

condiciones para los orbitales ocupados por un sólo electrón y para los orbitales ocupados por dos electrones<sup>28,29</sup>.

En la teoría UHF se utilizan diferentes orbitales para los electrones alfa y beta y, por tanto, se definen dos juegos de coeficientes:

$$\psi_i^\alpha = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu}^\alpha \phi_{\mu} \quad \psi_i^\beta = \sum_{\mu=1}^N c_{\mu}^\beta \phi_{\mu} \quad (\text{V.18})$$

que se hacen variar independientemente, obteniéndose las ecuaciones de Roothaan-Hall generalizadas:

$$\sum_{\nu=1}^N (F_{\mu\nu}^\alpha - \varepsilon_i^\alpha S_{\mu\nu}) c_{\nu}^\alpha = 0 \quad (\text{V.19})$$

$$\sum_{\nu=1}^N (F_{\mu\nu}^\beta - \varepsilon_i^\beta S_{\mu\nu}) c_{\nu}^\beta = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, N$$

Hay, por tanto, dos matrices de Fock (ecuación V.20) y dos partes de la matriz de densidad (ecuación V.21).

$$F_{\mu\nu}^\alpha = H_{\mu\nu}^{\text{core}} + \sum_{\lambda=1}^N \sum_{\sigma=1}^N [(P_{\lambda\sigma}^\alpha + P_{\lambda\sigma}^\beta)(\mu\nu|\lambda\sigma) - P_{\lambda\sigma}^\alpha(\mu\lambda|\nu\sigma)] \quad (\text{V.20})$$

$$F_{\mu\nu}^\beta = H_{\mu\nu}^{\text{core}} + \sum_{\lambda=1}^N \sum_{\sigma=1}^N [(P_{\lambda\sigma}^\alpha + P_{\lambda\sigma}^\beta)(\mu\nu|\lambda\sigma) - P_{\lambda\sigma}^\beta(\mu\lambda|\nu\sigma)]$$

$$P_{\mu\nu}^\alpha = \sum_{i=1}^{\alpha \text{ ocup}} c_{\mu}^{\alpha*} c_{\nu}^\alpha \quad P_{\mu\nu}^\beta = \sum_{i=1}^{\beta \text{ ocup}} c_{\mu}^{\beta*} c_{\nu}^\beta \quad (\text{V.21})$$

Los cálculos UHF producen valores menores de la energía total y mejores descripciones de las distribuciones de densidad electrónica que los ROHF en sistemas de capa abierta. Sin embargo, las funciones de onda obtenidas no son siempre funciones propias del operador total de spin y, por tanto, no corresponden a estados electrónicos puramente singletes, dobletes, tripletes, etc.

Los pasos básicos de un cálculo SCF son los siguientes:

a) Obtener una geometría de la molécula. Esto puede hacerse partiendo de datos experimentales o suponiendo una geometría aproximada.

b) Escoger las funciones de base que van a utilizarse.

c) Realizar el cálculo en el ordenador, es decir:

c.1) Evaluar y almacenar todas las integrales mono y bielectrónicas. Las primeras representan la energía cinética de los electrones y el potencial atractivo entre los electrones y los núcleos. Las segundas representan las interacciones repulsivas entre electrones.

c.2) Realizar una estimación inicial de la función de onda.

c.3) Calcular el operador de Fock (y la matriz de densidad)

c.4) Diagonalizar el operador de Fock para obtener una mejor estimación de los orbitales moleculares y la matriz de densidad.

c.5) Repetir los pasos c.3 y c.4 hasta obtener la convergencia bajo un criterio preestablecido.

Los cálculos SCF dan una descripción sencilla y casi automática de una molécula. La descripción es razonablemente precisa para estructuras cercanas al equilibrio: las distancias de enlace se obtienen con errores no superiores al 1% y también ciertos tipos de diferencias energéticas. Sin embargo, pocas propiedades más pueden obtenerse por debajo del 10% de error, entre las que cabe destacar las frecuencias armónicas, las distribuciones de cargas o los momentos dipolares.

En ocasiones las predicciones que se obtienen de cálculos SCF no son ni siquiera cualitativamente correctas. Por ejemplo, las funciones de onda SCF de capa cerrada no describen correctamente la disociación molecular: en lugar de reproducir  $AB \rightarrow A + B$ , se obtiene  $AB \rightarrow A^+ + B^-$ . Esto no significa que las energías de enlace se describan de un modo seriamente erróneo: los métodos SCF generalmente describen con corrección las energías de AB, de A y de B por separado, pero la curva que une los estados iniciales y finales es incorrecta.

En cambio, una función de onda UHF sí que describe las disociaciones de forma correcta. El principal inconveniente de las funciones UHF es que en sistemas de capa abierta y sistemas de capa cerrada lejos del equilibrio no son

funciones propias del spin y, por lo tanto, no se puede calcular un estado particular sino una mezcla de estados.

## V.1.2 CONJUNTOS DE FUNCIONES DE BASE

Como hemos indicado, los orbitales moleculares en un tratamiento Hartree-Fock se expresan como combinaciones lineales de  $N$  funciones de base centradas en los núcleos (ecuación V.3). En las funciones de onda UHF se definían dos juegos de coeficientes de expansión, pero se emplean las mismas funciones de base para los orbitales  $\alpha$  y  $\beta$  (ecuación V.18). El hecho de escoger un conjunto de funciones de base u otro es crucial en todos los cálculos de estructura electrónica molecular<sup>30</sup>.

El nivel más sencillo de los cálculos *ab initio* consiste en el uso de un conjunto mínimo de funciones de base centradas en los núcleos. Este tipo de representación comprende exactamente el uso de tantas funciones de base como se necesitan para acomodar a todos los electrones de los átomos, manteniendo una simetría global esférica en cada átomo. Así, el H y el He se representan por una única función (orbital 1s), Li y Be por dos funciones (1s y 2s), el resto de los elementos de la serie del sistema periódico por cinco funciones (1s, 2s y tres funciones 2p), y así sucesivamente. La experiencia, sin embargo, aconseja expandir un poco el conjunto mínimo de funciones de base para algunos casos: así, Li y Be se describen por cinco funciones (1s, 2s y las tres funciones de los orbitales 2p que, aunque están desocupados en el estado fundamental, se encuentran cercanos en energía), y lo mismo ocurre para el resto de alcalinos y alcalinotérreos. De ese modo, el número de funciones utilizadas cuando se emplea un conjunto mínimo de funciones es el siguiente:

H, He:	1
Li a Ne:	5
Na a Ar:	9
K, Ca:	13
Sc a Kr:	18
Rb, Sr:	22
Y a Xe:	27

El conjunto mínimo de funciones de base más comúnmente utilizado es el STO-3G, en el que cada orbital atómico se calcula como una combinación lineal de tres gaussianas primitivas, que se eligen de manera que se reproduzca un orbital de tipo Slater (STO) tan aproximadamente como sea posible:

$$\phi_{nl} = \sum_{k=1}^3 d_{nl,k} g_l(\alpha_{n,k}, r) \quad (\text{V.22})$$

donde  $n$  y  $l$  son los números cuánticos principal y angular y  $g_l$  son funciones gaussianas normalizadas; el sumatorio se extendería hasta  $K$  para un conjunto de funciones de base STO-KG. Los valores de los exponentes de las gaussianas,  $\alpha$ , y de los coeficientes lineales de expansión,  $d$ , se determinan minimizando el error del ajuste de la expansión de gaussianas al orbital exacto de Slater mediante mínimos cuadrados. Los valores de  $\alpha$  y  $d$  están tabulados en la literatura para los elementos del primer y segundo periodo<sup>31</sup>, los del tercero<sup>32</sup>, los elementos representativos de los periodos cuarto<sup>33</sup> y quinto<sup>34</sup>, así como para la primera y segunda series de elementos de transición<sup>35</sup>.

El conjunto mínimo de funciones de base tiene la ventaja de que con él se realizan cálculos muy rápidos, pero los resultados que se obtienen son excesivamente inexactos, sobre todo en cuanto a ángulos de enlace y frecuencias vibracionales. Las longitudes de enlace, en cambio, se describen mejor.

Si se duplica el número de funciones que representan orbitales de valencia se consigue un considerable incremento en la exactitud de los cálculos. El conjunto de funciones de base que se obtiene de este modo se llama conjunto de funciones de base de partición de la capa de valencia (split-valence). En ella se representa cada orbital interno mediante una función de base y cada orbital de la capa de valencia mediante dos. Por ejemplo, para los elementos del segundo periodo se tiene:  $1s, 2s, 2s', 2p_x, 2p_y, 2p_z, 2p_x', 2p_y', 2p_z'$ . La diferencia entre diversos conjuntos de funciones de base de este tipo radica en el número de gaussianas primitivas empleadas en la obtención de cada función de base. Así, el conjunto 6-21G se obtiene mediante una función de base para cada orbital atómico interno, que se expresa como combinación lineal de seis gaussianas primitivas, una función para cada orbital de valencia expresada como

combinación lineal de dos gaussianas primitivas y otra función para cada orbital de valencia que corresponde a una gaussianas primitiva. Del mismo modo, un conjunto 3-21G describe igual a los orbitales de valencia, pero emplea sólo tres gaussianas primitivas para describir los orbitales internos. El conjunto 6-21G está definido para elementos hasta el tercer periodo y el 3-21G hasta el quinto<sup>36,37</sup>.

Dos conjuntos de funciones de base que junto con el 3-21G, han sido ampliamente utilizados son el 4-31G<sup>38-41</sup> y el 6-31G<sup>42-44</sup>. El primero está definido para los elementos hasta el segundo periodo y para fósforo, azufre y cloro y el segundo para elementos hasta el tercer periodo.

Si se duplica el número de funciones de base tanto por lo que respecta a los orbitales de valencia como a los orbitales internos, se obtiene un conjunto de funciones de base con el que se incrementa aún más la exactitud de los cálculos. Un conjunto de funciones de base de este tipo se denomina doble zeta (DZ). De esta forma, los elementos de la segunda serie del sistema periódico se describen mediante cuatro funciones de tipo s ( $1s$ ,  $1s'$ ,  $2s$  y  $2s'$ ) y dos conjuntos de tres funciones p ( $2p_x$ ,  $2p_y$ ,  $2p_z$ ,  $2p_x'$ ,  $2p_y'$  y  $2p_z'$ ). La notación de este tipo de conjuntos de funciones de base se hace normalmente indicando el número de funciones para cada centro. Por tanto, para elementos de la segunda serie el conjunto DZ es  $4s2p$  (para los mismos elementos, el conjunto de partición de valencia es  $3s2p$ ). En ocasiones se indica también el número de gaussianas primitivas, como en el caso del conjunto de Dunning-Huzinaga DZ [ $9s5p/4s2p$ ]<sup>45</sup>, donde la primera parte del corchete indica el número de primitivas. En esta notación, 6-31G se escribiría como [ $10s4p/3s2p$ ].

Los conjuntos de funciones de base descritos hasta aquí están formados por funciones centradas en las posiciones nucleares. Sin embargo, en moléculas altamente polares y en sistemas que incluyen ciclos, la evidencia sugiere que la carga electrónica puede encontrarse desplazada. Un modo de describir más correctamente este tipo de sistemas consiste en incluir funciones de número cuántico angular mayor en el conjunto de funciones de base (funciones de tipo d en átomos pesados y de tipo p en el hidrógeno). El conjunto que resulta es un conjunto de funciones de base con polarización. La inclusión de funciones de polarización se indica mediante un asterisco (si se añaden funciones tipo d a los

átomos pesados) o con dos (si además se añaden funciones tipo p a los átomos de hidrógeno). Entre los conjuntos de funciones de base más sencillos que incluyen polarización se encuentran 6-31G\* y 6-31G\*\*<sup>46</sup>. Existen otros conjuntos de funciones de base más extensos que incluyen polarización, como el 6-311G\*\*<sup>47</sup> o el DZP (doble zeta + polarización) que no hemos utilizado en la presente Tesis Doctoral. La inclusión de funciones de polarización se traduce en una descripción más flexible de los enlaces y la obtención de mejores estructuras. En el caso de cálculos que incluyen correlación electrónica en sistemas con electrones en orbitales atómicos de tipo p, la inclusión de funciones de polarización es necesaria<sup>48,49</sup>.

Por último, para una correcta descripción de sistemas cargados (de manera total o parcial) negativamente, es necesaria la inclusión de funciones altamente difusas<sup>13</sup>. Con ello se obtienen buenos resultados en el cálculo de afinidades electrónicas<sup>50</sup>, afinidades protónicas<sup>51,52</sup> y barreras de inversión<sup>53-55</sup>. Este tipo de funciones difusas representan orbitales atómicos s o p que se añaden al conjunto de funciones de base. La inclusión de funciones difusas se indica mediante un signo +. Por ejemplo, 6-31++G\*\* implica que se han añadido dos juegos de funciones difusas al conjunto 6-31G\*\*.

Existen conjuntos de funciones de base mayores, como las bases triple zeta, para estudios de energías y propiedades espectroscópicas, pero su empleo resulta muy costoso en moléculas con más de diez o doce átomos.

### V.1.3 CORRELACIÓN ELECTRÓNICA

La exactitud del método de Hartree-Fock tiene un límite a partir del cual cualquier extensión del conjunto de funciones de base no resulta en una mejora de los resultados del cálculo<sup>5</sup>. La diferencia entre la energía obtenida para el sistema mediante la resolución exacta de la ecuación de Schrödinger no relativista y la obtenida a partir de la aproximación de Hartree-Fock se denomina energía de correlación electrónica<sup>56</sup> (Figura V.2). Sin embargo, dado que la solución exacta de la ecuación de Schrödinger no puede obtenerse, la definición dada anteriormente no es adecuada y se modifica en la práctica según se indica en la Figura V.2.

La energía de correlación no es una cantidad aditiva en general y depende de la geometría del sistema. Para obtenerla se utilizan sobre todo dos métodos: el de interacción de configuraciones<sup>57</sup> (CI) y el de Moller-Plesset<sup>58</sup> (MP) basado en la teoría perturbacional.

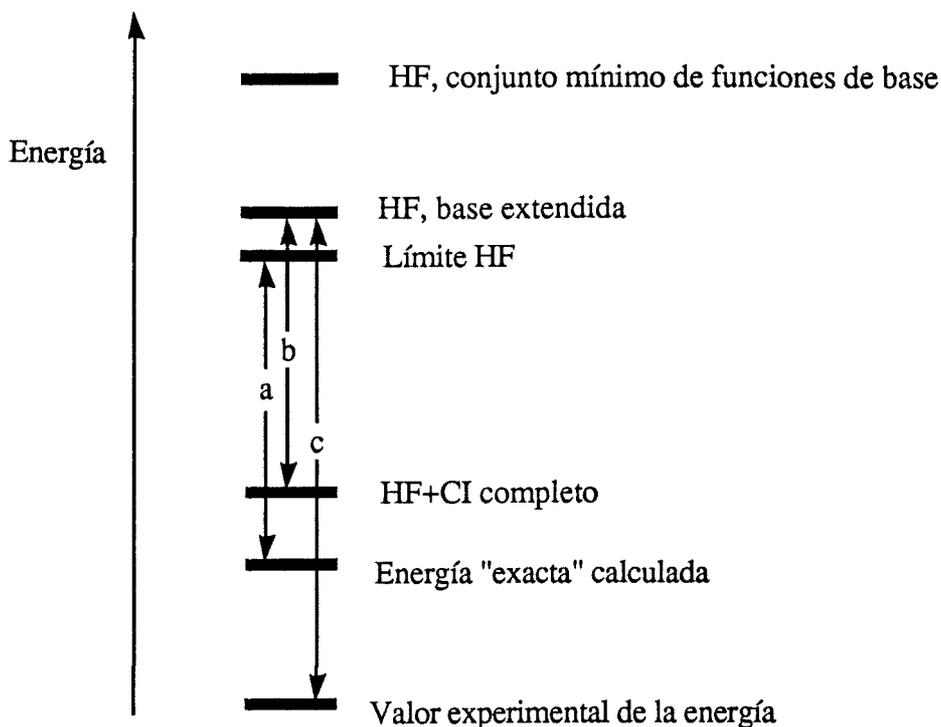


Figura V.2 Energía de correlación electrónica definida según Löwdin<sup>56</sup> (a); estimación usual de ella se hace en la práctica (b); estimación experimental (c).

Los métodos CI utilizan funciones de onda que se generan haciendo excitaciones desde la función de onda SCF. Estas excitaciones pueden ser sencillas:

$$\Psi_i^a = |\psi_1^2 \psi_2^2 \dots \psi_i^\alpha \psi_a^\beta \dots \psi_n^2| \quad (\text{V.23})$$

en la que el par  $\psi_i^2$  ha sido reemplazado por  $\psi_i^\alpha \psi_a^\beta$ ; dobles:

$$\Psi_{ij}^{ab} = |\psi_1^2 \psi_2^2 \dots \psi_i^\alpha \psi_a^\beta \psi_j^\alpha \psi_b^\beta \dots \psi_n^2| \quad (\text{V.24})$$

donde los pares  $\psi_i^2 \psi_j^2$  han sido reemplazados por  $\psi_i^\alpha \psi_a^\beta \psi_j^\alpha \psi_b^\beta$ ; triples, etc.

Si todas las excitaciones posibles fueran incluidas, la función de onda resultante sería una función de onda de interacción de configuraciones completa (Full-CI). Esta función de onda representaría el tratamiento más completo dentro de las limitaciones impuestas por el conjunto de funciones de base que se utilizara. A medida que este conjunto fuera más completo, el resultado de un tratamiento Full-CI se aproximaría a la solución exacta a la ecuación de Schrödinger no relativista. Desafortunadamente estos cálculos sólo son posibles en sistemas muy pequeños, debido al gran número de determinantes sustituidos que se generan en caso contrario. Por ello, usualmente el tratamiento se restringe al caso de excitaciones sencillas (CIS), excitaciones dobles (CID) o excitaciones sencillas y dobles (CISD). La función de onda para éste último se escribe como:

$$\Psi_{CISD} = a_0 \Psi_0 + \sum_{i,a} a_i^a \Psi_i^a + \sum_{i,j,a,b} a_{ij}^{ab} \Psi_{ij}^{ab} \quad (\text{V.25})$$

Los coeficientes  $a_i^a$  y  $a_{ij}^{ab}$  se eligen de modo que se minimice la energía. El peso de la función de onda SCF como parte de la función de onda total,  $a_0$ , queda fijado por el hecho de que la función de onda total debe estar normalizada.

Los métodos basados en la teoría de perturbaciones de Moller-Plesset<sup>58</sup> son una aproximación alternativa al problema de la correlación electrónica. Estos métodos se formulan mediante la introducción de un Hamiltoniano electrónico generalizado según:

$$\hat{H}_\lambda = \hat{H}_0 + \lambda \hat{V} \quad (\text{V.26})$$

donde  $\hat{H}_0$  es el Hamiltoniano de orden cero que se toma como la suma de los operadores de Fock monoeléctricos y la perturbación,  $\lambda \hat{V}$ , se define según:

$$\lambda \hat{V} = \lambda (\hat{H} - \hat{H}_0) \quad (\text{V.27})$$

donde  $\hat{H}$  es el Hamiltoniano correcto y  $\lambda$  es un parámetro adimensional.

Las funciones de onda y energías exactas (que pueden obtenerse con el método Full-CI) para el estado fundamental de un sistema descrito por el Hamiltoniano electrónico generalizado, pueden expandirse en potencias de  $\lambda$  de acuerdo con la teoría de perturbaciones de Rayleigh-Schrödinger<sup>59</sup>:

$$\begin{aligned}\Psi_\lambda &= \Psi^{(0)} + \lambda\Psi^{(1)} + \lambda^2\Psi^{(2)} + \dots \\ E_\lambda &= E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \lambda^2 E^{(2)} + \dots\end{aligned}\tag{V.28}$$

Los métodos prácticos de correlación pueden formularse fijando el parámetro  $\lambda=1$  y truncando las series V.28 en diversos órdenes. Si se trunca la serie tras el término de segundo orden, el método se llama MP2, tras el tercero MP3, y así sucesivamente.

En la expresión V.28  $\Psi^{(0)}$  es la función de onda de Hartree-Fock y:

$$E^{(0)} = \sum_i^{\text{oc}} \varepsilon_i\tag{V.29}$$

$$E^{(0)} + E^{(1)} = \int \dots \int \Psi^{(0)} \hat{H} \Psi^{(0)} d\tau_1 d\tau_2 \dots d\tau_n\tag{V.30}$$

siendo  $\varepsilon_i$  la energía monoeléctronica definida en las ecuaciones V.6. La energía obtenida del método MP1 es entonces la energía de Hartree-Fock. Los términos superiores en la expansión toman en consideración otros elementos de la matriz del operador  $\hat{V}$ . La contribución de segundo orden a la energía de Moller-Plesset es:

$$E^{(2)} = - \sum_s^D (E_0 - E_s)^{-1} |V_{s0}|^2\tag{V.31}$$

donde el sumatorio se extiende sobre todas las excitaciones dobles. Probablemente esto representa la expresión más simple para calcular de modo aproximado la energía de correlación. Si se ha realizado la doble sustitución  $ij \rightarrow ab$ , entonces la expresión para  $V_{s0}$  es la integral bielectrónica sobre todos los spin-orbitales:

$$V_{so} = (ij||ab) = \iint \chi_i^*(1)\chi_j^*(2) \left( \frac{1}{r_{12}} \right) [\chi_a(1)\chi_b(2) - \chi_b(1)\chi_a(2)] d\tau_1 d\tau_2 \quad (\text{V.32})$$

La integral V.32 se realiza sobre todas las coordenadas (cartesianas y de spin) para ambos electrones. La ecuación final para la contribución de segundo orden a la energía puede escribirse entonces como:

$$E^{(2)} = - \sum_i^{oc} \sum_j^{oc} \sum_a^{virt} \sum_b^{virt} (\epsilon_a + \epsilon_b - \epsilon_i - \epsilon_j)^{-1} |(ij||ab)|^2 \quad (\text{V.33})$$

donde  $i < j$  y  $a < b$ .

Hay términos de orden superior: MP3<sup>60</sup>, MP4<sup>47,61</sup>, etc, que incluyen excitaciones hasta las triples, las cuádruples, etc, respectivamente. Las triples son más difíciles de calcular, de modo que algunos cálculos se realizan incluyendo excitaciones sencillas, dobles y cuádruples. Este cuarto orden parcial se denomina MP4SDQ<sup>62</sup>.

Para muchas moléculas MP2 es con mucho la corrección más sofisticada que a efectos prácticos puede realizarse sobre la función de onda SCF. Si se usa con un conjunto extendido de funciones de base puede proporcionar entre el 75 y el 90% de la energía de correlación.

Los dos métodos, CI y MP, si se aplican en circunstancias adecuadas, corrigen muchos de los defectos de las funciones de onda SCF, con la consiguiente mejora en la descripción de geometrías, frecuencias, distribuciones de cargas, energías de enlace, etc. También proporcionan mejores descripciones de las propiedades de segundo orden, como polarizabilidades, derivadas del momento dipolar e intensidades del espectro de infrarrojos.

