, 52 (11), 742-744 (1975).
- (8) Ulmer, D.D., and Vallee, B.L., "Structure and Function-of Metalloenzymes", Bioinorganic Chemistry I, Advances-in Chemistry Series # 100, Amer.Chem.,Soc.,Publ. 1971.

- (9) Ochiai Ei-ichiro, "A Laboratory Program for Bioinorganic Chemistry", Journal of Chemical Education, 50 (9), 610-611 (1973).
- (10) Dulka, Joseph J., and Risby Terence H., "Ultratrace - Metals in Some Environmental and Biological Systems", - Analytical Chemistry 48 (8), 640-653 (1976).
- (11) Appleton, Trevor G., "Oxygen Uptake by a Cobalt (II) - Complex", Journal of Chemical Education, 54 (7), 443-444 (1977).
- (12) Senozan, N.M., "Vanadium in the Living World", Journal of Chemical Education, 51 (8), 503-505 (1974).

Química Bioinorgánica del Fe.

- (1) Caughey, Winslow S., "Structure-Function Relationships in Cytochrome c Oxidase and other Heme proteins", Bioinorganic Chemistry I, Advances in Chemistry Series - # 100, Amer. Chem. Soc. Publ. 1971.
- (2) Blumberg, W.E., and Peisach J., "Low-Spin Compounds of Heme Proteins", Bioinorganic Chemistry I, Advances in Chemistry Series # 100, Amer. Chem. Soc. Publ. 1971.
- (3) Taylor, Glenn A., and Tsutsui Minoru, "Out-of-Plane Metalloporphyrin Complexes", Journal of Chemical Education, 52 (11), 715-720 (1975).
- (4) Dickinson, Charles L., "Metal Replaced Hemoproteins", - Journal of Chemical Education, 53 (6), 381-385 (1976).



- (5) Aisen, Philip, and Leibman, Adela, "Transport of Iron - by Transferrin", Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (6) Gray, Harry B., "Structural Models for Iron and Copper-Proteins Based on Spectroscopic and Magnetic Properties" Bioinorganic Chemistry I, Advances in Chemistry Series- # 100, Amer. Chem. Soc. Publ. 1971.
- (7) Hall, D.O., "Iron-Sulfur Proteins and Superoxide Dismutases in the Biology and Evolution of Electron Transport", Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (8) Kenneth, Raymond N., "Kinetically Inert Complexes of - the Siderophores in Studies of Microbial Iron Transport" Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.

#### Química Bioinorgánica del Cu

- (1) Senozan, N.M., "Hemocyanin: The Copper Blood", Journal of Chemical Education, 53 (11), 684-688 (1976).
- (2) Gray, Harry, B., Coyle, Catherine L., and Dooley, David M., "Structure and Electron Transfer Reactions of Blue-Copper Proteins", Bioinorganic Chemistry II, Advances - in Chemistry Series # 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (3) Pecht, Israel, Farver Ole, and Goldberg Michel, "Elec--tron Transfer Pathways in Blue Copper Proteins", Bioi--norganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # - 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.

- (4) Bereman, Robert D., Ettinger, Murray J., and Kosman, Daniel J., "Characterization of the Copper (II) Site in Galactosa Oxidase" Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (5) Eaton, D.R., "Structure of the Second Coordination Sphere of Metal Complexes and its Role in Catalysis", Bioinorganic Chemistry I, Advances in Chemistry Series # - 100, Amer. Chem. Soc. Publ. 1971.
- (6) Lippard, Stephen J., Burger, Allan R., and Ugurbil, Kamil, "Physical and Chemical Studies of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase", Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # 162 Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (7) Margerum, Dale W., Wong, Lovis F., and Bossu, Frank P., "Copper (II) and Copper(III)-Peptide Complexes", Bioinorganic Chemistry II, Advances in Chemistry Series # - 162, Amer. Chem. Soc. Publ. 1977.
- (8) Farrell, John J., "Physical and Chemical Properties of the Copper Alanine System", Journal of Chemical Education, 54 (7), 445-446 (1977).