La inclusión de la correlación electrónica en los cálculos es necesaria cuando se destruyen durante la reacción pares electrónicos de enlace<sup>63</sup> así como en cálculos de estructuras con configuraciones electrónicas degeneradas o quasi-degeneradas<sup>63-66</sup> y en el cálculo de interacciones intermoleculares<sup>67</sup>.

## V.1.4 MÉTODO MULTICONFIGURACIONAL

Si se buscan resultados de gran precisión, entonces las funciones de onda SCF son casi siempre insuficientes e incluso hay situaciones en las que los resultados obtenidos ni siquiera son cualitativamente correctos (por ejemplo, en las disociaciones moleculares del tipo  $\text{HF} \rightarrow \text{H} + \text{F}$  o en las torsiones sobre dobles enlaces). La descripción SCF asume una determinada manera de emparejarse los electrones (los acoplamientos de spin están fijados); sin embargo en gran parte de las reacciones químicas el esquema de acoplamientos de spin va cambiando a medida que la reacción progresa. Pese a ello, también en muchas ocasiones ocurre que el método SCF describe razonablemente bien a reactivos y productos y, por tanto, a las diferencias energéticas.

Una descripción completa y general de una SEP requiere el uso del método multiconfiguracional de campo autoconsistente (MCSCF), aunque su utilización está limitada a sistemas sencillos dado el elevado tiempo de cálculo.

En el método MCSCF la función de onda se expresa como combinación lineal de funciones de onda que representan distintas configuraciones electrónicas y, por tanto, utiliza varios determinantes de Slater. Por ejemplo, para la molécula de hidrógeno, la función de onda MCSCF se escribe:

$$\Psi_{MC} = c_1 \Psi_1 + c_2 \Psi_2 \quad (\text{V.34})$$

donde cada función de onda  $\Psi$  representa una configuración electrónica:  $\Psi_1$  la enlazante y  $\Psi_2$  la antienlazante. En la expresión V.34 tanto los coeficientes como los orbitales ortonormales contenidos en las funciones de onda se optimizan.

En el caso de sistemas mayores el número de funciones de onda que representan distintas configuraciones aumenta muy rápidamente con el número de orbitales activos (que participan del proceso). Si se toman en consideración todas ellas, el método se denomina del espacio activo completo y campo autoconsistente (CASSCF)<sup>68,69</sup>. En este método, el más usado del tipo MCSCF, se divide el conjunto de orbitales moleculares ocupados en tres subconjuntos: orbitales inactivos, orbitales activos y orbitales externos. Los primeros se

mantienen doblemente ocupados en todas las configuraciones que se contemplan al construir la función de onda CASSCF. Los restantes electrones ocupan los orbitales activos<sup>70</sup>. Técnicamente, el método CASSCF es más complejo que el HF, ya que está basado en una función de onda multiconfiguracional. Sin embargo, es conceptualmente simple: una vez los orbitales activos han sido escogidos, la función de onda queda completamente especificada.

En los casos en los que se necesite utilizar un conjunto grande de orbitales activos, la dimensión de la función de onda CASSCF puede resultar prohibitivamente grande, y existen diversos métodos que restringen la longitud de su expansión.

En la presente memoria se ha utilizado el método CASSCF únicamente en sistemas sencillos, con lo que no ha sido necesaria una posterior restricción de la función de onda resultante.

## V.2 MÉTODOS SEMIEMPÍRICOS

En los cálculos cuánticos basados en métodos *ab initio* la valoración de las integrales de repulsión bielectrónicas (ecuación V.10) representa alrededor del 70% del tiempo de cálculo. Además, a medida que el tamaño de la molécula aumenta, el número de estas integrales crece proporcionalmente a  $n^4$ , siendo  $n$  el tamaño del conjunto de orbitales atómicos de base (ecuación V.3).

Existen varias formas de disminuir este inconveniente. Una de ellas consiste en despreciar un determinado número de las integrales contenidas en la matriz de Fock (ecuación V.8), manteniendo sólo las integrales mono, bi y tricéntricas de Coulomb y las integrales de intercambio sobre uno y dos centros. Con ello, el número de integrales resulta<sup>71</sup> proporcional a  $n^3$ . Otra aproximación consiste en utilizar el potencial interno efectivo (ECP) o pseudopotencial. Ésta se basa en la observación de que los orbitales atómicos internos participan muy débilmente en la formación de enlaces químicos, de modo que la influencia de los electrones internos en los electrones de valencia puede expresarse mediante la introducción de las correspondientes funciones de potencial; en otras palabras, los electrones internos pueden mantenerse fijos junto al núcleo. De este modo, el tiempo de cálculo se reduce en un factor de aproximadamente diez<sup>72-74</sup>.

Finalmente, una tercera posibilidad consiste en sustituir la mayor parte de las integrales por parámetros experimentales (como potenciales de ionización en estados orbitales de valencia, por ejemplo) y utilizar expresiones aproximadas que incluyen estos parámetros para evaluar el resto de integrales. Los métodos basados en esta aproximación son los métodos semiempíricos<sup>5</sup>.

En contraste con los métodos *ab initio*, sólo toman en consideración los electrones de valencia, de manera que la influencia de los electrones internos se incluye en los parámetros empíricos.

Los esquemas y detalles de las parametrizaciones de diversos métodos semiempíricos se han descrito y analizado con detalle en la literatura<sup>3,7,10,11,74-77</sup>, de manera que sólo presentaremos brevemente en esta memoria aquéllos más frecuentemente utilizados.

El más sencillo de los métodos semiempíricos no iterativos es el método extendido de Hückel (EHM), que fue desarrollado por Hoffmann<sup>78</sup>. En este método sólo se calculan las integrales de solapamiento (ecuación V.7), mientras que los elementos de la matriz de Fock (ecuación V.8) se reemplazan por parámetros empíricos. Por tanto, estos elementos no son función de los coeficientes de expansión que se buscan y el método no es autoconsistente. El EHM se contempla hoy día como un método sólo cualitativo.

La familia de métodos semiempíricos más ampliamente empleada es la formada por los métodos autoconsistentes. En ellos, los términos de la matriz de Fock dependen de los coeficientes de expansión y, por tanto, las soluciones de las ecuaciones de Roothaan-Hall (ecuación V.6) se obtienen de modo iterativo. Los distintos métodos que forman esta familia difieren unos de otros en los procedimientos de parametrización y en el carácter y número de integrales de la ecuación V.8 que se desprecian.

El más antiguo de estos métodos es el CNDO, en el cual se desprecia completamente el solapamiento diferencial<sup>79,80</sup>. En este método se ignora la mayor parte de las integrales utilizadas en los cálculos *ab initio* y se aproximan, mediante expresiones sencillas, las integrales que se mantienen. Muchos términos, como las integrales bielectrónicas sobre un centro, se derivan de datos experimentales.

El método CNDO admite diversas variantes de parametrización, de las que el esquema CNDO/2 es la más frecuentemente usada. En ella, el conjunto de integrales bielectrónicas y de intercambio de átomos no contiguos se aproxima a cero. Entonces los elementos del operador de Fock toman la forma:

$$F_{\mu\mu} = -\frac{1}{2}(I_{\mu} + A_{\mu}) + (P_{AA} - Z_A) \quad (\text{V.35})$$

donde  $\mu$  pertenece al átomo A, y:

$$F_{\mu\nu} = -\frac{1}{2}(\beta_A^0 + \beta_B^0)S_{\mu\nu} - \frac{1}{2}\rho_{\mu\nu}\gamma_{AB} \quad (\text{V.36})$$

donde  $\mu$  y  $\nu$  se refieren a orbitales atómicos y A y B a átomos;  $I_\mu$  y  $A_\mu$  son el potencial de ionización y la electroafinidad del orbital, respectivamente;  $\gamma_{AA}$  y  $\gamma_{AB}$  son las integrales de repulsión que se calculan exactamente sobre los orbitales de tipo Slater para cada orbital atómico. El parámetro  $\beta_A^0$  depende sólo del tipo de átomo A. Se escoge de manera que se asegure el orden relativo de los niveles de energía de los orbitales moleculares ocupados y que los coeficientes de expansión de los orbitales moleculares en la CLOA coincidan con los cálculos *ab initio* utilizando el conjunto mínimo de funciones de base de orbitales atómicos.

Los mejores resultados del método CNDO/2 se obtienen en cálculos de distribuciones electrónicas y de aquellas propiedades determinadas en base a ellas, como los momentos dipolares. Sin embargo, se sobreestiman las distancias de enlace en un 10%, como consecuencia de la sobreestimación (un 20%) del carácter covalente de los enlaces. En general, describe mejor aquellas reacciones en las cuales las interacciones electrostáticas predominan sobre el papel jugado por los enlaces covalentes. Así, describe bastante bien los sistemas con enlaces de hidrógeno y reacciones de protonación de compuestos heteroatómicos.

Con el método CNDO no pueden distinguirse los estados de spin de radicales como los estados triplete y singlete de NH. Este defecto se rectificó con la introducción del método INDO, que sólo despreja de modo intermedio el solapamiento diferencial<sup>81</sup>. En este método se suprime la aproximación utilizada en CNDO de que las integrales bielectrónicas monocéntricas fueran iguales.

Ninguno de estos primeros métodos podía representar la repulsión entre pares solitarios, por ejemplo, en la hidrazina o el peróxido de hidrógeno. Por ello se desarrolló el método NDDO<sup>79</sup>, en el cual todas las interacciones, excepto las correspondientes a solapamientos diatómicos diferenciales, eran consideradas.

La aplicación de estos métodos no ofrecía buenos resultados en cuanto a la optimización de geometrías. Además, como los parámetros empleados se habían optimizado para unos sistemas determinados, estos métodos sólo podían aplicarse a unas pocas clases de sistemas.

Con objeto de obtener métodos más ampliamente utilizables, rápidos y fiables, se desarrolló una nueva familia de métodos semiempíricos denominados MINDO, que eran una modificación propuesta por Pople<sup>81</sup> de la aproximación

INDO . En estos métodos se incluye el cálculo de las integrales de intercambio ( $\mu\nu|\lambda\sigma$ ) cuando los orbitales atómicos  $\mu$  y  $\nu$  pertenecen a un mismo átomo. La parametrización de los métodos MINDO, de los que MINDO/3<sup>82</sup> es el más importante, es distinta de la empleada en CNDO/2. Los parámetros empíricos introducidos se escogen de manera que se reproducen lo mejor posible las características experimentales (geometría, calor de formación, potenciales de ionización, etc.) de un gran número de compuestos usuales. Con estos métodos se obtienen buenos resultados de calores de formación, barreras de activación y espectros vibracionales en compuestos que contengan H, C, N y O. Sin embargo, el método MINDO/3 todavía tiene importantes carencias: sobreestima los ángulos de valencia, sobre todo en el caso de dobles enlaces, sobreestima la estabilidad de pequeños ciclos, particularmente si contienen heteroátomos vecinos, también sobrevalora la estabilidad de los enlaces entre tres centros mediante un par de electrones, no es adecuado para describir sistemas con enlaces de hidrógeno dado que no reproduce la energía de estabilización por este concepto, no proporciona buenos resultados en compuestos que contienen heteroátomos vecinos con pares solitarios de electrones e infravalora la interacción entre átomos situados a distancias no covalentes.

Con objeto de subsanar las principales deficiencias se desarrolló el método MNDO<sup>83</sup>, basado en la aproximación NDDO<sup>79</sup>. En este método se toman en consideración en la matriz de Fock (ecuación V.8) las integrales de repulsión interelectrónicas que incluyen solapamientos en un centro. Las integrales ( $\mu\mu|\nu\nu$ ) entre cualquier par de orbitales de los átomos A y B no están aproximadas mediante las correspondientes integrales sobre orbitales, S, sino que se calculan para las correspondientes funciones  $\chi_\mu$  y  $\chi_\nu$ . Los parámetros empleados en el método MNDO se obtuvieron a partir de datos experimentales de 34 compuestos y fueron optimizados para reproducir los calores de formación, momentos dipolares, potenciales de ionización y geometrías moleculares observadas.

Mediante el método MNDO se mejoran los resultados del MINDO/3 en cuanto a características físicas de moléculas en el estado fundamental singlete, particularmente de las moléculas que contienen heteroátomos. Pese a ello, sigue siendo incapaz de describir correctamente los enlaces de hidrógeno y

sobrevalora las barreras de activación de las reacciones químicas. Además, como todos los métodos basados en la aproximación monodeterminantal, no es capaz de describir correctamente las reacciones de rotura de enlaces<sup>84</sup>. En estos casos se logra una descripción más completa si se incluye la energía de correlación. Un esquema en el que se ha realizado esta inclusión es el método MNDOC<sup>85</sup>, en el que la energía de correlación se calcula explícitamente con ayuda de la teoría de perturbación de segundo orden.

Esta modificación del método MNDO resulta más adecuada para estudiar intermedios y estados de transición, así como estados excitados de reacciones fotoquímicas.

La no posibilidad de reproducir enlaces por puente de hidrógeno mediante el método MNDO le ha incapacitado para el estudio de sistemas biológicos interesantes. Con objeto de corregir este defecto, se desarrolló el método AM1 (Austin Model 1)<sup>86</sup>. Está también basado en la aproximación NDDO y, además de tener una parametrización distinta a la empleada en el método MNDO, difiere de éste en que la función:

$$E_{AB} = Z_A Z_B \gamma_{AB}^{SS} (1 + f(R_{AB})) \quad (\text{V.37})$$

es reemplazada por una nueva función multiparamétrica de la energía de repulsión interna:

$$E_{AB} = Z_A Z_B \gamma_{AB}^{SS} (1 + f_A(R_{AB}) + f_B(R_{AB})) \quad (\text{V.38})$$

La introducción de la ecuación V.38 permite describir mejor los enlaces de hidrógeno y energías de activación en reacciones orgánicas, aproximándose sus valores a los obtenidos con los métodos *ab initio*.

En los sistemas en los que el método puede usarse se observa que, pese a la mejora en la descripción que métodos semiempíricos anteriores ofrecían, sigue habiendo algunos defectos en sus predicciones. Los ángulos de valencia se describen con un error promedio de 3.3° y los dihedros con un error algo mayor, dependiendo de la complejidad del sistema que se estudia. Asimismo, los

sistemas cargados se describen peor que los neutros, con lo que los resultados obtenidos en este tipo de sistemas se deben interpretar con precaución.

A medida que se ha ido progresando desde el método CNDO, más parámetros que originalmente se tomaban de los espectros atómicos se han ido tomando partiendo de datos moleculares. Así, en los métodos MNDO y AM1 sólo las integrales bielectrónicas monocéntricas siguen basándose en datos de espectros atómicos. Recientemente se ha desarrollado un nuevo método para optimizar parámetros<sup>87</sup> que emplea las primeras y segundas derivadas de todos los valores calculados como datos de referencia con objeto de acelerar la optimización. La primera aplicación de este método ha sido introducir la optimización de todas las integrales bielectrónicas monocéntricas, con lo que ya no hace falta tomarlas de datos de espectros atómicos. El método semiempírico resultante, basado también en la aproximación NDDO, se denomina PM3<sup>88</sup>. La novedad de este método obliga a interpretar con prudencia los resultados que con él se obtienen, aunque han aparecido en la bibliografía diferentes trabajos en los que se compara con otros métodos semiempíricos y se analiza la bondad de los resultados obtenidos<sup>89-104</sup>.

## V.3 EFECTO DEL MEDIO

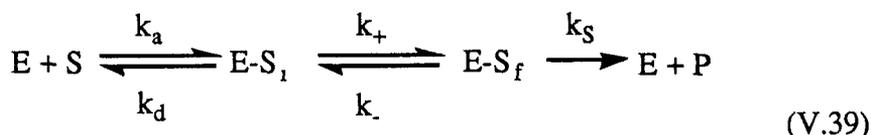
Los efectos del solvente modulan un gran número de fenómenos en física, química y biología<sup>105-111</sup>. Su tratamiento teórico ha seguido dos líneas de pensamiento diferentes pero complementarias. La primera, conocida como teoría de solvatación, trata de obtener los valores de cantidades observables, como por ejemplo la energía libre de solvatación y/o la energía de excitación<sup>109</sup>. En la segunda, conocida como teoría del efecto del solvente, la atención se centra en la función de onda electrónica del sistema para determinar cómo sus alrededores afectan a dicha función de onda o a los grados de libertad internos del sistema. Los cambios producidos en el sistema por los alrededores se miden generalmente con respecto al sistema *in vacuo* y la aproximación tiene connotaciones químico cuánticas que hacen posible el estudio de los sistemas reactivos a nivel microscópico<sup>110,111</sup>.

Fundamentalmente hay dos modelos que intentan reproducir los efectos del solvente sobre la reactividad química: una representación discreta del solvente en la cual las moléculas del mismo se representan como entidades físicas<sup>112</sup> y un modelo continuo en el cual el solvente está representado por sus propiedades macroscópicas<sup>113</sup>. Durante mucho tiempo el uso del primer modelo estaba limitado a la consideración de un número reducido de moléculas del solvente, pero las técnicas actuales de simulación de Monte Carlo (MC) y de dinámica molecular (MD) permiten la consideración de un número bastante grande de moléculas del solvente<sup>114,115</sup>. En el caso de modelos que consideran el solvente como un continuo las interacciones entre el soluto y el solvente se incorporan en métodos autoconsistentes de orbitales moleculares (SCF-MO)<sup>116</sup>, lo que permite predecir propiedades del soluto como estructuras y energías<sup>117-119</sup>. Estos modelos continuos se han desarrollado tanto en el contexto de cálculos semiempíricos como *ab initio*.

Los procesos químicos en reacciones catalizadas por enzimas usualmente tienen lugar en pequeños volúmenes (los centros activos) si se comparan con el volumen total del sistema biológico (la enzima). En su interior no se encuentra

más que un número pequeño y generalmente conocido de moléculas del solvente, por lo que los alrededores del sistema reactivo están formados principalmente por los grupos funcionales y cadenas laterales de los restos aminoácidos que componen dicho centro activo. Estos alrededores pueden alterar la cinética y termodinámica del proceso químico que se estudia.

Dentro del esquema general de catálisis enzimática que se ha presentado en el apartado IV.3, las fluctuaciones del complejo activado definen el paso de interconversión química. Las geometrías de las estructuras que forman dicho complejo están relacionadas con la estructura del ET. Un solvente que favorezca la formación del complejo activará la reacción, aumentando su velocidad. Si llamamos E a los alrededores, S a los reactivos en equilibrio y E-S<sub>1</sub> a los reactivos solvatados en una estructura similar a la que caracteriza el ET genérico sin solvente, la reacción química se describe mediante el siguiente esquema cinético:



que, como puede apreciarse, es análogo al esquema cinético IV.17. Un análisis en la aproximación del estado estacionario conduce de nuevo a las expresiones IV.18 y IV.19, en las condiciones termodinámicas de equilibrio.

Puede ocurrir que la cinética esté completamente determinada por el proceso de asociación, es decir, que  $k_d \ll k_+$  y  $k_{\text{obs}} \approx k_a$ . Este tipo de procesos son totalmente dependientes del solvente y el paso de interconversión química ya no es el paso limitante de la velocidad de la reacción.

Si el proceso tiene lugar en el centro activo de una enzima, entonces E representa dicho centro activo. Resulta evidente que la enzima altera la cinética y la termodinámica del proceso químico (catalizándolo, por tanto). Sin embargo, las geometrías de las estructuras del complejo activado y los modos de fluctuación deben mantenerse inalterados, siempre y cuando no se produzca un cambio en el mecanismo global del proceso químico debido a la enzima. Esta afirmación está basada en el hecho experimentalmente conocido de la existencia

de estados de transición análogos que, como se ha indicado en el capítulo IV, son moléculas estables con estructuras muy similares a la ET en el vacío, que se unen fuertemente al centro activo de la enzima<sup>120</sup>, inhibiéndola en muchos casos<sup>121</sup>.

La aplicación de los ET análogos no está restringida al campo de la catálisis enzimática<sup>122</sup>: recientemente se han generado cavidades complementarias en forma a dichos ET análogos en catalizadores heterogéneos no biológicos, como polímeros orgánicos<sup>123</sup> o geles de sílice que contienen alúmina<sup>122,124,125</sup>.

## V.4 PROGRAMAS Y ORDENADORES

Los cálculos efectuados para la obtención de los resultados que presentamos en esta memoria han requerido una gran cantidad de tiempo de CPU y una constante optimización de los medios. Casi todos ellos se han realizado en el "cluster" de estaciones de trabajo Hewlett-Packard 730 del Centre de Procés de Dades de la Universitat Jaume I, que ha ido evolucionando con la adición de memoria RAM y espacio en disco desde los modelos originales, de la serie Apollo 9000/700 hasta su configuración actual.

También se realizaron algunos cálculos, correspondientes al capítulo VII.1, en el IBM 3090/150 del Centre d'Informàtica de la Universitat de València y en el CRAY XMP 14 SE del centro de computación de Construcciones Aeronáuticas S. A.

Los programas empleados han sido el MOPAC 5.0<sup>87</sup> para la realización de cálculos semiempíricos, los de la serie GAUSSIAN: GAUSSIAN88<sup>126</sup>, GAUSSIAN90<sup>127</sup> y GAUSSIAN92<sup>128</sup> tanto para la realización de cálculos semiempíricos como *ab initio* y el MONSTERGAUSS<sup>129</sup> en algunos cálculos *ab initio*.

Asimismo, en el apartado VII.2 hemos incluido algunos cálculos que toman en consideración el efecto del solvente. Estos cálculos se han realizado con el programa AMSOL 3.0<sup>130</sup>, que permite calcular energías libres de solvatación en disolución acuosa mediante cálculos de campo autoconsistente.

Todos estos programas han sido implementados y optimizados en colaboración con el personal del Centre de Procés de Dades de esta Universidad.

En las optimizaciones de geometría en las que hemos empleado el MONSTERGAUSS se ha utilizado la técnica de minimización óptimamente condicionada<sup>131,132</sup>, tomando como criterio de convergencia que el promedio del gradiente fuera menor que  $5 \cdot 10^{-4}$  mdinas. Por su parte, en aquéllas realizadas con el uso de los programas de la familia de los GAUSSIAN se han empleado las rutinas analíticas de Berny<sup>133,134</sup> con los criterios de una convergencia en la

matriz de densidad de  $10^{-9}$  unidades atómicas y un umbral máximo para el desplazamiento de 0.0018 Å y para la fuerza de 0.00045 hartree/bohr.

En los cálculos realizados con el MONSTERGAUSS en los que se buscan ET se ha empleado el programa VA05<sup>135</sup> y en los realizados con los GAUSSIAN el método de seguir el vector propio<sup>136</sup>. En ambos casos hemos utilizado el algoritmo de partición del espacio presentado en el apartado IV.3.3.

## Referencias

- (1) Eyring, H.; Lin, S. H. *Physical chemistry: an advanced treatise*; Academic Press: New York, 1975; Vol. 6.
- (2) Durán, M.; Bertrán, J. *Reports in Molecular Theory* **1990**, *1*, 57.
- (3) Dewar, M. J. S. *Int. J. Quantum Chem.* **1992**, *44*, 427.
- (4) Healy, E. F.; Holder, A. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1993**, *281*, 141.
- (5) Minkin, V. I.; Simkin, B. Y.; Minyaev, R. M. *Quantum Chemistry of Organic Compunds*; Springer-Verlag: New York, 1990.
- (6) Levine, R. D. *Quantum mechanics of molecular rate processes*; Charendon Press: Oxford, 1969.
- (7) Pople, J. A.; Beveridge, D. L. *Aproximate molecular orbital theory*; McGraw-Hill: New York, 1970.
- (8) Schaefer, H. F. *The electronic structure of atoms and molecules. A survey of rigorous quantum mechanical results*; Addison-Wesley: Massachusetts, 1972.
- (9) Csizmadia, I. G. *Theory and practice of MO calculation on organic molecules*; Elsevier: Amsterdam, 1976.
- (10) Minkin, V. I.; Simkin, B. Y.; Minyaev, R. M. *Theory of the molecular structure*; Vysshaya Shkola: Moscow, 1979.
- (11) Zhidomirov, G. M.; Bagaturyants, A. A.; Abronin, I. A. *Applied quantum chemistry*; Khimia: Moscow, 1979.
- (12) Szabo, A.; Ostlund, N. S. *Modern quantum chemistry. Introduction to advanced electronic structure theory*; McGraw-Hill: New York, 1989.
- (13) Hehre, W. J.; Radom, L.; Schleyer, P. v. R.; Pople, J. A. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*; John Wiley & Sons: New York, 1986.
- (14) Hehre, W. J. *Acc. Chem. Res.* **1976**, *9*, 399.
- (15) Clementi, E. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4426.
- (16) Goddard III, W. A. *Science* **1985**, *227*, 917.
- (17) Levy, M.; Perdew, J. P. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84*, 4519.
- (18) Pauli, W. *Z. Physik* **1925**, *31*, 765.
- (19) Slater, J. C. *Phys. Rev.* **1930**, *35*, 509.
- (20) Slater, J. C. *Phys. Rev.* **1929**, *34*, 1293.

- (21) Slater, J. C. *Phys. Rev.* **1930**, *36*, 57.
- (22) Boys, S. F. *Proc. Royal Soc. (London)* **1950**, *A 200*, 542.
- (23) Levine, I. N. In *Quantum chemistry*; Tercera ed. Allyn and Bacon: Boston, 1983; pp 172-192.
- (24) Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, *23*, 69.
- (25) Hall, G. G. *Proc. Roy. Soc. (London)* **1951**, *A205*, 541.
- (26) Pople, J. A.; Nesbet, R. K. *J. Chem. Phys.* **1959**, *22*, 571.
- (27) McWeeny, R.; Dierksen, G. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 4852.
- (28) Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **1960**, *23*, 179.
- (29) Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Dobosh, P. A. *Mol. Phys.* **1974**, *28*, 1423.
- (30) Hinchliffe, A. *Ab initio determination of molecular properties*; Adam Hilger: Bristol, 1987.
- (31) Hehre, W. J.; Stewart, R. F.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 2657.
- (32) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Stewart, R. F.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 2769.
- (33) Pietro, W. J.; Levi, B. A.; Hehre, W. J.; Stewart, R. F. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 2225.
- (34) Pietro, W. J.; Hout Jr., R. F.; Blurock, E. S.; Hehre, W. J.; DeFrees, D. J.; Stewart, R. F. *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 3650.
- (35) Pietro, W. J.; Hehre, W. J. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 241.
- (36) Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 939.
- (37) Gordon, M. S.; Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2797.
- (38) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724.
- (39) Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 4233.
- (40) Dill, J. D.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1975**, *62*, 2921.
- (41) Hehre, W. J.; Lathan, W. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 5255.
- (42) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257.
- (43) Binkley, J. S.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 879.
- (44) Francl, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFrees, D. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654.

- (45) Dunning, T. H.; Hay, P. J. In *Modern theoretical chemistry* Plenum Press: New York, 1976; pp 1-28.
- (46) Hariharan, P. C.; Pople, J. A. *Chem. Phys. Letters* **1972**, *66*, 217.
- (47) Krishnan, R.; Frisch, M. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 4244.
- (48) DeFrees, D. J.; Levi, B. A.; K., P. S.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4085.
- (49) Dykstra, C. E.; Shaefer III, H. F. In *The chemistry of ketenes and allenes*; S. Patai, Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1980.
- (50) Dunning, T. H.; Hay, P. J. In *Modern theoretical chemistry*; H. F. Schaefer III, Ed.; Plenum Press: New York, 1977; Vol. 3.
- (51) Kollmar, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 2665.
- (52) Chandrasekhar, J.; Andrade, J. G.; Schleyer, P. v. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5609.
- (53) Duke, A. *J. Chem. Phys. Letters* **1973**, *21*, 275.
- (54) Driessler, F.; Ahlrichs, R.; Staemmler, V.; Kutzelnigg, W. *Theoret. Chim. Acta* **1973**, *30*, 315.
- (55) Clark, T.; Chandrasekhar, J.; Spitznagel, G. W.; Schleyer, P. v. R. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 294.
- (56) Löwdin, P. O. *Adv. Chem. Phys.* **1959**, *2*, 207.
- (57) Pople, J. A.; Binkley, J. S.; Seeger, R. *Int. J. Quant. Chem. Symp.* **1976**, *10*, 1.
- (58) Moller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618.
- (59) Levine, I. N. In *Quantum Chemistry*; Tercera ed. Allyn and Bacon: Boston, 1983.
- (60) Pople, J. A.; Seeger, R.; Krishnan, R. *Int. J. Quant. Chem. Symp.* **1977**, *11*, 149.
- (61) Krishnan, R.; Pople, J. A. *Int. J. Quant. Chem.* **1978**, *14*, 91.
- (62) Raghavachari, K.; Pople, J. A.; Replogle, E. S.; Head-Gordon, M. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 5579.
- (63) Spellmeyer, D. C.; Houk, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3412.
- (64) Bally, T.; Masamune, S. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 343.
- (65) Dewar, M. J. S.; Komornicki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 61.
- (66) Voter, A. F.; Goddard III, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2830.

- (67) Kaplan, I. G. *Introduction to the theory of intermolecular interactions*; Nauka: Moscow, 1982.
- (68) Hegarty, D.; Robb, M. A. *Mol. Phys.* **1979**, *38*, 1795.
- (69) Eade, R. H. E.; Robb, M. A. *Chem. Phys. Letters* **1981**, *83*, 362.
- (70) Roos, B. O. In *Lecture notes in quantum chemistry*; B. O. Roos, Ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1992; Vol. 58; pp 177-254.
- (71) Halgren, T. A.; Keier, D. A.; Hall, J. H.; Brown, L. D.; Lipscomb, W. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6595.
- (72) Leasure, S. C.; Martin, T. P.; Balint-Kurti, G. G. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 1186.
- (73) Bachelet, G. B.; Hamann, D. R.; Schuler, M. *Phys. Rev. B* **1982**, *26*, 4199.
- (74) Segal, G. A. *Semiempirical methods of electronic structure calculation. Part A: techniques. Part B: applications*; Plenum Press: New York, 1977.
- (75) Schembelov, G. A.; Ustynyuk, Y. A.; Mamaev, V. M. *Quantum chemical methods of molecular calculations*; Khimia: Moscow, 1980.
- (76) Thiel, W. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 7393.
- (77) Stewart, J. J. P. In *Reviews in computational chemistry*; K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Ed.; VCH Publishers, Inc.: New York, 1990; pp 45-81.
- (78) Hoffmann, R. *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 1397.
- (79) Pople, J. A.; Santry, D. P.; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, S129.
- (80) Pople, J. A.; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, S136.
- (81) Pople, J. A.; Beveridge, D. L.; Dobosh, P. A. *J. Chem. Phys.* **1967**, *47*, 2026.
- (82) Bingham, R. C.; Dewar, M. J. S.; Lo, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1285.
- (83) Dewar, M. J. S.; Thiel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4899.
- (84) Engelke, R. *Chem. Phys. Letters* **1981**, *83*, 151.
- (85) Thiel, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1413.
- (86) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- (87) Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 209.

- (88) Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 221.
- (89) Schröder, S.; Daggett, V.; Kollman, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8922.
- (90) Daggett, V.; Schröder, S.; Kollman, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8926.
- (91) Schröder, S.; Buckley, N.; Oppenheimer, N. J.; Kollman, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8232.
- (92) Dewar, M. J. S.; Healy, E. F.; Holder, A. J.; Yuan, Y. C. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 541.
- (93) Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 543.
- (94) Gano, J. E.; Jacob, E. J.; Roesner, R. *J. Comput. Chem.* **1991**, *12*, 126.
- (95) Salhi, N.; Hedstrom, M.; Eriksson, L. A.; Calais, J. L. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1992**, *276*, 141.
- (96) Buemi, G. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1990**, *208*, 253.
- (97) McEwen, I. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1992**, *276*, 141.
- (98) Ríos, M. A.; Rodríguez, J. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 860.
- (99) Konshin, H. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1992**, *276*, 341.
- (100) Smith, D. A.; Ulmer II, C. W.; Gilbert, M. J. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 640.
- (101) Zerner, M. C. In *Reviews in computational chemistry II*; K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, Ed.; VCH Publishers: New York, 1991; Vol. 2; pp 313-365.
- (102) Anders, E.; Katritzky, A. R.; Malhotra, N.; Stevens, J. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3698.
- (103) Zheng, Y. J.; Merz Jr., K. M. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1151.
- (104) Bockisch, F.; Rayez, J. C.; Liotard, D.; Duguay, B. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1047.
- (105) Amis, E. S.; Hinton, F. H. *Solvent effects on chemical phenomena*; Academic Press: New York, 1973.
- (106) *Ions and molecules in solution*; Elsevier: Amsterdam, 1983.
- (107) *Annual review of physical chemistry*; Ann. Rev. Inc.: Palo Alto CA, 1986; Vol. 37.

- (108) *The chemical physics of solvation. Part B: spectroscopy of solvation*; Elsevier: Amsterdam, 1986.
- (109) *The chemical physics of solvation. Part A: theory of solvation*; Elsevier: Amsterdam, 1985.
- (110) Tapia, O. In *Quantum theory of chemical reactivity*; R. Daudel, A. Pullman, L. Salem and A. Veillard, Ed.; Reidel: Dordrecht, 1980; Vol. 2.
- (111) Tapia, O. In *Molecular interactions*; H. Ratajczak and W. J. Orville, Ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 1982; Vol. 3.
- (112) Pullman, A. In *The world of quantum chemistry*; R. Daudel and B. Pullman, Ed.; Reidel: Dordrecht, 1974.
- (113) Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486.
- (114) Chandrasekhar, J.; Smith, S. F.; Jorgensen, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 154.
- (115) McCammon, J. A.; Harvey, S. C. *Dynamics of proteins and nucleic acids*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1987.
- (116) Young, P. E.; Hillier, I. H. *Chem. Phys. Letters* **1993**, *215*, 405.
- (117) Wong, M. W.; Frisch, M. J.; Wiberg, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4776.
- (118) Bertrán, J.; Ruiz-López, M. F.; Rinaldi, D.; Rivail, J. L. *Theoret. Chim. Acta* **1992**, *84*, 181.
- (119) Bonaccorsi, R.; Palla, P.; Tomasi, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1945.
- (120) Lienhard, G. E. *Science* **1973**, *180*, 149.
- (121) Wolfenden, R.; Radzicka, A. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1991**, *1*, 780.
- (122) Heilmann, J.; Maier, W. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 471.
- (123) Wulff, G.; Kirstein, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 684.
- (124) Morihara, K.; Kurihara, J.; Suzuki, J. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 3991.
- (125) Morihara, K.; Kurokawa, M.; Kamata, Y.; Shimada, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 358.
- (126) Frisch, M. J.; Head-Gordon, M.; Schlegel, H. B.; Raghavachari, K.; Binkley, J. S.; Gonzalez, C.; Defrees, D. J.; Fox, D. J.; Whiteside, R. A.; Seeger, R.; Melius, C. F.; Baker, J.; Martin, R. L.; Kahn, L. R.; Stewart,

- J. J. P.; Fluder, E. M.; Topiol, S.; Pople, J. A. *GAUSSIAN88* 1988, Gaussian Inc, Pittsburgh PA.
- (127) Frisch, M. J.; Head-Gordon, M.; Trucks, G. W.; Foresman, J. B.; Schlegel, H. B.; Raghavachari, K.; Robb, M. A.; Binkley, J. S.; Gonzalez, C.; Defrees, D. J.; Fox, D. J.; Whiteside, R. A.; Seeger, R.; Melius, C. F.; Baker, J.; Martin, R. L.; Kahn, L. R.; Stewart, J. J. P.; Topiol, S.; Pople, J. A. *GAUSSIAN90* 1990, Gaussian Inc, Pittsburgh PA.
- (128) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Head-Gordon, M.; Gill, P. M.; Wong, M. W.; Foresman, J. B.; Johnson, B. G.; Schlegel, H. B.; Robb, M. A.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Andres, J. L.; Raghavachari, K.; Binkley, J. S.; Gonzalez, C.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Defrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. J. P.; Pople, J. A. *GAUSSIAN92, Revision A* 1992, Gaussian Inc, Pittsburgh PA.
- (129) Peterson, M. R.; Poirier, R. A. *Program MONSTERGAUSS* 1983, University of Toronto.
- (130) Cramer, C. J.; Lynch, G. C.; Truhlar, D. G. *AMSOL 3.0* 1992, Minneapolis. Department of Chemistry, University of Minnesota.
- (131) Davidson, N. C. *Math. Prog.* 1975, 9, 1.
- (132) Bell, S.; Crighton, J.; Fletcher, R. *Chem. Phys. Letters* 1981, 82, 122.
- (133) Schlegel, H. B. *J. Comput. Chem.* 1982, 3, 214.
- (134) Schlegel, H. B. *J. Chem. Phys.* 1982, 77, 3676.
- (135) Powell, M. J. D. *Program VA05AD, Harwell Subroutine Library, Atomic Energy Research Establishment, Harwell, U.K.*
- (136) Tsai, C. J.; Jordan, K. D. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 11227.

..

## VI. OBJETIVOS

La caracterización del mecanismo molecular de una reacción química supone conocer los puntos estacionarios del camino de reacción que desde los reactivos lleva hasta los productos pasando por el (o los) estado de transición. Por extensión del postulado de Pauling, la caracterización de una reacción química que tiene lugar en el centro activo de una enzima requiere la obtención de la estructura del complejo activado, esto es, de la estructura capaz de encajar en el centro activo y experimentar allí una fluctuación que se corresponda con el proceso químico elemental que cataliza la enzima. De este modo, además de conocer el ET de la reacción, interesará conocer las estructuras de precursores y sucesores. Dichas estructuras se derivarán necesariamente de la del ET, puesto que es el ET quien contiene la información química de la reacción.

Las técnicas experimentales, a pesar del gran desarrollo que han venido experimentando métodos como la espectroscopía laser de alta resolución, estudios de efectos isotópicos o la más reciente ingeniería molecular que permite obtener

estados de transición análogos, sirven para obtener de modo indirecto información acerca de las ET. Por consiguiente, la única alternativa válida para obtener y caracterizar directamente estas estructuras es la utilización de las técnicas computacionales de la química teórica.

La química computacional es una herramienta fundamental tanto en la obtención de estas estructuras moleculares como en la interpretación de las propiedades químicas asociadas a ellas. Como hemos visto, disponemos de avanzados programas y potentes ordenadores que pueden llevar a cabo cálculos cuánticos que hace sólo diez años eran irrealizables.

Las líneas de investigación en las que nuestro grupo trabaja no se limitan a aplicar de modo rutinario los paquetes de cálculo de que disponemos, sino que utilizamos esta herramienta con el objeto de comprobar y demostrar las teorías y técnicas que elaboramos, como la teoría de catálisis enzimática presentada en el apartado IV.3 de la presente memoria, la técnica de partición del espacio para localizar ET presentada en el apartado IV.3.3, el postulado de la invariancia fundamental del ET o, más recientemente, una teoría generalizada de reactividad química esbozada en los apartados IV.3.1 y IV.3.2. La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de una de las líneas de investigación de nuestro grupo, iniciada en 1982 y desarrollada en nuestro Departamento, sobre el estudio teórico de mecanismos moleculares que tienen lugar en el centro activo de diferentes enzimas.

Los objetivos que se persiguen al realizar el presente trabajo son los siguientes:

- 1.- Explicar la bifuncionalidad observada en la enzima Rubisco, esto es, el hecho de que la enzima cataliza tanto la reacción de carboxilación que inicia la fase oscura del proceso fotosintético como la reacción de oxigenación que inicia el proceso fotorrespiratorio.

- 2.- Obtener y caracterizar los mecanismos moleculares correspondientes a los procesos de enolización, carboxilación y oxigenación catalizados por la enzima Rubisco, obteniendo los correspondientes ET y los VT asociados utilizando diferentes modelos moleculares que representen al sustrato real.

3. Explicar, asimismo, el fenómeno de la inactivación de la Rubisco observada *in vitro*, relacionada con el paso de la enolización.

Además de estos tres objetivos que, una vez alcanzados, llevarían a la obtención de un esquema completo capaz de explicar satisfactoriamente los primeros pasos de los procesos que cataliza la enzima y a obtener información que sería útil para futuros estudios, tanto teóricos como experimentales, en el presente trabajo también nos planteamos otros objetivos:

4.- Comprobar la validez del postulado de la invariancia del ET frente a las interacciones con el medio, entendiendo esta invariancia como invariancia en la geometría de la estructura del ET e invariancia de las fluctuaciones descritas por el VT asociado. Para ello se realizarán cálculos *in vacuo* y cálculos en los que el medio está incluido y se compararán los resultados obtenidos *in vacuo* con los observados experimentalmente.

5.- Comprobar la validez de la utilización de modelos pequeños para representar al sustrato real, mediante la comparación con los resultados obtenidos con el uso de modelos cada vez más aproximados a dicho sustrato real y mediante la comparación de los resultados obtenidos teóricamente con los estados de transición análogos caracterizados experimentalmente.

6.- Comprobar la invariancia de los resultados obtenidos (geometrías y vectores de transición principalmente) frente al método de cálculo utilizado. Para ello se utilizará tanto el método semiempírico AM1 como el método *ab initio* con una amplia variedad de conjuntos de funciones de base, con inclusión de la energía de correlación tanto mediante métodos variacionales (CI) como mediante métodos perturbacionales (MP2), así como métodos multideterminantales (CASSCF) en los casos en los que el tamaño del modelo molecular utilizado así lo permita.

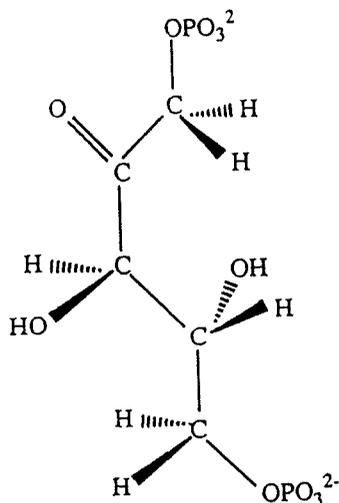


# **VII. RESULTADOS**

## **VII.1 BIFUNCIONALIDAD DE LA ENZIMA**

### **VII.1.1 INTRODUCCIÓN**

En la enzima Rubisco, una vez que el sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato (Figura VII.1) se ha enolizado, pueden tener lugar dos reacciones sobre el mismo centro (el carbono 2 del sustrato): la carboxilación y la oxigenación<sup>1</sup> (ver sección II.2). La razón por la cual la enzima exhibe esta bifuncionalidad sigue siendo un misterio<sup>2,3</sup>.



**Figura VII.1** D-Ribulosa-1,5-bifosfato, el sustrato de las reacciones catalizadas por la enzima Rubisco.

En el centro activo no hay metales de transición que puedan activar al oxígeno hasta su estado electrónico singlete. De modo que el problema reside en comprender cómo dos reacciones que involucran a moléculas en estados electrónicos de spin diferentes (el dióxido de carbono es singlete y el oxígeno triplete), pueden tener lugar con el mismo sustrato, de manera que los productos de ambas reacciones están en su estado electrónico fundamental singlete.

Uno de los principales objetivos de los estudios de ingeniería genética molecular que se han realizado sobre la Rubisco consiste en tratar de mejorar su acción catalítica, de tal manera que se incrementara la eficiencia en la fijación natural del  $\text{CO}_2$  a expensas de la reacción de oxigenación. A este respecto, se han completado numerosos estudios experimentales de mutagénesis dirigida acerca del papel jugado por los restos aminoácidos que componen el centro activo<sup>4-8</sup>, pero ninguno de ellos ha resultado en un incremento práctico de la eficiencia de la Rubisco natural.

Los datos de Rayos X muestran que el sustrato en su forma enediólica, así como un ET análogo, son formas no planas *cis*<sup>1,9,10</sup>. Bajo estas condiciones

geométricas tensionadas se sugirió por parte de nuestro grupo<sup>11</sup> que el estado triplete de la molécula de oxígeno puede combinarse con el estado electrónico triplete del enodiol deformado, para formarse una supermolécula reactiva que, en una etapa posterior, experimentaría una inversión de spin hasta el estado singlete de los productos, explicándose de esta manera la reacción de oxigenación y, en consecuencia, la bifuncionalidad de la enzima. Este proceso puede tener lugar si el estado triplete del sustrato se encuentra energéticamente accesible. Precisamente la hipótesis propuesta por nuestro grupo consiste en suponer que la propia deformación que el sustrato experimenta en el interior del centro activo de la enzima es la causa de una disminución en la energía del estado triplete.

Por tanto, resulta de gran importancia calcular con métodos químico cuánticos fiables la diferencia energética entre los estados singlete y triplete del sustrato en función de los parámetros geométricos responsables de la deformación encontrada en el sistema real: esencialmente la rotación sobre el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del sustrato y la piramidalización fuera del plano de los átomos unidos a uno de los carbonos.

Para ello hemos seleccionado tres modelos moleculares que representan al sustrato real en su forma enodiólica: el 1,2-dihidroxi-etileno, que es el modelo mínimo necesario para representar el doble enlace enodiólico; el 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato, en el cual el modelo se amplía prácticamente hasta el sustrato sin la inclusión de los grupos fosfato; y el 1-2 dihidroxi-etileno con la inclusión del catión  $Mg^{2+}$  situado respecto al doble enlace en la posición experimentalmente determinada en el centro activo de la Rubisco.

## VII.1.2 MODELO 1,2-DIHIROXIETILENO

Los derivados del etileno siguen atrayendo la atención de los científicos que intentan comprender sus propiedades moleculares, tanto en su estado electrónico fundamental singlete (S) como en el primer estado electrónico excitado triplete (T)<sup>12-14</sup>. Por ello, la isomerización *cis-trans* en derivados 1,2-sustituídos se ha analizado extensamente<sup>15-19</sup>. En particular, el estudio del 1,2-dihidroxi-etileno ha sido motivo de especial interés por su presencia como especie intermedia en diversos mecanismos de reacciones orgánicas<sup>20-22</sup>. Este fragmento

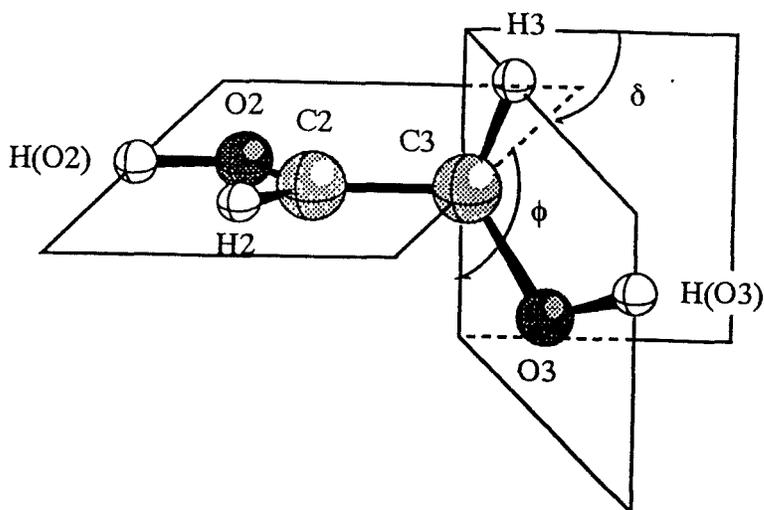
interviene en diversos procesos enzimáticos, como en el caso que nos ocupa o en el proceso catalítico de la enzima triosafosfato isomerasa<sup>23,24</sup>.

Aunque se han realizado algunos cálculos *ab initio* sobre el compuesto 1,2-dihidroxietileno utilizando diferentes conjuntos de funciones de base<sup>25-28</sup>, las propiedades de los estados excitados y, en particular, las del primer triplete no están totalmente aclaradas. Por ejemplo, Lin y Laidler<sup>29</sup> estudiaron el mecanismo de la isomerización *cis-trans*, para el cual propusieron dos caminos alternativos: un camino en el cual se produce una interconversión entre los estados triplete y singlete y otro en el cual el estado singlete cruza una barrera energética correspondiente a un ángulo de rotación sobre el doble enlace de 90°.

En nuestro caso el interés se centra en el cambio de la diferencia energética entre los estados S-T en función de las variables geométricas que definen el sistema. Además, dado que el sustrato en el centro activo de la enzima tiene una conformación no plana, aproximadamente *cis*, el rango que nos interesa para la rotación sobre el doble enlace va desde 0 hasta unos 60° y, por tanto, no trataremos de reproducir de forma exacta la barrera rotacional para el compuesto modelo. Los resultados que obtengamos de la barrera servirán más bien como una prueba de la bondad del método empleado.

El salto energético S-T se estudia como función de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$  que describen, respectivamente, la rotación alrededor del doble enlace C2-C3 y la posterior piramidalización de uno de los dos carbonos. En la Figura VII.2 se representan estos ángulos junto con la numeración empleada con los átomos que forman la molécula modelo.

Hemos obtenido las SEP como función de estas dos variables, permitiendo una completa optimización del resto de variables geométricas en cada punto. Hemos elegido la conformación del 1,2-dihidroxietileno en la forma *ss*, con los hidrógenos de los grupos hidroxilo dirigidos hacia el exterior del doble enlace. En un estudio previo hemos comprobado que el hecho de tomar una u otra conformación para el modelo no influye en los resultados. Las SEP que presentamos se han calculado para valores de  $\phi$  entre 0 y 180° con intervalos de 10° y para valores de  $\delta$  entre -60 y +60°, también con intervalos de 10°. De este modo se han calculado unos 250 puntos de cada SEP.



**Figura VII.2** Numeración de los átomos de 1,2-dihidroxi-etileno y los ángulos de rotación alrededor del doble enlace,  $\phi$ , y su posterior pirimidización,  $\delta$ .

Los niveles de cálculo han sido diversos: hemos empleado el método semiempírico AM1 para probar su fiabilidad en reproducir el comportamiento esencial de los cambios en la diferencia energética S-T, ya que este método se aplicará a sistemas más complejos que representen al sustrato de la Rubisco. Así mismo, hemos utilizado el método HF (RHF para el estado singlete y UHF para el triplete) con los conjuntos de funciones de base 4-31G, 3-21G\* y 6-31G\*.

Hemos extendido posteriormente el nivel del cálculo mediante la inclusión de la energía de correlación electrónica. Para ello hemos utilizado la teoría de perturbaciones de segundo orden, optimizando completamente las estructuras a nivel MP2/6-31G\*, y la teoría variacional (donde sólo hemos estudiado la variación de la energía con  $\phi$ ), realizando una interacción de configuraciones en la

que incluimos todas las excitaciones sencillas y dobles (CISD) sobre las geometrías previamente optimizadas MP2/6-31G\*.

Finalmente se ha llevado a cabo un estudio CASSCF en el que el espacio activo consta de dos orbitales ( $\pi$  y  $\pi^*$ ) y dos electrones, también sobre las geometrías MP2/6-31G\*.

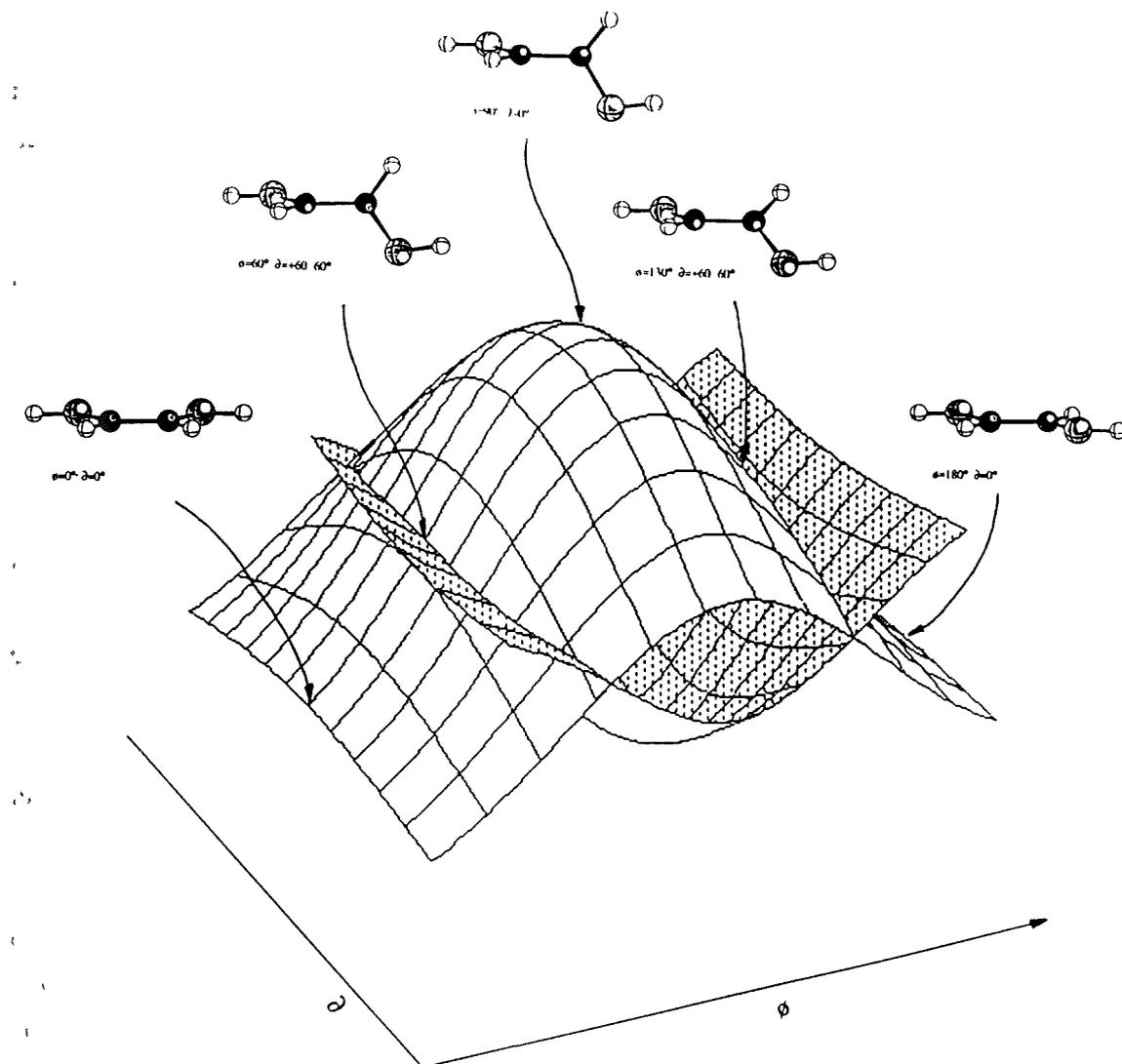
El etileno se estudia como indicativo de la calidad de los cálculos realizados sobre el modelo enodiol, dado que existen datos experimentales con los que comparar nuestros resultados.

Para el estado triplete se han encontrado valores muy bajos de contaminación de spin, y los valores de la multiplicidad de spin  $S(S+1)$  varían entre 2.0001 y 2.0204 en los diferentes puntos de las hipersuperficies.

### VII.1.2.1 Energías

Las SEP calculadas se presentan en las Figuras VII.3 a VII.7 (que se encuentran en el Apéndice). Como puede apreciarse en ellas, la influencia del método de cálculo empleado es baja con respecto a la topología de las SEP, excepto en el caso del cálculo AM1 en el cual los resultados difieren bastante de los obtenidos con el método *ab initio*.

Tal como sucede con el etileno<sup>15,16,30-33</sup> y compuestos relacionados<sup>34-37</sup>, la rotación alrededor del doble enlace desestabiliza el estado singlete y estabiliza el estado triplete. La posterior piramidalización tiene un efecto menos pronunciado sobre las SEP correspondientes a estados singlete: en las conformaciones *cis* o *trans* requiere varias kcal/mol pero a medida que el sistema está más torsionado es más fácil la posterior piramidalización y resulta en un efecto estabilizador para la molécula rotada 90°. Esto lleva a la conclusión de que la flexibilidad de la molécula se incrementa a medida que el sistema se torsiona. Sobre las SEP en estado triplete la piramidalización ejerce un efecto que puede describirse como opuesto.



**Figura VII.8.** Representación esquemática de los resultados *ab initio* HF y semiempíricos AM1 para las SEP singlete y triplete. Las regiones de mínimos, máximos y de cruzamiento entre las SEP se indican, mostrando la geometría del modelo.

Puede apreciarse que en todos los casos los cálculos predicen un cruzamiento entre las SEP de los estados singlete y triplete, aunque el ángulo para el que se predice dicho cruzamiento varía en función del método de cálculo utilizado. Así, para un valor de  $\delta=0^\circ$ , tanto el método AM1 como los métodos HF predicen un cruce de estados para un valor de  $\phi$  en el intervalo entre  $50$  y  $60^\circ$ . Otro cruzamiento ocurre en los alrededores de  $\phi=120^\circ$ . Este comportamiento se representa en la Figura VII.8, en la que se incluyen esquemáticamente las geometrías del modelo.

En la Tabla VII.1 presentamos una selección de los valores de las energías calculados en función de  $\phi$  y  $\delta$  para este modelo en los estados singlete y triplete mediante los métodos AM1 y HF.

Como es bien conocido, los cálculos HF-SCF no representan correctamente la región cerca de los  $90^\circ$  de torsión<sup>12-19</sup> y es importante incluir los efectos de la correlación electrónica sobre el comportamiento de la diferencia energética S-T.

El método MP2/6-31G\* (Figuras VII.7) predice que el cruzamiento tendrá lugar entre  $70$  y  $80^\circ$ . Los resultados obtenidos mediante este método para diferentes valores de  $\phi$  y  $\delta$  se detallan en la Tabla VII.2. El aumento en el valor del ángulo para el que se predice el cruzamiento de estados es debido sobre todo a un incremento en el valor de las energías del estado triplete y, en menor medida, a la disminución de las energías correspondientes al estado singlete.

**Tabla VII.1** Energías relativas (en kcal/mol) de puntos escogidos de las SEP de los estados singlete (S) y triplete (T) para diversos valores de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , ambos en grados. Se presentan los resultados de los métodos HF/3-21G\* (I), HF/4-31G (II), HF/6-31G\* (III) y AM1 (IV). Los valores de las energías totales para la estructura de referencia ( $\phi=180^\circ$ ,  $\delta=0^\circ$ , estado singlete) son: I, -226.465594; II, -227.405791; III, -227.729647 y IV, -0.120385 unidades atómicas.

$\phi/\delta$	S				T			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
0/0	2.76	2.38	0.30	1.85	61.92	60.56	59.42	31.28
0/ $\pm$ 30	11.64	11.55	8.92	9.74	59.01	57.79	55.37	32.56
50/-20	35.94	35.26	32.41	20.25	50.49	48.14	46.67	27.81
50/0	37.40	36.56	34.72	20.78	50.51	47.87	46.91	26.97
50/20	44.23	43.49	42.09	20.25	49.05	46.55	45.04	27.45
60/-20	49.08	48.33	45.40	27.42	47.58	44.92	43.68	26.59
60/0	51.78	50.88	49.05	28.79	47.53	44.70	43.87	25.77
60/20	58.72	57.92	56.57	35.21	46.58	43.98	42.61	26.48
90/-30	95.15	94.57	89.87	54.49	42.64	39.89	38.97	25.64
90/-20	99.67	98.83	95.42	57.13	42.27	39.45	38.81	24.11
90/0	106.90	105.05	102.88	60.54	42.68	39.87	39.47	23.73
90/30	96.76	94.01	90.18	56.81	43.95	41.50	38.27	26.83
130/-60	60.31	62.26	59.96	53.82	52.14	50.79	49.64	40.28
130/0	36.02	35.38	33.96	20.56	48.34	45.76	45.85	25.98
130/60	44.19	45.21	40.53	35.90	57.37	56.41	54.38	42.78
180/0	0.00	0.00	0.00	0.00	57.48	54.90	55.56	29.77
180/ $\pm$ 30	8.68	8.98	8.66	7.66	54.35	52.19	51.71	30.80

**Tabla VII.2** Energías relativas (en kcal/mol) de puntos escogidos de las SEP de los estados singlete (S) y triplete (T) para diversos valores de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , ambos en grados. Se presentan los resultados del método MP2/6-31G\*. La energía total de la estructura de referencia ( $\phi=0^\circ$ ,  $\delta=0^\circ$ , estado singlete) es -228.352372 unidades atómicas.

$\phi$	$\delta$	S	T
0	0	0.00	82.24
0	$\pm 30$	6.81	78.97
60	-20	37.85	65.16
60	0	41.76	64.71
60	20	48.61	63.98
70	-20	50.47	62.66
70	0	55.44	63.76
70	20	62.25	62.13
80	-20	64.44	60.99
80	0	70.29	60.74
80	20	76.86	61.12
90	-30	75.98	60.90
90	-20	79.40	60.21
90	0	85.89	60.23
90	30	74.96	62.09
180	0	0.01	78.99
180	$\pm 30$	6.96	75.87

La inclusión de la energía de correlación mediante el método variacional (CISD) ofrece resultados similares a los obtenidos mediante el método MP2. En este caso, dada la cantidad de tiempo de CPU requerido, no hemos realizado un estudio exhaustivo de la SEP, sino que hemos estudiado el comportamiento de los valores de energía del 1,2-dihidroxietileno en función del ángulo de rotación  $\phi$ , manteniendo un valor de cero grados para  $\delta$ . Si se comparan los resultados CISD con los MP2 se observa una ligera disminución de los valores energéticos en el estado singlete y también una disminución ligera en el estado triplete. En la Tabla

VII.3 se pueden comparar los valores obtenidos para diferentes valores del ángulo de rotación mediante el conjunto de funciones de base 6-31G\* y la metodología HF; incluyendo la energía de correlación mediante la teoría perturbacional de segundo orden (MP2) y con el uso de la interacción de configuraciones (CISD) sobre geometrías optimizadas con el método MP2/6-31G\*.

**Tabla VII.3** Energías relativas (en kcal/mol) del sistema 1,2-dihidroxi-etileno en estado singlete y triplete (triplete entre paréntesis) en función del ángulo de rotación  $\phi$ . En todos los casos el valor del ángulo  $\delta$  es  $0^\circ$ . Los valores de la energía total para el punto  $\phi=180^\circ$ ,  $\delta=0^\circ$  son: HF/6-31G\*=-227.729647; MP2/6-31G\*=-228.352372; CISD//MP2/6-31G\*=-228.365726 y CASSCF(2,2) = -227.755359 unidades atómicas.

$\phi$ (grados)	HF/6-31G*	MP2/6-31G*	CISD	CASSCF(2,2)
0	0.3 (59.42)	0 (82.24)	1.74 (79.10)	2.27 (82.97)
30	12.37 (53.78)	10.99 (75.63)	11.10 (72.68)	12.24 (76.97)
60	49.05 (43.87)	41.76 (64.71)	41.38 (62.00)	42.49 (66.51)
70	65.39 (41.52)	55.44 (63.76)	54.81 (59.58)	53.92 (64.02)
80	83.45 (40.02)	70.29 (60.74)	69.33 (58.07)	62.71 (62.45)
90	102.88 (39.47)	85.89 (60.23)	84.50 (57.54)	65.37 (61.85)
180	0 (55.56)	0.01 (78.99)	0 (75.77)	0 (78.98)

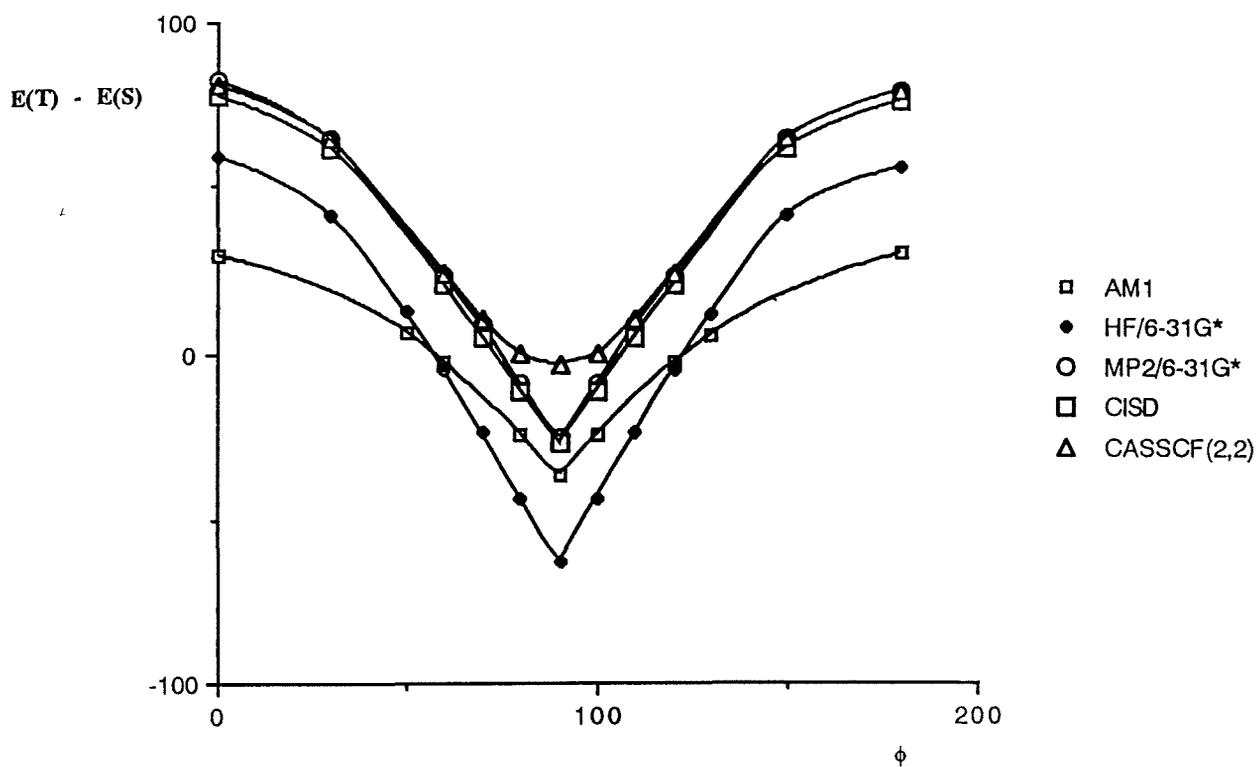
Se ha realizado una mejor aproximación a los valores exactos de la energía de la molécula mediante el uso de una función de onda de referencia multiconfiguracional (método CASSCF(2,2)). Los resultados obtenidos también se detallan en la Tabla VII.3. Puede apreciarse que también en este caso se predice

un cruzamiento de estados para un valor de  $\phi$  entre 70 y 80°. Sin embargo, los valores de las energías relativas de los estados singlete y triplete difieren bastante de los obtenidos con los métodos previos: el singlete tiene menor energía y, por su parte, el triplete mayor que la obtenida con el empleo del método CISD y comparable a la obtenida con el método MP2.

En la Figura VII.9 se representa la diferencia energética S-T en función del ángulo  $\phi$  según los resultados obtenidos en los diferentes niveles de cálculo, tomando en todos los puntos  $\delta=0^\circ$ . Como puede verse, las curvas que representan el salto energético entre los estados singlete y triplete calculadas mediante los métodos MP2, CISD y CASSCF(2,2) están superpuestas en el intervalo de valores de  $\phi$  que nos interesa (entre cero y 70 grados). Así, para una rotación de 60° la diferencia energética entre ambos estados vale 23 kcal/mol (MP2), 20.6 kcal/mol (CISD) y 24.02 kcal/mol (CASSCF), lo que representa aproximadamente un 28% del valor que dicha diferencia posee en la geometría plana *cis*: 82.24; 77.36 y 80.7 kcal/mol, respectivamente. Para una rotación de 70° la reducción de la diferencia energética S-T es aún mayor.

Por supuesto, la zona alrededor de 90° de rotación está mejor descrita con el método CASSCF y puede apreciarse en la Figura VII.9 que es en esa zona donde el empleo de funciones de onda monodeterminantes es inadecuado. Sin embargo, dado que nuestro objetivo no es el cálculo de la barrera rotacional, una aproximación MP2 o CISD es suficiente.

También en la Figura VII.9 se observa que el cálculo HF sobrevalora la reducción en la diferencia energética entre estados, aunque la descripción que ofrece del fenómeno es cualitativamente correcta: la curva es paralela a las curvas correspondientes a cálculos con correlación o multideterminantes. Por último, la descripción ofrecida por el método AM1 es similar en la zona de  $\phi=60^\circ$  a la ofrecida por el método HF y describe mejor la barrera rotacional que éste. Sin embargo, el comportamiento del salto energético en función de  $\phi$  está peor descrito. Como en el caso HF, los resultados AM1 deben entenderse más bien como cualitativos.



**Figura VII.9** Representación de la diferencia de energías entre los estados singlete y triplete ( $E(T)-E(S)$ , en kcal/mol) del 1,2-dihidroxi-etileno en función del ángulo  $\phi$  (en grados). Se incluyen los resultados obtenidos con la metodología AM1, HF/6-31G\*, MP2/6-31G\*, CISD//MP2/6-31G\* y CASSCF(2,2)//MP2/6-31G\*

### VII.1.2.2 Comparación con el etileno

Hemos examinado un sistema bien conocido y similar al modelo estudiado, el etileno, con el objetivo de comprobar el grado de aproximación de los cálculos realizados, comparando los resultados obtenidos con los datos experimentales. Para ello se han calculado las energías de los estados singlete y triplete del etileno en función del ángulo de rotación,  $\phi$ , utilizando el método HF/6-31G\*, incluyendo la correlación electrónica mediante los métodos MP2/6-31G\* y CISD//MP2/6-31G\* y empleando una función de onda del tipo MCSCF con el método CASSCF(2,2)//MP2/6-31G\*. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla VII.4.

**Tabla VII.4** Energías relativas (en kcal/mol) del etileno en estado singlete y triplete (triplete entre paréntesis) en función del ángulo de rotación  $\phi$ . En todos los casos el valor del ángulo  $\delta$  es  $0^\circ$ . Los valores de la energía total para el punto  $\phi=180^\circ$ ,  $\delta=0^\circ$  son: HF/6-31G\*=-78.031718; MP2/6-31G\*=-78.294286; CISD//MP2/6-31G\*=-78.314139 y CASSCF(2,2) = -78.060006 unidades atómicas.

$\phi$ (grados)	HF/6-31G*	MP2/6-31G*	CISD	CASSCF(2,2)
0	0	0	0	0
	(56.96)	(85.89)	(82.10)	(80.03)
30	12.98	11.69	10.96	11.55
	(53.41)	(81.59)	(77.96)	(76.11)
60	50.79	45.65	41.83	42.65
	(46.07)	(72.68)	(69.39)	(68.17)
70	68.33	61.28	55.08	54.51
	(44.07)	(70.28)	(67.08)	(66.04)
80	87.99	78.57	68.18	63.66
	(42.76)	(68.70)	(65.56)	(64.65)
90	109.44	97.06	78.32	66.45
	(42.30)	(68.15)	(65.04)	(64.18)

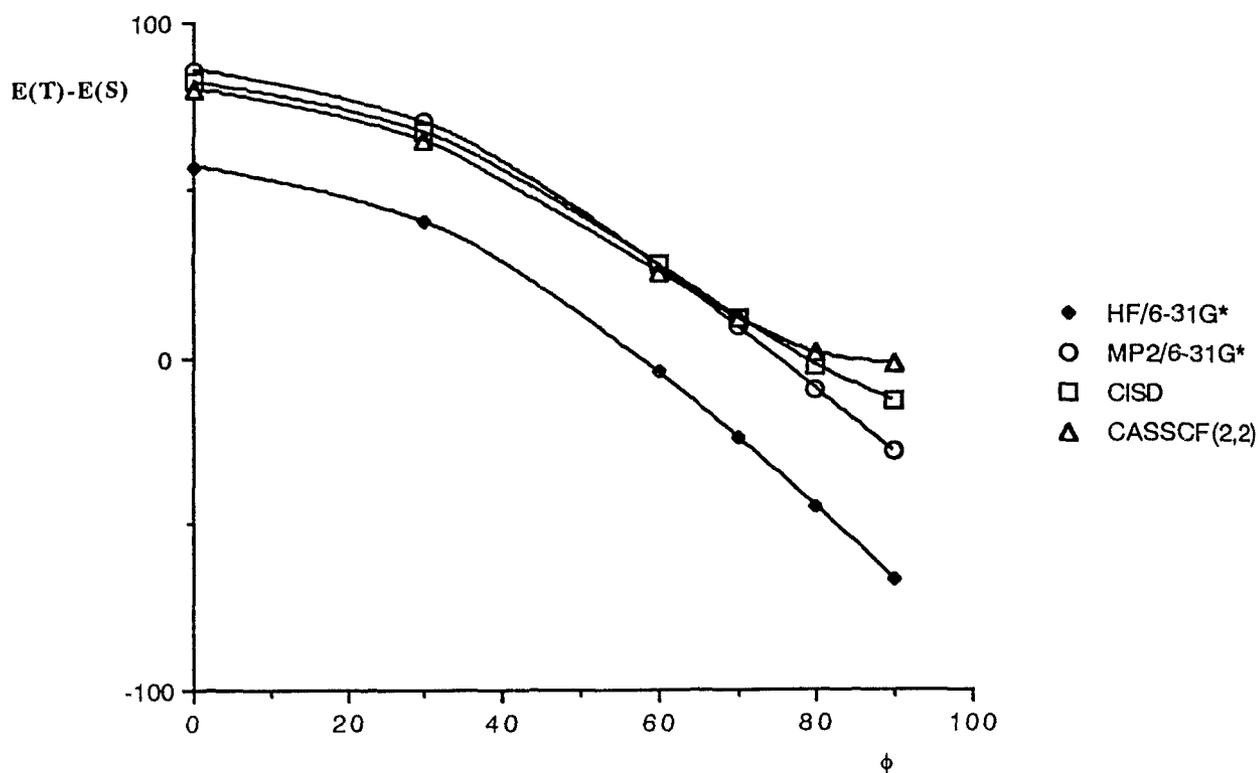
Puede observarse que en el caso del etileno los resultados obtenidos con el empleo del método MP2 no son tan similares a los obtenidos con el método CISD como lo eran en el caso del 1,2-dihidroxi-etileno. Las energías obtenidas incluyendo interacción de configuraciones en el estado singlete son mucho menores, sobre todo en el caso del etileno con el doble enlace rotado  $90^\circ$ , con lo que puede concluirse que el etileno es más dependiente respecto de la interacción de configuraciones que el 1,2-dihidroxi-etileno.

Los valores obtenidos con la metodología CASSCF son aún menores, obteniéndose para la barrera rotacional singlete un valor de 66.45 kcal/mol, muy parecido al valor experimental para esta barrera rotacional de 65 kcal/mol<sup>13,38</sup>. Con ello, la conclusión que se obtiene es que el método CASSCF describe correctamente el comportamiento energético del etileno (y, por extensión, del 1,2-dihidroxi-etileno) en función de la rotación del doble enlace.

En la Figura VII.10 se representa la diferencia energética entre los estados triplete y singlete del etileno en función del ángulo de rotación, calculada según los cuatro procedimientos. Como puede apreciarse, tanto el método CASSCF como los métodos que incluyen correlación describen correctamente la diferencia energética entre  $\phi=0^\circ$  y  $\phi=70^\circ$ , que es la zona de interés. Por su parte, el método HF/6-31G\*, da una descripción cualitativamente correcta de la variación de la diferencia energética entre estados con el ángulo de rotación, sobre todo en el intervalo anteriormente indicado.

Así pues, resulta claro que cuando el sistema se encuentra torsionado se produce una disminución en la energía del estado triplete que le acerca al singlete, dado el aumento energético que éste experimenta. De ese modo el estado triplete está energéticamente accesible. Extrapolando el resultado obtenido con el modelo al sustrato real de la Rubisco, puede proponerse que el estado triplete del mismo, dada la deformación a la cual se encuentra sometido en el interior del centro activo de la Rubisco<sup>9</sup>, puede reaccionar con el oxígeno triplete formándose una supermolécula triplete (como comprobaremos en el apartado VII.4) que posteriormente experimentaría una inversión de spin hacia los productos en estado singlete. Por su parte, la reacción entre el sustrato y el  $\text{CO}_2$  se produciría entre los estados singlete de ambos. El que el sustrato se comporte como un triplete o como

un singlete dependería, por tanto, de la molécula de gas que alcanza el centro activo y la bifuncionalidad quedaría explicada de esta manera.



**Figura VII.10** Representación de la diferencia de energías entre los estados singlete y triplete ( $E(T)-E(S)$ , en kcal/mol) del etileno en función del ángulo  $\phi$  (en grados). Se incluyen los resultados obtenidos con la metodología HF/6-31G\*, MP2/6-31G\*, CISD//MP2/6-31G\* y CASSCF(2,2)//MP2/6-31G\*

### VII.1.2.3 Estructuras y cargas

Algunas distancias y ángulos de enlace del modelo 1,2-dihidroxietileno en estado singlete y triplete se detallan en la Tabla VII.5 para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ .

La rotación alarga el doble enlace en el estado singlete, independientemente del método de cálculo o el conjunto de funciones de base utilizado. En el estado triplete el efecto de la rotación es inverso, acortándose este doble enlace. La piramidalización abre considerablemente el ángulo C2C3O3 cuando el estado singlete de la molécula está rotado  $90^\circ$ , lo cierra en las estructuras planas y tiene relativamente poco efecto sobre los otros parámetros geométricos.

Si se comparan los valores geométricos obtenidos con los diferentes métodos de cálculo se observa una dispersión pequeña de los resultados. Tomando como mejores los valores obtenidos con el método MP2/6-31G\*, se aprecia que utilizando los demás métodos se obtienen resultados razonablemente similares. Especialmente interesante es el hecho de que el método AM1 da buenos valores para las geometrías, incluso mejores que los obtenidos con métodos *ab initio* en bastantes casos.

Este hecho resulta de especial importancia porque el método AM1 es mucho menos costoso que los métodos *ab initio* y se demuestra efectivo a la hora de calcular parámetros geométricos. Con este fin, su aplicación a sistemas mayores será por tanto aconsejable.

En las Tablas VII.6 se presentan los valores obtenidos de las cargas atómicas efectivas de Mulliken para las geometrías que corresponden a máximos y mínimos de las SEP, es decir, las geometrías planas *cis* y *trans* y las rotadas  $90^\circ$ .

En el estado singlete (Tabla VII.6 a), se observa que la piramidalización incrementa el valor de la carga sobre C2 en todos los casos, disminuyendo el valor de la carga sobre C3. En el estado triplete (Tabla VII.6 b) se observa una redistribución contraria de los valores de las cargas con la piramidalización.

**Tabla VII.5 a** Algunos parámetros geométricos para el estado singlete del 1,2-dihidroxi-etileno para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I), HF/3-21G\* (II), HF/4-31G (III), HF/6-31G\*(IV) y MP2/6-31G\* (V).

$\phi/\delta$		Distancias de enlace (Å)			ángulos de enlace (grados)		
		C2C3	C2O2	C3O3	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2
0/0	I	1.348	1.378	1.378	120.20	120.20	106.61
	II	1.309	1.387	1.387	122.29	122.29	111.84
	III	1.310	1.375	1.375	122.64	122.66	114.14
	IV	1.314	1.358	1.358	123.04	123.06	110.13
	V	1.336	1.378	1.378	121.49	121.50	108.08
0/±30	I	1.359	1.374	1.383	120.04	116.36	106.88
	II	1.318	1.379	1.404	122.39	117.48	112.27
	III	1.311	1.368	1.390	122.86	118.11	114.50
	IV	1.323	1.350	1.372	123.08	118.17	110.41
	V	1.345	1.371	1.390	121.43	116.92	108.29
90/0	I	1.401	1.364	1.364	116.21	116.30	107.73
	II	1.379	1.401	1.401	121.55	121.56	111.30
	III	1.378	1.391	1.391	121.21	121.22	113.67
	IV	1.386	1.367	1.366	121.97	122.00	109.62
	V	1.426	1.384	1.384	119.57	119.55	107.53
90/30	I	1.400	1.362	1.357	116.53	121.24	107.57
	II	1.385	1.374	1.395	118.51	128.38	112.27
	III	1.383	1.364	1.381	118.51	127.39	114.46
	IV	1.387	1.336	1.365	118.64	128.80	110.44
	V	1.420	1.378	1.366	116.23	125.38	107.45
90/-30	I	1.398	1.360	1.359	119.99	123.97	109.11
	II	1.384	1.379	1.401	126.12	130.52	113.14
	III	1.380	1.372	1.387	125.26	129.75	115.32
	IV	1.385	1.344	1.370	127.30	131.98	111.15
	V	1.420	1.388	1.371	121.99	127.65	107.76
180/0	I	1.348	1.382	1.382	117.36	117.42	106.48
	II	1.307	1.393	1.393	120.19	120.19	111.77
	III	1.308	1.384	1.384	119.87	119.87	114.12
	IV	1.313	1.365	1.365	120.94	129.94	109.96
	V	1.334	1.384	1.383	119.96	120.09	107.99
180/±30	I	1.359	1.378	1.387	117.57	113.97	106.84
	II	1.316	1.387	1.411	120.53	115.46	112.22
	III	1.316	1.378	1.400	120.29	115.36	114.53
	IV	1.321	1.358	1.379	121.47	116.21	110.28
	V	1.343	1.378	1.398	120.55	115.41	108.19

**Tabla VII.5 b** Algunos parámetros geométricos para el estado triplete del 1,2-dihidroxi-etileno para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I), HF/3-21G\* (II), HF/4-31G (III), HF/6-31G\*(IV) y MP2/6-31G\* (V).

$\phi/\delta$		Distancias de enlace (Å)			ángulos de enlace (grados)		
		C2C3	C2O2	C3O3	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2
0/0	I	1.463	1.350	1.350	116.42	116.42	107.35
	II	1.530	1.382	1.382	115.22	115.22	112.06
	III	1.517	1.372	1.372	116.46	116.46	114.29
	IV	1.525	1.355	1.355	115.91	115.91	109.86
	V	1.520	1.369	1.369	114.60	114.60	107.90
0/ $\pm$ 30	I	1.470	1.349	1.352	116.47	115.07	107.48
	II	1.531	1.382	1.385	117.93	115.15	112.17
	III	1.517	1.372	1.375	117.45	116.28	114.46
	IV	1.524	1.355	1.356	118.08	115.92	110.00
	V	1.519	1.369	1.371	114.95	114.85	108.05
90/0	I	1.439	1.356	1.356	116.41	116.44	107.54
	II	1.448	1.392	1.392	117.93	117.93	112.03
	III	1.440	1.383	1.383	117.45	117.46	114.47
	IV	1.448	1.362	1.362	118.08	118.08	110.12
	V	1.434	1.379	1.379	117.81	117.79	108.10
90/30	I	1.449	1.354	1.359	116.46	114.32	107.39
	II	1.460	1.389	1.398	117.69	115.51	112.06
	III	1.452	1.380	1.390	117.33	115.15	114.46
	IV	1.461	1.360	1.366	117.80	115.71	110.11
	V	1.447	1.375	1.384	117.66	117.66	108.09
90/ $\pm$ 30	I	1.451	1.357	1.358	115.67	114.52	107.76
	II	1.460	1.392	1.396	116.86	115.26	112.27
	III	1.451	1.383	1.387	116.39	114.92	114.78
	IV	1.460	1.362	1.365	117.28	115.68	110.35
	V	1.446	1.378	1.382	116.77	115.09	108.34
180/0	I	1.465	1.353	1.353	113.91	113.92	107.25
	II	1.523	1.386	1.386	113.12	113.12	112.66
	III	1.508	1.377	1.377	113.05	113.05	115.08
	IV	1.516	1.358	1.358	113.70	113.70	110.44
	V	1.510	1.371	1.371	112.65	112.79	108.61
180/ $\pm$ 30	I	1.472	1.352	1.354	114.14	112.87	107.49
	II	1.523	1.386	1.389	113.10	113.15	112.73
	III	1.508	1.377	1.381	113.23	112.82	115.14
	IV	1.516	1.358	1.360	114.08	113.40	110.47
	V	1.510	1.371	1.374	113.08	112.45	108.63

**Tabla VII.6 a** Cargas atómicas netas en el estado singlete del 1,2-dihidroxietileno para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I), HF/3-21G\* (II), HF/4-31G (III), HF/6-31G\*(IV) y MP2/6-31G\* (V).

		$\phi$ (grados)/ $\delta$ (grados)						
		0/0	0/ $\pm$ 30	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/ $\pm$ 30
C2	I	-0.14	-0.14	-0.17	-0.17	-0.13	-0.14	-0.14
	II	0.08	0.11	0.03	0.09	0.10	0.07	0.11
	III	0.14	0.17	0.10	0.13	0.13	0.14	0.18
	IV	0.08	0.11	0.03	0.10	0.08	0.08	0.13
	V	0.07	0.11	0.03	0.06	0.06	0.08	0.12
C3	I	-0.14	-0.14	-0.17	-0.17	-0.18	-0.14	-0.14
	II	0.08	0.04	0.03	0.02	-0.01	0.07	0.02
	III	0.14	0.12	0.10	0.11	0.08	0.14	0.11
	IV	0.08	0.04	0.03	-0.01	-0.01	0.08	0.04
	V	0.07	0.04	0.03	0.02	0.01	0.08	0.04
O2	I	-0.29	-0.29	-0.27	-0.26	-0.30	-0.32	-0.32
	II	-0.68	-0.68	-0.64	-0.63	-0.65	-0.71	-0.70
	III	-0.74	-0.74	-0.69	-0.67	-0.69	-0.76	-0.76
	IV	-0.70	-0.71	-0.65	-0.62	-0.63	-0.72	-0.71
	V	-0.71	-0.69	-0.65	-0.64	-0.65	-0.72	-0.72
O3	I	-0.29	-0.30	-0.27	-0.29	-0.29	-0.32	-0.32
	II	-0.68	-0.68	-0.64	-0.66	-0.66	-0.71	-0.70
	III	-0.74	-0.74	-0.69	-0.71	-0.72	-0.76	-0.76
	IV	-0.70	-0.71	-0.65	-0.68	-0.68	-0.72	-0.73
	V	-0.71	-0.71	-0.65	-0.67	-0.67	-0.72	-0.73
H(O2)	I	0.24	0.24	0.24	0.25	0.25	0.25	0.26
	II	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40	0.40	0.40
	III	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42
	IV	0.45	0.45	0.44	0.45	0.45	0.46	0.46
	V	0.45	0.45	0.44	0.44	0.45	0.45	0.46
H(O3)	I	0.24	0.24	0.25	0.24	0.24	0.25	0.25
	II	0.39	0.39	0.39	0.38	0.40	0.40	0.39
	III	0.41	0.41	0.41	0.40	0.40	0.42	0.42
	IV	0.45	0.45	0.44	0.44	0.44	0.46	0.45
	V	0.45	0.45	0.44	0.43	0.44	0.45	0.45
H2	I	0.19	0.19	0.20	0.18	0.21	0.21	0.21
	II	0.22	0.22	0.22	0.21	0.24	0.24	0.24
	III	0.18	0.18	0.19	0.17	0.20	0.20	0.20
	IV	0.18	0.17	0.18	0.17	0.20	0.19	0.19
	V	0.18	0.18	0.19	0.18	0.20	0.19	0.19
H3	I	0.19	0.19	0.20	0.20	0.21	0.21	0.21
	II	0.22	0.21	0.22	0.20	0.22	0.24	0.23
	III	0.18	0.16	0.19	0.16	0.17	0.20	0.19
	IV	0.18	0.16	0.18	0.15	0.16	0.19	0.18
	V	0.18	0.17	0.19	0.16	0.17	0.19	0.18

**Tabla VII.6 b** Cargas atómicas netas en el estado triplete del 1,2-dihidroxietileno para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I), HF/3-21G\* (II), HF/4-31G (III), HF/6-31G\*(IV) y MP2/6-31G\* (V).

		$\phi$ (grados)/ $\delta$ (grados)						
		0/0	0/ $\pm$ 30	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/ $\pm$ 30
C2	I	-0.21	-0.24	-0.19	-0.22	-0.22	-0.21	-0.24
	II	0.06	0.04	0.06	0.06	0.06	0.06	0.04
	III	0.13	0.11	0.14	0.14	0.14	0.14	0.12
	IV	0.04	0.03	0.06	0.06	0.06	0.05	0.04
	V	0.05	0.03	0.07	0.07	0.06	0.05	0.04
C3	I	-0.21	-0.11	-0.19	-0.11	-0.10	-0.21	-0.11
	II	0.06	0.11	0.06	0.09	0.08	0.06	0.10
	III	0.13	0.19	0.14	0.17	0.16	0.14	0.18
	IV	0.04	0.10	0.06	0.09	0.08	0.05	0.09
	V	0.05	0.10	0.07	0.09	0.09	0.05	0.10
O2	I	-0.25	-0.24	-0.27	-0.26	-0.29	-0.27	-0.27
	II	-0.66	-0.66	-0.66	-0.66	-0.67	-0.69	-0.69
	III	-0.72	-0.71	-0.72	-0.72	-0.73	-0.75	-0.75
	IV	-0.68	-0.67	-0.68	-0.68	-0.69	-0.70	-0.70
	V	-0.68	-0.68	-0.69	-0.69	-0.69	-0.70	-0.70
O3	I	-0.25	-0.26	-0.27	-0.29	-0.29	-0.27	-0.29
	II	-0.66	-0.67	-0.66	-0.67	-0.67	-0.69	-0.69
	III	-0.72	-0.73	-0.72	-0.73	-0.73	-0.75	-0.76
	IV	-0.68	-0.68	-0.68	-0.69	-0.69	-0.70	-0.70
	V	-0.68	-0.68	-0.69	-0.70	-0.69	-0.70	-0.71
H(O2)	I	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.26	0.26
	II	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40
	III	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42
	IV	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.46	0.46
	V	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
H(O3)	I	0.25	0.24	0.25	0.25	0.25	0.26	0.25
	II	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.40	0.40
	III	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	0.42
	IV	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.46	0.45
	V	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
H2	I	0.21	0.20	0.21	0.20	0.22	0.22	0.22
	II	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.23	0.23
	III	0.17	0.17	0.17	0.17	0.18	0.20	0.19
	IV	0.18	0.18	0.17	0.17	0.18	0.20	0.19
	V	0.18	0.18	0.17	0.17	0.18	0.20	0.20
H3	I	0.21	0.17	0.21	0.18	0.18	0.22	0.18
	II	0.21	0.18	0.21	0.19	0.20	0.23	0.21
	III	0.17	0.14	0.17	0.15	0.16	0.20	0.17
	IV	0.18	0.14	0.17	0.15	0.15	0.20	0.16
	V	0.18	0.14	0.17	0.15	0.16	0.20	0.17

De este modo, el doble enlace se polariza cuando se piramidaliza uno de los grupos carbono. Este comportamiento, obtenido en todos nuestros resultados *ab initio*, está relacionado con el efecto de la polarización repentina, que ha despertado considerable interés desde un punto de vista teórico<sup>30,39-43</sup>.

Por otro lado, el efecto de la rotación desde la forma plana *cis* es el de disminuir los valores absolutos de las cargas sobre todos los átomos, excepto las que soportan los átomos H2 y H3. En el estado triplete el efecto de la rotación desde la geometría plana *cis* no es tan evidente como en el caso del estado singlete y, si acaso, es el contrario.

Los resultados AM1 no concuerdan con los *ab initio*: en el estado singlete se predice que la carga sobre C2 no se verá afectada por la piramidalización o, en el caso de la molécula rotada 90°, disminuída. También se predice que la carga sobre C3 no se verá afectada o se verá incrementada en el caso de la molécula rotada 90°. Incluso en ambos estados electrónicos se prevé que la carga de ambos carbonos será negativa para todos los valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Este resultado se aparta de los obtenidos con los métodos *ab initio* y, aunque las variaciones en los valores de las cargas con la variación geométrica puedan predecirse de forma ligeramente similar, resulta evidente que el método AM1 no ofrece buenas predicciones de los valores de las cargas.

#### VII.1.2.4 HOMOs y LUMOs

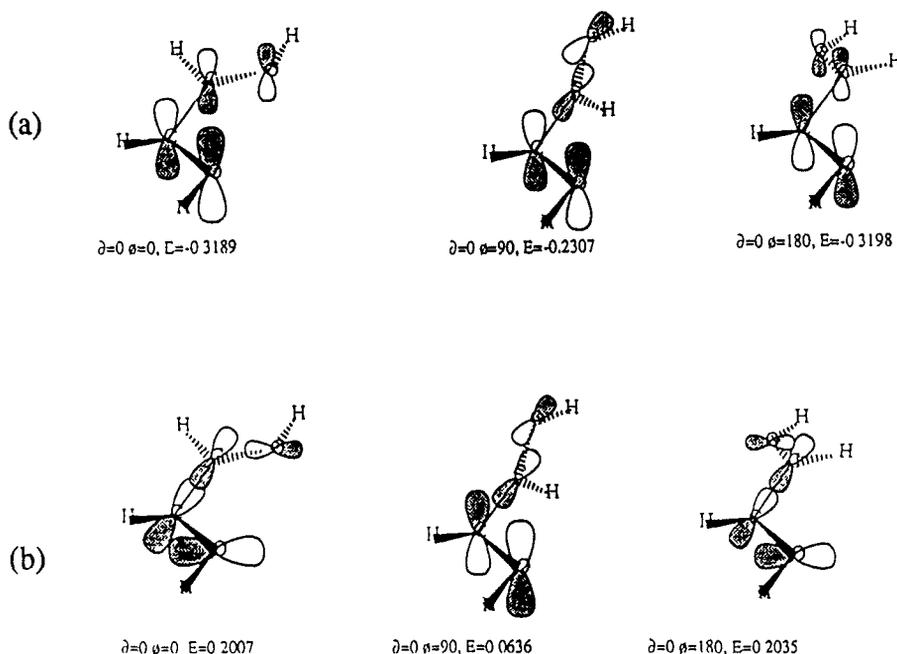
Con el objeto de obtener una descripción más detallada de la reorganización electrónica que tiene lugar en función de la rotación, en la Figura VII.11 se presenta un diagrama de los orbitales moleculares más altos ocupados (HOMOs) y los orbitales moleculares más bajos ocupados (LUMOs). Para ello hemos seleccionado los resultados HF/4-31G. Con el resto de funciones de base se obtienen datos muy similares.

En la Figura VII.11 a se muestra el HOMO en el estado singlete para los puntos de rotación cero (estructura plana *cis*), 90 y 180 grados. En el caso de las estructuras planas este orbital corresponde al enlace  $\pi$  asociado al doble enlace C2C3 y a pares de electrones solitarios de los átomos de oxígeno en antifase.

En el punto de  $90^\circ$  de rotación, el HOMO está asociado con la interacción  $\pi$  no enlazante C2C3 y las interacciones  $\pi^*$  C2O2 y C3O3. Este hecho, juntamente con el incremento en la energía de este orbital para la geometría rotada  $90^\circ$ , explica la barrera rotacional como una rotura del doble enlace, en un comportamiento típico de enlaces etilénicos.

En el caso de los LUMOs, mostrados en la Figura VII.11 b para el estado singlete, puede observarse que en el punto de  $\phi=90^\circ$  la energía del orbital es mucho menor que en las estructuras planas. De este modo, en el punto de rotación de  $90^\circ$ , la diferencia energética HOMO-LUMO es más pequeña, lo cual es también un comportamiento típico de los fragmentos etilénicos y explica la posibilidad de promocionar un electrón y obtener la molécula en estado triplete.

En cuanto a la influencia de la piramidalización en los orbitales, es importante cuando el sistema está rotado fuera del plano ya que entonces el solapamiento entre los orbitales p se incrementa.



**Figura VII.11** HOMOs (a) y LUMOS (b) correspondientes a las geometrías planas *cis* y *trans* y a la geometría rotada  $90^\circ$  del 1,2-dihidroxi-etileno en estado singlete. Las energías, obtenidas con el método HF/4-31G, se dan en unidades atómicas.

### VII.1.3 MODELO 2,3,4-TRIHIDROXI-2-PENTÉN-1,5-DIOLATO

Con objeto de ampliar el modelo molecular sencillo estudiado en el apartado anterior, hemos analizado la variación de la diferencia energética entre los estados singlete y triplete en función del cambio en variables geométricas de la molécula 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato (Figura VII.12). Esta molécula coincide con el sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato excepto por la no inclusión de los grupos fosfato, que han sido sustituidos por átomos de oxígeno sin protonar.

El salto energético S-T se estudia como función de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$  que describen, respectivamente, la rotación alrededor del doble enlace C2-C3 y la posterior piramidalización de uno de los carbonos de la molécula modelo. Su definición es análoga a la descrita en la Figura VII.2.

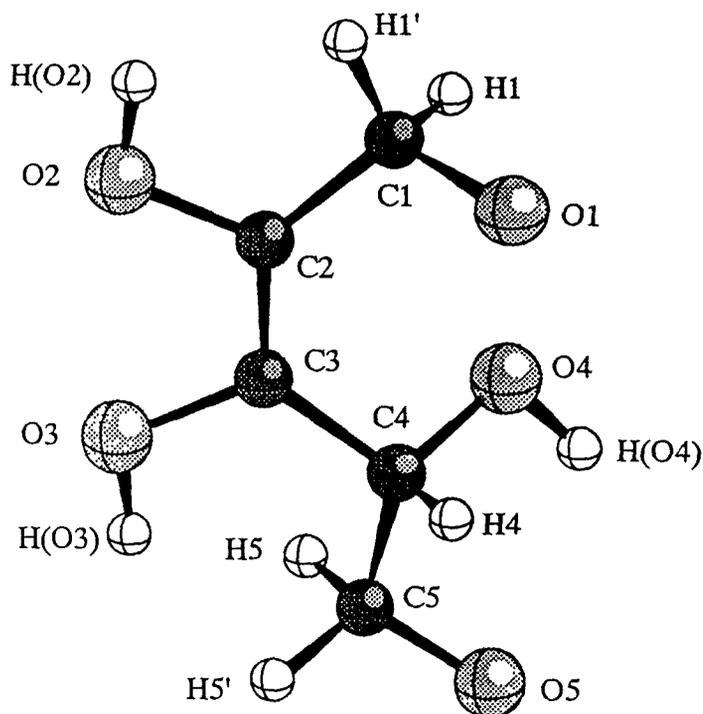


Figura VII.12 Numeración de átomos del 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato.

Hemos obtenido las SEP como función de estas dos variables, permitiendo una completa optimización del resto de variables geométricas en cada punto. Las SEP que presentamos se han calculado para valores de  $\phi$  entre 0 y 180° con intervalos de 10° y para valores de  $\delta$  entre -60 y +60°, también con intervalos de 10°. De este modo se han calculado unos 250 puntos de cada SEP.

Los niveles de cálculo han sido dos: hemos empleado el método semiempírico AM1 y el método HF (RHF para el estado singlete y UHF para el triplete) con el conjunto de funciones de base 3-21G. El tamaño del modelo ha desaconsejado extender los cálculos incluyendo polarización, correlación o funciones multideterminantales. A efectos de comprobar la validez de los resultados obtenidos con el modelo anterior, es suficiente el nivel de aproximación obtenido con estos dos métodos.

### VII.1.3.1 Energías

Las SEP calculadas se presentan, en el Apéndice, en las Figuras VII.13 y VII.14. Como puede apreciarse en ellas, la topología es similar a la encontrada en el estudio del modelo más sencillo, tanto en el caso del cálculo AM1 como con el método *ab initio*.

Como ocurría con el modelo anterior, la rotación alrededor del doble enlace desestabiliza el estado singlete y estabiliza el estado triplete. La posterior piramidalización también tiene un efecto menos pronunciado sobre las SEP correspondientes a estados singlete: en las conformaciones *cis* o *trans* requiere varias kcal/mol pero a medida que el sistema está más torsionado es más fácil la posterior piramidalización y resulta en un efecto estabilizador para la molécula rotada 90°. Este resultado coincide con la conclusión anterior: la flexibilidad de los centros carbono se incrementa a medida que el sistema se torsiona. Sobre las SEP en estados triplete la piramidalización ejerce un efecto más variado, que en general puede describirse como opuesto.

En ambos niveles de cálculo se predice un cruzamiento entre las SEP de los estados singlete y triplete. Tanto en el caso del método AM1 como en el del método HF, para un valor de  $\delta=0^\circ$ , se predice un cruce de estados para un valor

de  $\phi$  entre 50 y 60 grados. Los valores de las energías, sin embargo, son diferentes en cada caso. Este resultado coincide con el obtenido en el estudio del modelo sencillo.

En la Tabla VII.7 presentamos una selección de los valores de las energías calculados en función de  $\phi$  y  $\delta$  para este modelo en los estados singlete y triplete mediante los métodos AM1 y HF.

**Tabla VII.7** Energías relativas (en kcal/mol) de puntos escogidos de las SEP de los estados singlete y triplete para diversos valores de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , ambos en grados. Se presentan los resultados de los métodos HF/3-21G y AM1. Los valores de las energías totales para la estructura de referencia ( $\phi=180^\circ$ ,  $\delta=0^\circ$ , estado singlete) son: HF/3-21G, -564.832521; AM1, -0.211612 unidades atómicas.

$\phi/\delta$	S		T	
	HF/3-21G	AM1	HF/3-21G	AM1
0/0	2.67	1.84	58.29	29.94
0/30	8.53	8.49	53.01	29.39
0/-30	14.76	13.03	58.82	33.70
50/0	29.40	14.06	42.23	19.25
60/0	42.93	21.48	39.03	17.60
90/0	94.33	51.10	35.15	15.96
90/30	86.32	47.39	36.09	18.67
90/-30	86.00	49.92	36.00	19.33
90/10	92.46	47.83	35.10	16.19
90/-10	92.40	51.91	35.18	16.15
180/0	0.0	0.0	54.96	26.83
180/30	5.52	4.83	49.62	27.13
180/-30	14.48	12.85	56.72	30.05

Por último, en la Figura VII.15 se representa la diferencia energética S-T en función del ángulo  $\phi$  según los resultados obtenidos con los dos niveles de cálculo, tomando en todos los puntos  $\delta=0^\circ$ . Si se compara esta figura con la

Figura VII.9, en la que se obtenía la misma representación para el 1,2-dihidroxietileno, puede apreciarse que la descripción es análoga, con lo cual cabe concluir que el modelo pequeño es representativo y permite la utilización de métodos de cálculo más sofisticados.

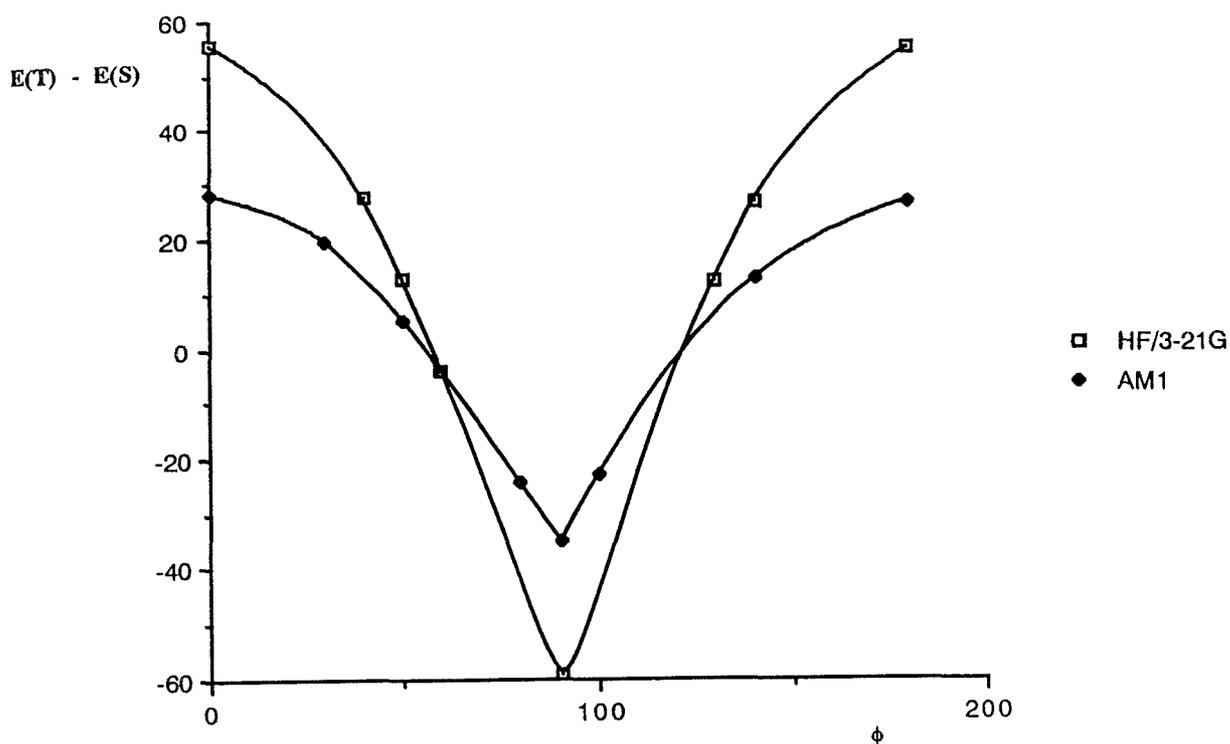


Figura VII.15 Representación de la diferencia de energías entre los estados singlete y triplete ( $E(T)-E(S)$ , en kcal/mol) del 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato en función del ángulo  $\phi$  (en grados). Se incluyen los resultados obtenidos con la metodología AM1 y HF/3-21G.

### VII.1.3.2 Estructuras y cargas

Algunas distancias y ángulos de enlace del modelo 2,3,4-trihidroxí-2-pentén-1,5-diolato en estado singlete y triplete se detallan en la Tabla VII.8 para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ .

La rotación alarga el doble enlace en el estado singlete, mientras que lo acorta en el estado triplete. La piramidalización tiene un efecto menos pronunciado, alargando el doble enlace para cualquier valor de la rotación, tanto en el estado singlete como en el triplete.

**Tabla VII.8 a** Algunos parámetros geométricos para el estado singlete del 2,3,4-trihidroxí-2-pentén-1,5-diolato para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I) y HF/3-21G (II).

$\phi/\delta$	Distancias de enlace (Å)			ángulos de enlace (grados)			
	C2C3	C2O2	C3O3	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2	
0/0	I	1.359	1.408	1.400	113.98	114.22	106.37
	II	1.315	1.421	1.428	117.12	117.15	105.86
0/30	I	1.371	1.404	1.403	114.08	111.78	106.68
	II	1.326	1.416	1.440	117.64	114.17	106.50
0/-30	I	1.374	1.403	1.413	113.18	109.23	106.77
	II	1.329	1.411	1.455	116.59	111.64	106.07
90/0	I	1.412	1.384	1.379	113.53	115.42	108.15
	II	1.386	1.407	1.456	119.69	118.29	108.36
90/30	I	1.416	1.382	1.370	112.86	117.21	107.38
	II	1.389	1.394	1.434	117.72	124.90	107.90
90/-30	I	1.422	1.376	1.381	114.60	117.30	109.40
	II	1.393	1.385	1.456	121.63	125.31	109.32
180/0	I	1.360	1.401	1.390	114.86	116.26	106.15
	II	1.315	1.412	1.418	117.53	117.65	106.62
180/30	I	1.372	1.398	1.394	114.81	113.21	106.46
	II	1.325	1.408	1.433	116.80	114.10	107.15
180/-30	I	1.376	1.393	1.398	115.63	111.55	106.67
	II	1.330	1.401	1.441	118.77	111.54	107.05

**Tabla VII.8 b** Algunos parámetros geométricos para el estado triplete del 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Se presentan los resultados obtenidos con los métodos de cálculo AM1 (I) y HF/3-21G (II).

$\phi/\delta$		Distancias de enlace (Å)			ángulos de enlace (grados)		
		C2C3	C2O2	C3O3	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2
0/0	I	1.478	1.383	1.371	110.74	111.18	106.51
	II	1.548	1.422	1.412	111.63	112.62	105.48
0/30	I	1.486	1.381	1.369	111.43	111.09	106.69
	II	1.546	1.421	1.413	113.26	113.36	105.81
0/-30	I	1.489	1.383	1.379	110.44	107.81	106.56
	II	1.553	1.425	1.422	111.09	110.29	105.27
90/0	I	1.450	1.382	1.368	112.89	114.55	106.59
	II	1.455	1.426	1.417	115.88	117.15	106.40
90/30	I	1.463	1.380	1.366	112.66	112.62	106.50
	II	1.470	1.426	1.418	115.11	113.86	106.29
90/-30	I	1.462	1.380	1.373	112.88	111.99	106.61
	II	1.464	1.421	1.426	115.01	114.32	106.66
180/0	I	1.477	1.375	1.360	111.89	113.36	106.34
	II	1.543	1.413	1.402	111.56	112.78	106.40
180/30	I	1.486	1.376	1.362	111.94	112.02	106.50
	II	1.543	1.416	1.407	111.22	112.27	106.91
180/-30	I	1.487	1.373	1.363	112.84	110.62	106.56
	II	1.550	1.412	1.408	113.05	109.30	106.52

La piramidalización también abre el ángulo C2C3O3 cuando el estado singlete de la molécula está rotado 90°, lo cierra en estructuras planas y tiene relativamente poco efecto en los restantes parámetros geométricos.

Los resultados AM1 son ligeramente distintos de los HF/3-21G. Esto, que ya se había constatado en el estudio del 1,2-dihidroxietileno, no es un inconveniente a la hora de utilizar los resultados de cálculos semiempíricos para analizar las geometrías obtenidas. Como ya vimos en aquel modelo, las geometrías AM1 son similares a las obtenidas cuando el cálculo *ab initio* incluye correlación, con lo cual pueden tomarse como válidas.

En las Tablas VII.9 se presentan los valores obtenidos de las cargas atómicas efectivas de Mulliken para las geometrías que corresponden a máximos y mínimos de la SEP, es decir, las geometrías planas *cis* y *trans* y las rotadas 90°. Sólo se detallan las cargas obtenidas con el cálculo *ab initio*; ya vimos en el

modelo anterior que el método AM1 no ofrece buenos resultados a la hora de calcular cargas atómicas.

**Tabla VII.9 a** Cargas atómicas netas en el estado singlete del 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Los resultados se han obtenido con el método HF/3-21G.

	$\phi$ (grados)/ $\delta$ (grados)								
	0/0	0/30	0/-30	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/30	180/-30
C2	0.22	0.26	0.30	0.31	0.30	0.38	0.23	0.29	0.26
C3	0.19	0.14	0.10	0.10	0.11	0.04	0.18	0.16	0.09
O2	-0.73	-0.73	-0.72	-0.68	-0.68	-0.68	-0.72	-0.72	-0.71
O3	-0.74	-0.73	-0.73	-0.70	-0.71	-0.72	-0.72	-0.71	-0.70
H(O2)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.36	0.35	0.35	0.35	0.35
H(O3)	0.37	0.38	0.37	0.36	0.36	0.35	0.37	0.37	0.37
C1	0.12	0.11	0.10	0.08	0.07	0.07	0.14	0.12	0.14
O1	-0.84	-0.82	-0.84	-0.82	-0.83	-0.82	-0.84	-0.84	-0.83
H(C1)	-0.09	-0.06	-0.09	-0.05	-0.06	-0.05	-0.07	-0.07	-0.07
H'(C1)	0.06	0.05	0.09	0.05	0.07	0.07	0.01	0.03	0.01
C4	0.05	-0.01	0.05	0.02	0.01	0.03	0.06	0.04	0.06
O4	-0.73	-0.74	-0.72	-0.75	-0.77	-0.76	-0.74	-0.75	-0.75
H(O4)	0.37	0.37	0.37	0.36	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
H(C4)	0.19	0.25	0.15	0.15	0.16	0.14	0.15	0.17	0.13
C5	0.02	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	-0.01
O5	-0.85	-0.85	-0.85	-0.86	-0.84	-0.85	-0.85	-0.85	-0.85
H(C5)	-0.01	-0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
H'(C5)	0.05	0.04	0.06	0.05	0.05	0.06	0.07	0.06	0.08

En el estado singlete la rotación hace aumentar la carga sobre C2 y disminuir la que soporta C3, en un fenómeno de polarización repentina ya comentado en el apartado VII.1.2.3. En el estado triplete el efecto es mucho más ligero sobre ambos centros carbono. La piramidalización en el estado singlete también produce un incremento en la carga sobre C2 y una disminución en la

carga sobre C3. En el estado triplete la piramidalización tiene un efecto leve sobre las cargas atómicas. Por otro lado, como puede observarse en las tablas, el resto de los átomos apenas experimenta variaciones en el valor de la carga con los cambios geométricos.

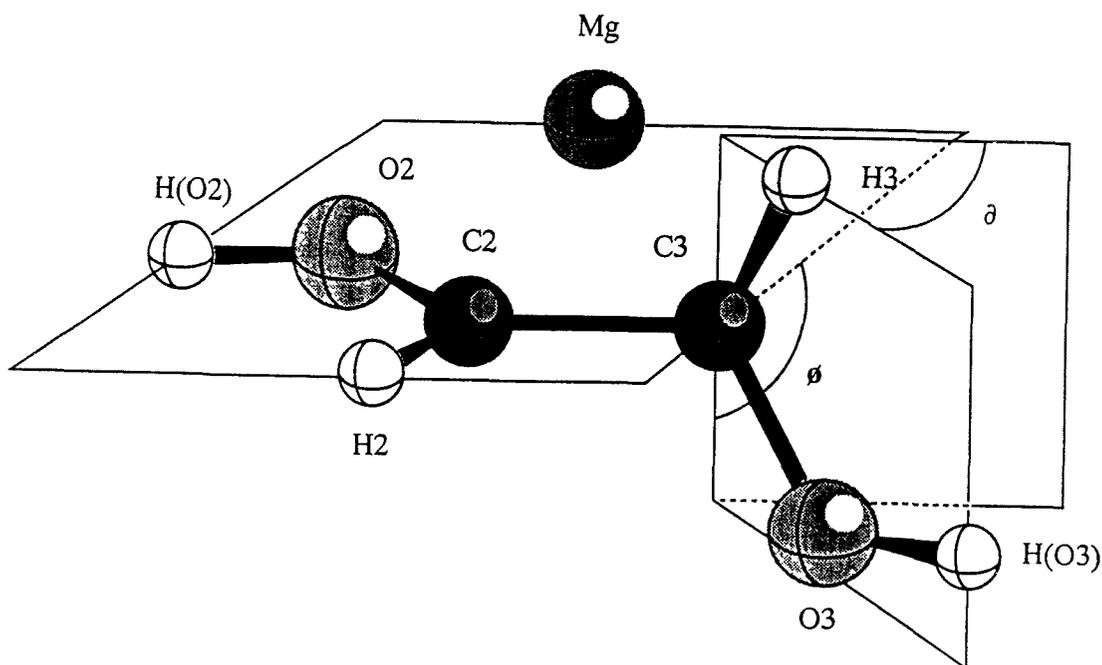
Tabla VII.9 b Cargas atómicas netas en el estado triplete del 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Los resultados se han obtenido con el método HF/3-21G.

	$\phi$ (grados)/ $\delta$ (grados)								
	0/0	0/30	0/-30	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/30	180/-30
C2	0.21	0.20	0.20	0.23	0.21	0.24	0.21	0.19	0.21
C3	0.25	0.27	0.26	0.26	0.26	0.25	0.25	0.28	0.25
O2	-0.72	-0.72	-0.72	-0.71	-0.72	-0.71	-0.71	-0.71	-0.70
O3	-0.72	-0.73	-0.72	-0.71	-0.71	-0.71	-0.71	-0.71	-0.70
H(O2)	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.35	0.35	0.34
H(O3)	0.38	0.38	0.38	0.37	0.38	0.37	0.37	0.38	0.38
C1	0.10	0.09	0.10	0.08	0.08	0.08	0.12	0.11	0.12
O1	-0.84	-0.83	-0.84	-0.85	-0.84	-0.85	-0.84	-0.84	-0.84
H(C1)	-0.09	-0.07	-0.09	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07	-0.07
H'(C1)	0.04	0.04	0.05	0.03	0.03	0.03	0.00	0.01	0.00
C4	0.01	-0.03	0.01	0.00	-0.01	0.02	0.03	0.01	0.02
O4	-0.73	-0.74	-0.72	-0.75	-0.76	-0.75	-0.74	-0.74	-0.74
H(O4)	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.37	0.37	0.38
H(C4)	0.18	0.24	0.16	0.16	0.19	0.15	0.14	0.16	0.14
C5	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
O5	-0.85	-0.85	-0.84	-0.85	-0.84	-0.84	-0.85	-0.85	-0.84
H(C5)	-0.01	-0.02	0.00	0.01	0.03	0.01	0.00	0.00	0.01
H'(C5)	0.05	0.04	0.06	0.05	0.04	0.07	0.07	0.06	0.08

## VII.1.4 MODELO 1,2-DIHIODIETILENO CON INCLUSIÓN DEL CATION MAGNESIO

Puesto que en el centro activo de la enzima hay un catión  $Mg^{2+}$ , en este apartado estudiaremos las variaciones que la presencia de dicho catión metálico pueden provocar sobre los resultados obtenidos sin tenerlo en cuenta.

El modelo se representa en la Figura VII.16, en la que se indica la numeración de los átomos. La posición del  $Mg^{2+}$  viene dada según los datos experimentales<sup>44</sup> a una distancia de 3.34 Å del doble enlace. El salto energético se estudia también en función de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , definidos análogamente a la descripción dada en la Figura VII.2.



**Figura VII.16** Numeración de los átomos del 1,2-dihidroxi-etileno con el magnesio situado según los datos experimentales. En la figura se muestran los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ .

Hemos obtenido las SEP como función de estas dos variables, permitiendo una completa optimización del resto de variables geométricas en cada punto,

excepto las que determinan la posición del  $Mg^{2+}$  respecto al doble enlace. Las SEP que presentamos se han calculado para valores de  $\phi$  entre 0 y  $180^\circ$  con intervalos de  $10^\circ$  y para valores de  $\delta$  entre  $-60$  y  $+60^\circ$ , también con intervalos de  $10^\circ$ . De este modo se han calculado unos 250 puntos de cada SEP.

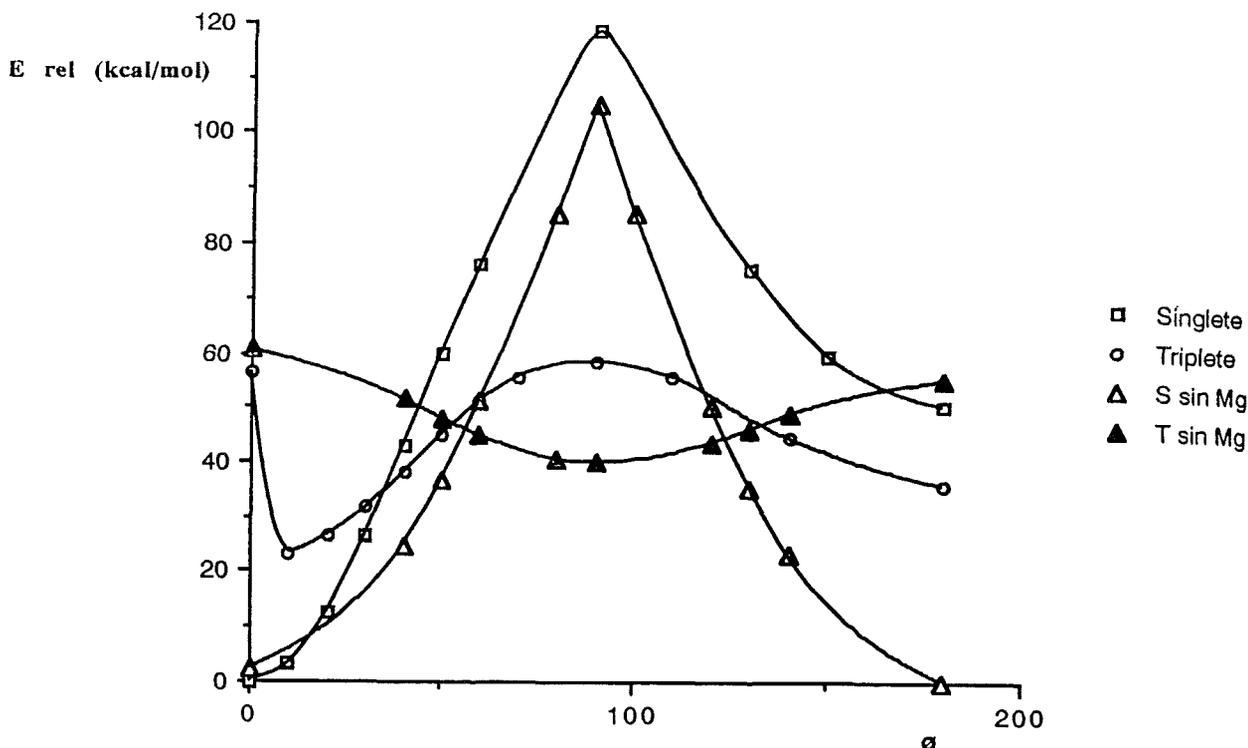
Los niveles de cálculo han sido dos: hemos empleado el método HF (RHF para el estado singlete y UHF para el triplete) con el conjunto de funciones de base 4-31G para la descripción completa de la SEP y la optimización de las geometrías. Sobre algunas de las geometrías optimizadas con el nivel de cálculo descrito se realizó posteriormente un estudio variacional a nivel CISD.

### VII.1.4.1 Energías

Las SEP calculadas se presentan en las Figuras VII.17 (en el Apéndice) para los estados electrónicos singlete y triplete. Como puede apreciarse, la inclusión del catión magnesio modifica sustancialmente la topografía de las SEP que se obtenían sin tener en cuenta su presencia.

El estado singlete está más desestabilizado, excepto en las configuraciones *quasi cis*. Además, sólo se predice un ángulo de rotación para el cual el estado singlete y el triplete se cruzan: entre 30 y 40 grados. A partir de este valor, el estado triplete será el estado fundamental según los resultados predichos en este nivel de cálculo.

La presencia del magnesio altera profundamente la SEP correspondiente al estado triplete de la molécula modelo. El efecto de la piramidalización sobre este estado es casi siempre el de desestabilizar la molécula en cantidades variables de energía. Pero más importante es el hecho de que ahora aparece una barrera rotacional en el estado triplete que anteriormente no estaba presente. Esta barrera posee un máximo para un valor de  $\phi$  de  $90^\circ$ . Esto se aprecia mejor en la Figura VII.18, en la que se presenta el perfil energético calculado sólo en función del ángulo de rotación, manteniendo  $\delta=0^\circ$  en todos los puntos. A efectos de obtener una mejor comparación, también incluimos en esta figura el perfil correspondiente al 1,2-dihidroxi-etileno sin el magnesio.



**Figura VII.18** Comparación entre los resultados obtenidos utilizando el método HF/4-31G con el catión  $Mg^{2+}$  situado como en el centro activo de la Rubisco y sin él. La energía relativa de los estados singlete y triplete (en kcal/mol) se representa en función del ángulo  $\phi$ .

Con objeto de incluir los efectos de la correlación electrónica se han realizado cálculos CISD para este modelo. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura VII.19, en la que sólo se muestra la variación en la energía de los estados singlete y triplete en función del ángulo  $\phi$ , para un valor fijo de  $\delta=0^\circ$  y se incluyen con objeto de obtener una mejor comparación los correspondientes perfiles energéticos calculados al mismo nivel sin la presencia del magnesio.

Como puede verse, en este nivel de cálculo se prevé un cruzamiento entre ambos estados para un ángulo de rotación de alrededor de  $50^\circ$ . Este valor corresponde con el obtenido mediante estudios de Rayos X sobre la Rubisco unida al sustrato. Si este resultado es extrapolable al sistema enzimático, la presencia del magnesio en el centro activo haría posible la bifuncionalidad de la Rubisco sólo para geometrías *quasi cis* del sustrato.

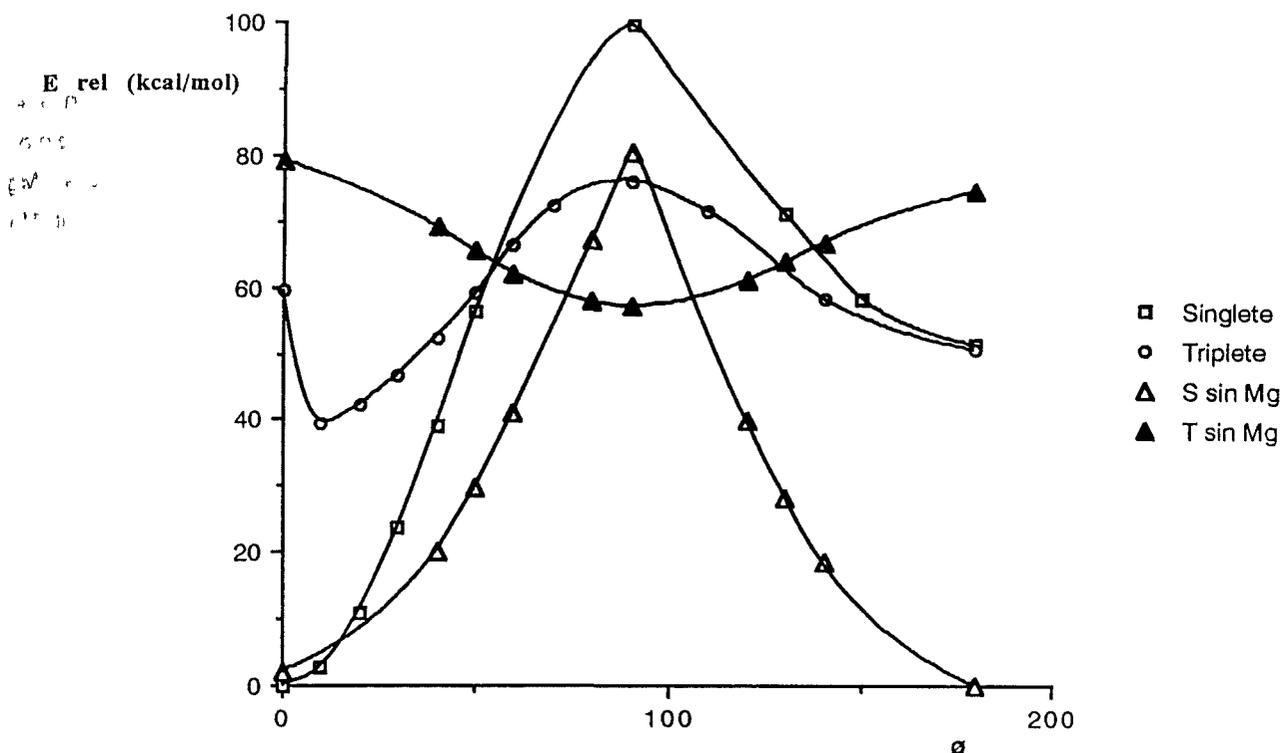
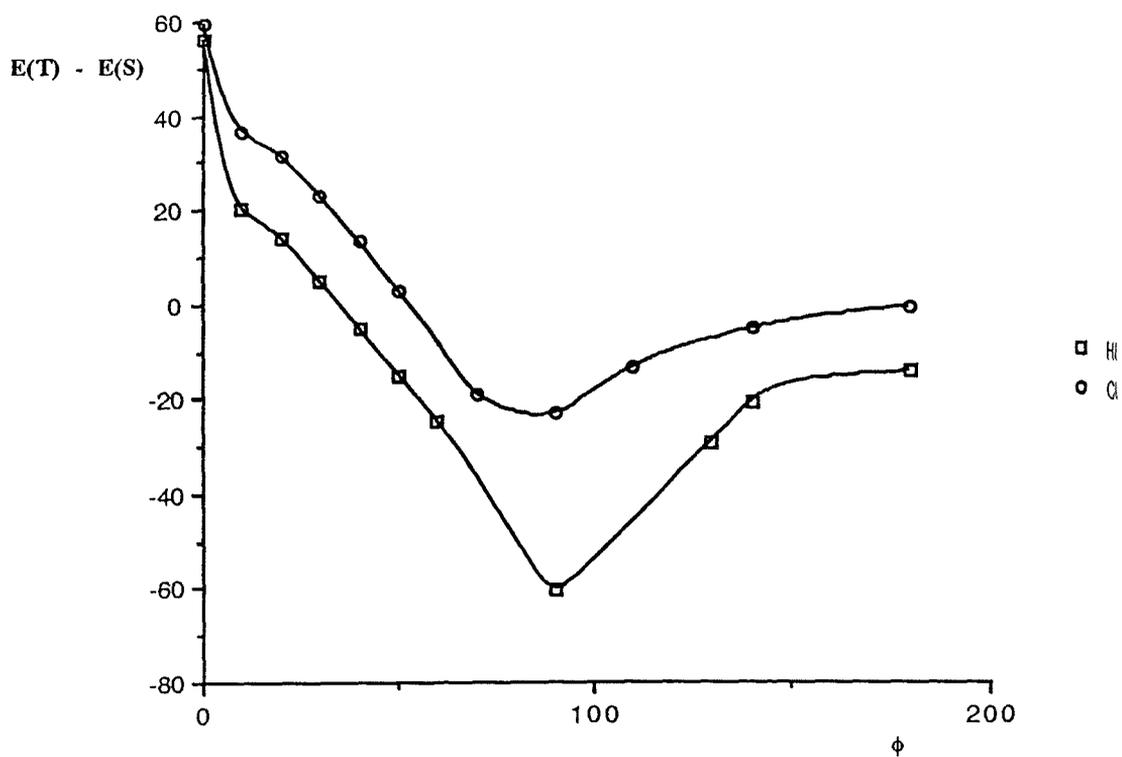


Figura VII.19 Comparación entre los resultados obtenidos mediante el método de cálculo CISD//HF/4-31G para el modelo 1,2-dihidroxietileno con el  $Mg^{2+}$  colocado como en el centro activo de la enzima y sin él. La energía relativa (kcal/mol) de los estados singlete y triplete se representa en función del ángulo  $\phi$ .



**Figura VII.20.** Representación de la diferencia de energías entre los estados singlete y triplete ( $E(T)-E(S)$ , en kcal/mol) del 1,2-dihidroxi-etileno coordinado con el  $Mg^{2+}$  en función del ángulo  $\phi$  (en grados). Se incluyen los resultados obtenidos con la metodología HF/4-31G y CISD//HF/4-31G

**Tabla VII.10** Energías relativas (kcal/mol) de puntos relevantes de las SEP correspondientes a la rotación del modelo molecular alrededor del doble enlace ( $\phi$ , en grados) y la posterior piramidalización ( $\delta$ , en grados). Se detallan los resultados obtenidos para los estados singlete (S) y triplete (T) calculados con el método HF/4-31G y CISD//HF/4-31G (sólo puntos de piramidalización cero, entre paréntesis). Las energías totales para los estados de referencia ( $\phi=0$ ,  $\delta=0$ ) son: -420.023489 (cálculo HF/4-31G) y -420.473909 (cálculo CISD) unidades atómicas.

$\phi/\delta$	S	T
0/0	0.0 (0.0)	56.20 (59.44)
0/ $\pm$ 30	9.46	31.74
10/0	3.29 (2.82)	23.34 (39.31)
10/30	13.78	33.27
10/-30	11.03	32.45
90/0	118.60 (99.54)	58.43 (76.10)
90/30	110.04	68.02
90/-30	138.54	75.09
180/0	50.10 (51.30)	35.68 (50.51)
180/ $\pm$ 30	61.42	46.68
60/-20	76.97	57.07
60/0	75.95 (79.54)	51.08 (66.38)
60/20	81.44	56.05
50/-20	59.85	71.22
50/0	59.96 (56.09)	44.77 (58.93)
50/20	66.99	49.90
40/-20	42.52	41.84
40/0	42.85 (39.06)	37.88 (52.34)
40/20	50.00	42.83
30/-20	26.83	35.49
30/0	26.48 (23.58)	31.64 (46.72)
30/20	33.22	36.53
20/0	12.62 (10.99)	26.63 (42.24)

Las energías relativas de algunos puntos escogidos de las SEP y perfiles energéticos obtenidos con el presente modelo se recogen en la Tabla VII.10. El estado de referencia para el cálculo de las energías relativas es la geometría plana *cis*. Con ella, hemos seleccionado los puntos correspondientes al estado plano *trans*, a la molécula rotada  $90^\circ$  y a los alrededores de las zonas de cruce entre las SEP. Para cada valor de la rotación, se ha incluido asimismo la influencia de la piramidalización.

Por último, en la Figura VII.20 se representa la diferencia energética S-T en función del ángulo  $\phi$  según los resultados obtenidos con los dos niveles de cálculo, tomando en todos los puntos  $\delta=0^\circ$ . Si se compara esta figura con las figuras VII.9 y VII.15, se aprecia una tendencia similar en el intervalo de rotación que nos interesa, excepto por el hecho del brusco descenso inicial de la diferencia energética S-T. Por otra parte, de nuevo se observa cómo los resultados HF sobrevaloran la disminución en la diferencia energética entre estados, aunque representan correctamente de modo cualitativo la tendencia a la disminución de esta diferencia con el aumento de la rotación.

Recientemente se ha publicado un estudio experimental sobre la enzima acetolactato sintasa<sup>45</sup>, que cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato para formar S-acetolactato y dióxido de carbono, o la condensación de una molécula de piruvato y una de  $\alpha$ -cetobutirato para formar  $\alpha$ -aceto- $\alpha$ -hidroxibutirato, además de la oxigenación de piruvato,  $\alpha$ -cetobutirato o acetolactato. En ese estudio se ha comprobado que, aunque la actividad de la enzima como oxigenasa está activada por diferentes cationes metálicos, éstos no están relacionados con los procesos químicos. Este resultado coincide con el que aquí se presenta para la enzima Rubisco.

#### VII.1.4.2 Estructuras y cargas

Algunas distancias y ángulos de enlace del modelo en estado singlete y triplete se muestran en la Tabla VII.11, para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ .

La rotación alarga el doble enlace en el estado singlete, acorta los enlaces C2O2 y C3O3 y hace mayor la distancia O2-Mg. Es interesante notar que en la configuración *trans* el átomo O2 se encuentra desplazado hacia el catión metálico,

de manera que la distancia C2O2 es muy grande y la distancia O2Mg pequeña. La piramidalización tiene un efecto escaso sobre los valores correspondientes a distancias interatómicas en el estado singlete. En cuanto a los ángulos, la rotación incrementa el valor de los que se muestran en la tabla, mientras que la posterior piramidalización no tiene un efecto pronunciado. Los ángulos O2C2C3 y H(O2)O2C2 están bastante cerrados en las configuraciones *trans*, como consecuencia del desplazamiento del átomo O2.

La piramidalización acorta considerablemente el doble enlace, así como los enlaces O2C2 y C3O3 en la conformación *cis* del estado triplete (Tabla VII.11 b), haciendo mayor la distancia O2Mg y abriendo los tres ángulos seleccionados. En las configuraciones *trans* los ángulos son mayores y los enlaces más cortos que en las *cis*.

Si se comparan estos datos con los obtenidos en ausencia del magnesio (apartado VII.1.2.3), las principales diferencias observadas para la molécula en su estado singlete son:

a) el doble enlace para  $\phi=90^\circ$  es un poco más corto cuando no hay magnesio, con lo cual la presencia del magnesio empieza a debilitar este enlace, aumentando su reactividad.

b) El enlace C2O2 es más corto para  $\phi=0^\circ$  y  $\phi=180^\circ$  en ausencia del magnesio, pero más largo para  $\phi=90^\circ$ .

c) Los ángulos de valencia OCC para  $\phi=0^\circ$  son más abiertos en ausencia del catión, lo cual es lógico dada la atracción entre el  $Mg^{2+}$  y los átomos de oxígeno. Sin embargo, para  $\phi=90^\circ$  sólo el ángulo C2C3O3 es más abierto en ausencia del catión, mientras que el ángulo O2C2C3 es más cerrado

En cuanto al estado triplete, las diferencias entre los resultados que se obtienen incluyendo el catión y los que se obtienen sin incluirlo son más pequeñas, excepto en la configuración *trans*, en la cual el doble enlace es bastante mayor en el resultado obtenido sin magnesio. Los enlaces CO son más largos si está presente el metal en las configuraciones *cis*. Este hecho se invierte en las configuraciones rotadas  $90^\circ$ . Las diferencias en los valores de los ángulos de valencia son menores que en el caso del estado singlete.

**Tabla VII.11 a** Parámetros geométricos seleccionados del estado singlete del 1,2-dihidroxietileno coordinado con el ion  $Mg^{2+}$  para diversos valores de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , ambos en grados. Se presentan los resultados obtenidos con el método de cálculo HF/4-31G.

$\phi/\delta$	Distancias interatómicas (Å)				Ángulos de enlace (grados)		
	C2C3	C2O2	C3O3	O2Mg	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2
0/0	1.304	1.474	1.483	2.345	112.39	112.64	110.84
0/ $\pm$ 30	1.312	1.452	1.515	2.394	114.11	109.10	111.58
90/0	1.450	1.279	1.320	2.706	125.13	114.46	118.81
90/30	1.440	1.294	1.322	2.660	123.17	117.44	117.99
90/-30	1.474	1.279	1.348	2.713	125.45	104.22	118.95
180/0	1.313	1.654	1.333	2.034	103.00	119.60	106.24
180/ $\pm$ 30	1.319	1.655	1.349	2.040	103.31	114.47	106.66

**Tabla VII.11 b** Parámetros geométricos seleccionados del estado triplete del 1,2-dihidroxietileno coordinado con el ion  $Mg^{2+}$  para diversos valores de los ángulos  $\phi$  y  $\delta$ , ambos en grados. Se presentan los resultados obtenidos con el método de cálculo HF/4-31G.

$\phi/\delta$	Distancias interatómicas (Å)				Ángulos de enlace (grados)		
	C2C3	C2O2	C3O3	O2Mg	O2C2C3	C2C3O3	H(O2)O2C2
0/0	1.517	1.483	1.477	2.272	109.10	108.35	109.08
0/ $\pm$ 30	1.406	1.300	1.336	2.561	118.38	113.23	119.23
90/0	1.475	1.400	1.252	2.348	110.27	118.42	113.17
90/30	1.484	1.395	1.258	2.421	113.86	115.49	114.29
90/-30	1.491	1.403	1.254	2.287	107.05	114.92	111.81
180/0	1.394	1.342	1.277	2.479	115.33	115.61	116.63
180/ $\pm$ 30	1.400	1.333	1.290	2.502	116.22	111.90	117.20

Las cargas atómicas netas para todos los átomos del modelo se detallan en la Tabla VII.12 para las geometrías seleccionadas.

**Tabla VII.12 a** Cargas atómicas netas del 1,2-dihidroxi-etileno coordinado con el ion  $Mg^{2+}$  en el estado singlete para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Los resultados se han obtenido con el método de cálculo HF/4-31G. Los mismos valores se obtienen cuando se incluye CISD.

	$\phi$ (Grados)/ $\delta$ (Grados)										
	0/0	0/±30	30/0	40/0	50/0	60/0	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/±30
C2	0.17	0.20	0.14	0.13	0.13	0.24	0.44	0.41	0.46	0.14	0.17
C3	0.16	0.15	0.16	0.17	0.17	0.10	0.13	0.11	0.15	0.28	0.25
O2	-0.89	-0.87	-0.92	-0.94	-0.98	-1.11	-0.60	-0.65	-0.61	-0.99	-0.99
O3	-0.90	-0.90	-0.81	-0.77	-0.74	-0.70	-0.64	-0.64	-0.68	-0.69	-0.70
H(O2)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.49	0.54	0.54	0.54	0.51	0.51
H(O3)	0.50	0.50	0.49	0.49	0.49	0.50	0.52	0.51	0.52	0.48	0.48
H2	0.34	0.34	0.34	0.35	0.36	0.41	0.37	0.36	0.38	0.35	0.36
H3	0.34	0.31	0.33	0.32	0.32	0.36	0.36	0.32	0.35	0.13	0.12
Mg	1.77	1.77	1.77	1.77	1.76	1.72	0.87	1.03	0.90	1.79	1.79

**Tabla VII.12 b** Cargas atómicas netas del 1,2-dihidroxi-etileno coordinado con el ion  $Mg^{2+}$  en el estado triplete para diversos valores de  $\phi$  y  $\delta$ . Los resultados se han obtenido con el método de cálculo HF/4-31G. Los mismos valores se obtienen cuando se incluye CISD.

	$\phi$ (Grados)/ $\delta$ (Grados)										
	0/0	0/±30	30/0	40/0	50/0	60/0	90/0	90/30	90/-30	180/0	180/±30
C2	0.18	0.38	0.34	0.32	0.29	0.25	0.22	0.21	0.23	0.33	0.36
C3	0.18	0.33	0.33	0.32	0.34	0.37	0.38	0.36	0.43	0.32	0.31
O2	-0.90	-0.72	-0.75	-0.76	-0.78	-0.80	-0.83	-0.82	-0.85	-0.80	-0.79
O3	-0.89	-0.76	-0.70	-0.67	-0.63	-0.59	-0.53	-0.54	-0.54	-0.58	-0.59
H(O2)	0.50	0.55	0.55	0.54	0.54	0.53	0.53	0.52	0.53	0.54	0.54
H(O3)	0.50	0.54	0.55	0.55	0.55	0.55	0.56	0.56	0.56	0.55	0.55
H2	0.32	0.39	0.38	0.38	0.38	0.37	0.37	0.36	0.37	0.38	0.38
H3	0.32	0.36	0.38	0.38	0.37	0.37	0.36	0.35	0.35	0.30	0.27
Mg	1.78	0.93	0.93	0.93	0.94	0.94	0.95	1.00	0.93	0.95	0.96

Es interesante comprobar que, partiendo de la configuración plana *cis*, la reducción en el valor de la carga sobre el magnesio es muy pequeña cuando el sistema se encuentra en el estado singlete, pero muy pronunciada en el estado triplete. De este modo, la redistribución de la carga positiva sobre los átomos del modelo contribuye a estabilizar el estado triplete, tal como se aprecia en las Figuras VII.17 b, VII.18 y VII.19. La mayor parte de la carga redistribuida se sitúa sobre los átomos de carbono y compensa parte de la carga negativa inicial de los oxígenos. El mismo efecto tiene la piramidalización del triplete *cis*. Una vez que la molécula ha perdido la planaridad, las oscilaciones de la carga que soporta el magnesio son pequeñas, así como las de la carga que soportan el resto de los átomos.

En el estado singlete las variaciones en los valores absolutos de las cargas son menos pronunciadas, excepto en la geometría perpendicular, donde también se aprecia una fuerte reducción en el valor de la carga que soporta el magnesio, con el consiguiente incremento de la carga sobre C2.

En general, el estado triplete posee una distribución de cargas más relajada que el singlete una vez que la molécula ha sido deformada, lo cual contribuye a explicar por qué el triplete es más estable que el singlete para la molécula deformada.

Las cargas positivas sobre los carbonos son mayores que en el caso en que no hay magnesio (apartado VII.1.2.3). Este hecho no es muy sorprendente si se tiene en cuenta que una carga total de +2 se distribuye sobre el sistema.

Con el objetivo de discernir si el efecto del magnesio es de carácter electrostático o electrónico, hemos realizado cálculos sustituyendo el  $Mg^{2+}$  por una carga puntual. Para el estado singlete, una carga de sólo 0.02 unidades atómicas reproduce el mismo valor para la barrera rotacional, mientras que para el estado triplete el valor de la carga puntual que la reproduce es de 0.07 unidades atómicas. De este resultado se puede concluir que el efecto del magnesio es fundamentalmente electrónico.

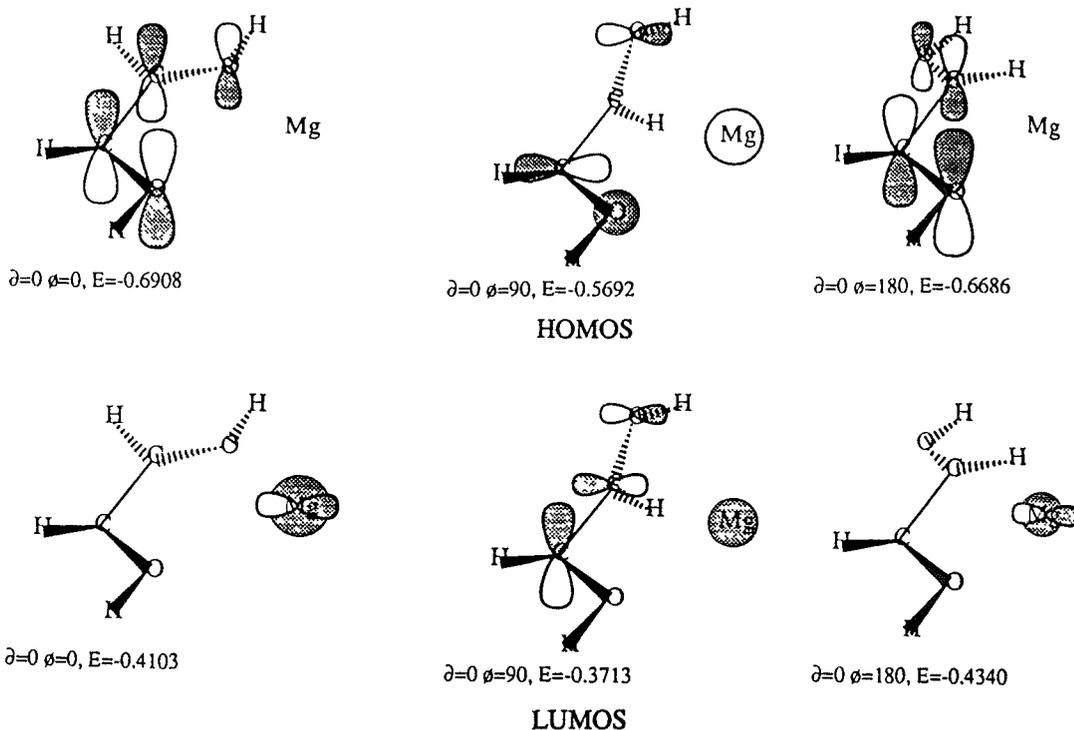
### VII.1.4.3 HOMOs y LUMOs

Un análisis de los HOMOs y los LUMOs, que presentamos en forma de diagrama en la Figura VII.21, según los datos obtenidos para el estado singlete del modelo, apoya la afirmación anterior.

El HOMO en el punto de geometría *cis* corresponde al enlace  $\pi$  asociado al doble enlace C2C3 y a pares solitarios de electrones de los oxígenos en antifase. Lo mismo sucede en el punto de geometría *trans*. En el punto de rotación  $90^\circ$ , el HOMO está asociado a los electrones s del O2 y del magnesio, con alguna participación de electrones  $p_x$  de C2 y O4.

La participación del catión también se observa en los LUMOs. Allí los electrones s y  $p_x$  del magnesio son prácticamente los únicos que participan en los orbitales moleculares en las geometrías planas. También en la geometría perpendicular participan los electrones s del Mg.

En cuanto al estado triplete, no representado en la Figura VII.21, los resultados son similares, con participación de electrones del magnesio en HOMOs y LUMOS.



**Figura VII.21** HOMOs y LUMOs correspondientes a las geometrías planas *cis* y *trans* y a la rotada 90° del modelo 1,2-dihidroxi-etileno coordinado con el Mg<sup>2+</sup>, según los resultados obtenidos con el método de cálculo HF/4-31G. Las energías se dan en unidades atómicas.

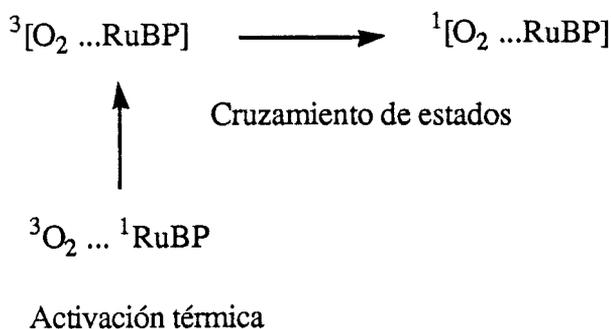
## VII.1.5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mediante la utilización del modelo de dos carbonos<sup>46,47</sup> sugieren que en un enodiol convenientemente deformado, la diferencia energética entre los estados S y T puede ser apreciablemente menor que la existente en las conformaciones planas. Por consiguiente, en el sustrato enolizado de la Rubisco sería suficiente que el fragmento enodiolico alrededor de los centros C2 y C3 tuviera una conformación piramidalizada y rotada fuera del plano para experimentar un importante cambio en las propiedades electrónicas asociadas con él. Los datos experimentales de Rayos X obtenidos sobre el sustrato situado en el centro activo de la enzima claramente indican este tipo de deformación<sup>1,9,10</sup>. Por tanto es una hipótesis razonable asumir que el estado

triplete del sustrato catalíticamente activo unido a la enzima tendrá una energía suficientemente baja.

Este hecho proporciona una explicación a la bifuncionalidad de la Rubisco y permite una discusión simultánea de las reacciones de carboxilación y oxigenación, como se verá más adelante. La primera es un proceso que tiene lugar entre dos moléculas en estado singlete, sobre la SEP reactiva de dicho estado. En la segunda se forma una supermolécula cuyo estado fundamental es el triplete, como veremos en el apartado correspondiente a la reacción de oxigenación. La idea es que el estado singlete se encuentra próximo al triplete cuando el enodiol está rotado. Entonces, un cruzamiento de estados es un proceso probable que explica la transformación irreversible hacia el estado singlete de los productos (Esquema VII.1).

La posibilidad de un cambio en el estado electrónico del  $^3\text{O}_2$  para convertirse en  $^1\text{O}_2$  antes de formarse la supermolécula y entonces reaccionar con el sustrato en su estado singlete puede ser desechada. De hecho, ese tipo de transformación necesitaría una energía adicional de unas 35 kcal/mol (cálculo MP2/6-31G\*). Esta energía es grande y resulta difícil comprender de dónde puede obtenerse. La alternativa propuesta aquí es más sencilla y la explicación del enodiol deformado parece más razonable.



*RuBP: D-Ribulosa-1,5-bifosfato*

**Esquema VII.1** Diagrama de los cambios electrónicos que permiten explicar el proceso de oxigenación y, por tanto, la bifuncionalidad de la Rubisco.

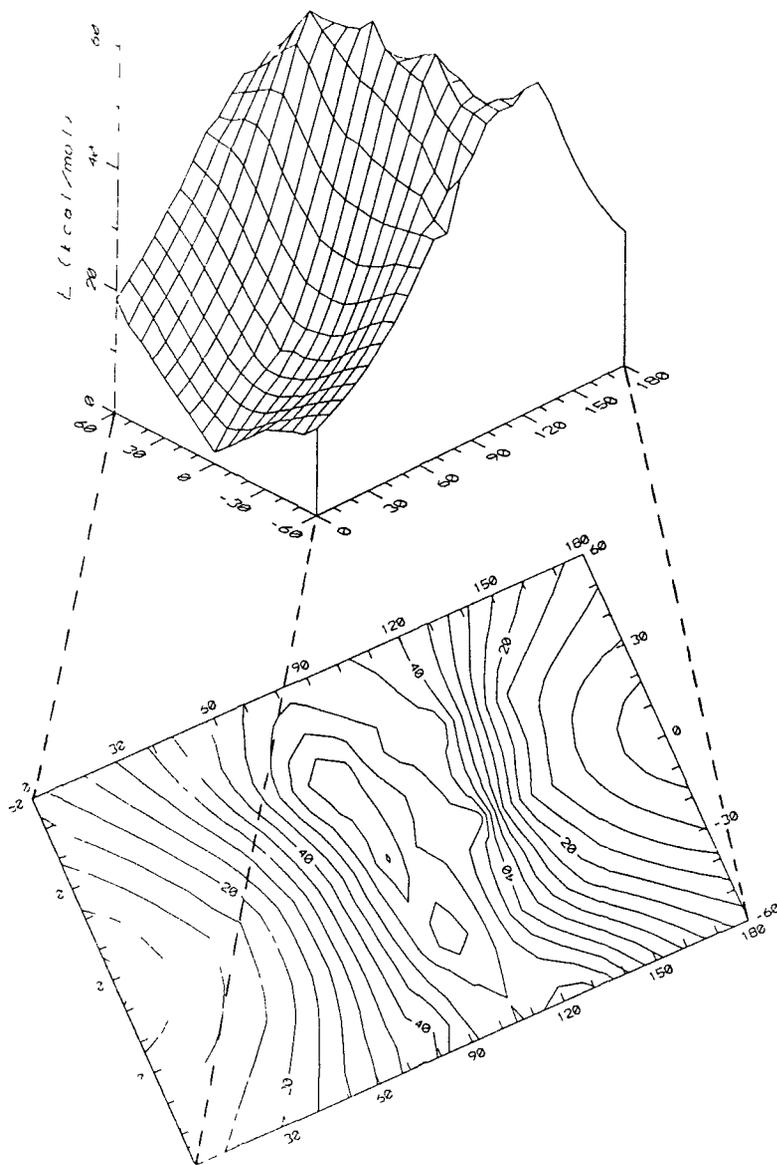
Los resultados obtenidos con el modelo de cinco carbonos indican que el modelo sencillo se comporta del mismo modo que el modelo más extenso. Por tanto, los resultados y conclusiones obtenidas con el uso del modelo 1,2-dihidroxietileno son aplicables al sustrato real de la Rubisco.

Los resultados obtenidos en los cálculos que incluyen el catión magnesio deben interpretarse con cautela, dado que no se tiene en cuenta la esfera de coordinación. Pese a ello, cabe destacar que la inclusión del magnesio produce importantes cambios en el comportamiento de la molécula cuando es deformada desde la geometría plana *cis*, como la aparición de una barrera rotacional en el estado triplete y la mayor estabilidad del triplete como consecuencia de una mayor distribución de cargas atómicas que en el estado singlete. Se deduce de los resultados que el efecto del magnesio es fundamentalmente electrónico.

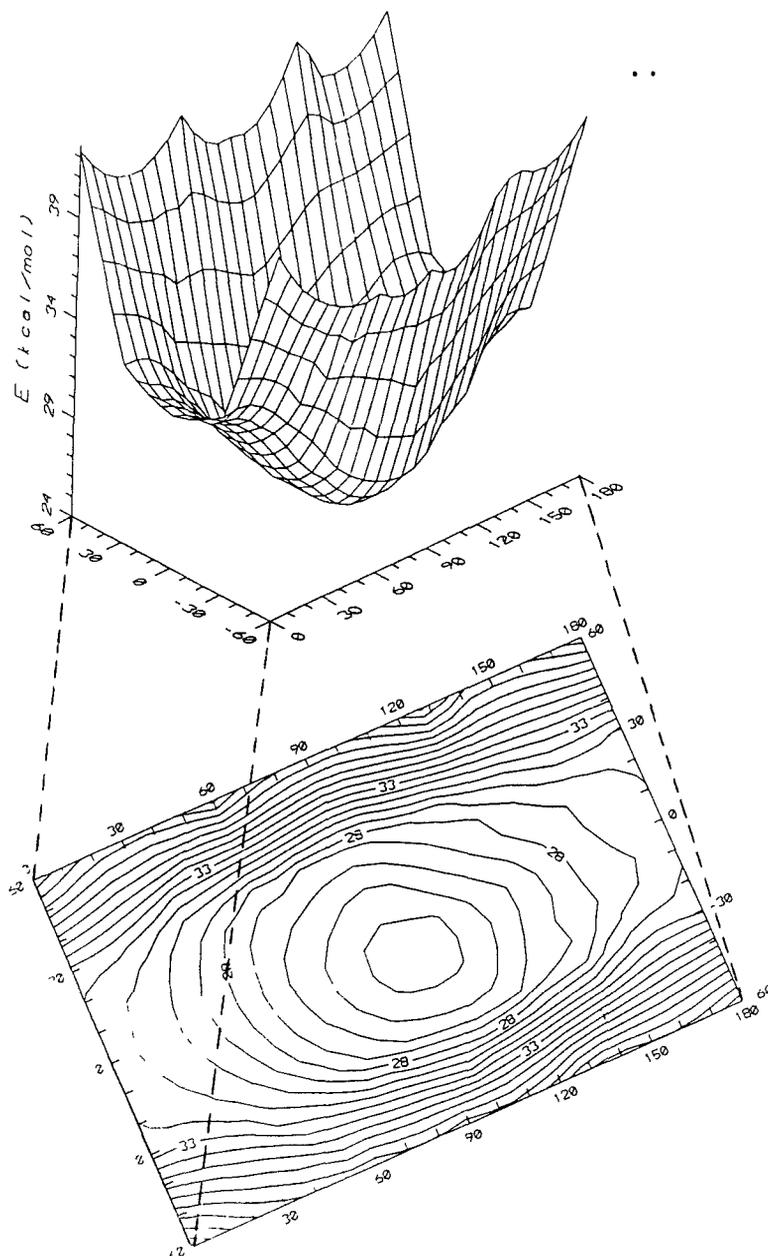
Por su parte, a efectos de explicar la bifuncionalidad de la Rubisco, los resultados obtenidos cuando se incluye el magnesio no modifican la validez de la conclusión obtenida: la bifuncionalidad es consecuencia de las deformaciones geométricas que el sustrato sufre en el centro activo de la proteína y que permiten un acercamiento energético entre los estados singlete y triplete. El catión no está directamente relacionado con los procesos químicos que tienen lugar en el centro activo de la enzima. Esto coincide con un reciente estudio experimental sobre la enzima acetolactato sintasa<sup>45</sup>.

## VII.1.6 APÉNDICE

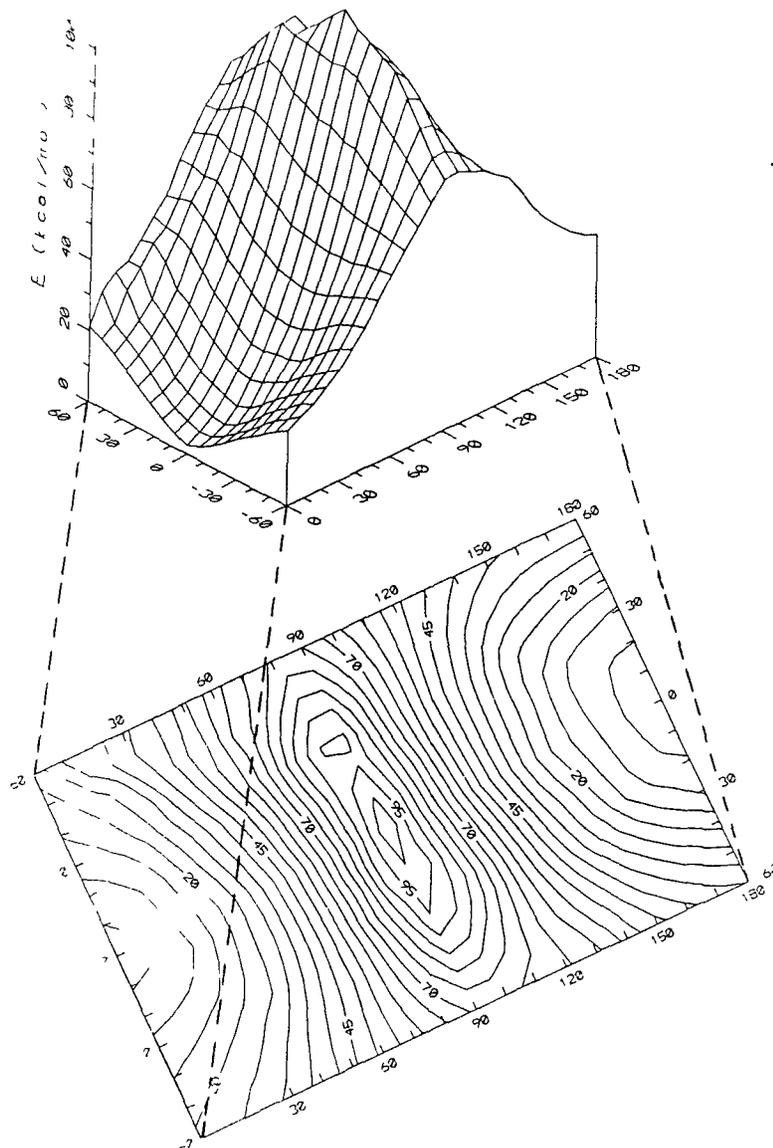
En este apéndice se presentan las Figuras VII.3 a VII.7, correspondientes a las SEP para los estados singlete y triplete del modelo 1,2-dihidroxietileno en función de la rotación alrededor del doble enlace y la posterior piramidalización, calculadas mediante los niveles de cálculo AM1, HF/4-31G, HF/3-21G\*, HF/6-31G\* y MP2/6-31G\*. Así mismo, se presentan las Figuras VII.13 y VII.14, correspondientes a las SEP para los estados singlete y triplete del modelo 2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato en función de la rotación alrededor del doble enlace y la posterior piramidalización, calculadas mediante los niveles de cálculo AM1 y HF/3-21G y las Figuras VII.17, correspondientes a las SEP para los estados singlete y triplete del modelo 1,2-dihidroxietileno con inclusión del catión magnesio en función de la rotación alrededor del doble enlace y la posterior piramidalización, calculadas mediante el nivel de cálculo HF/4-31G.



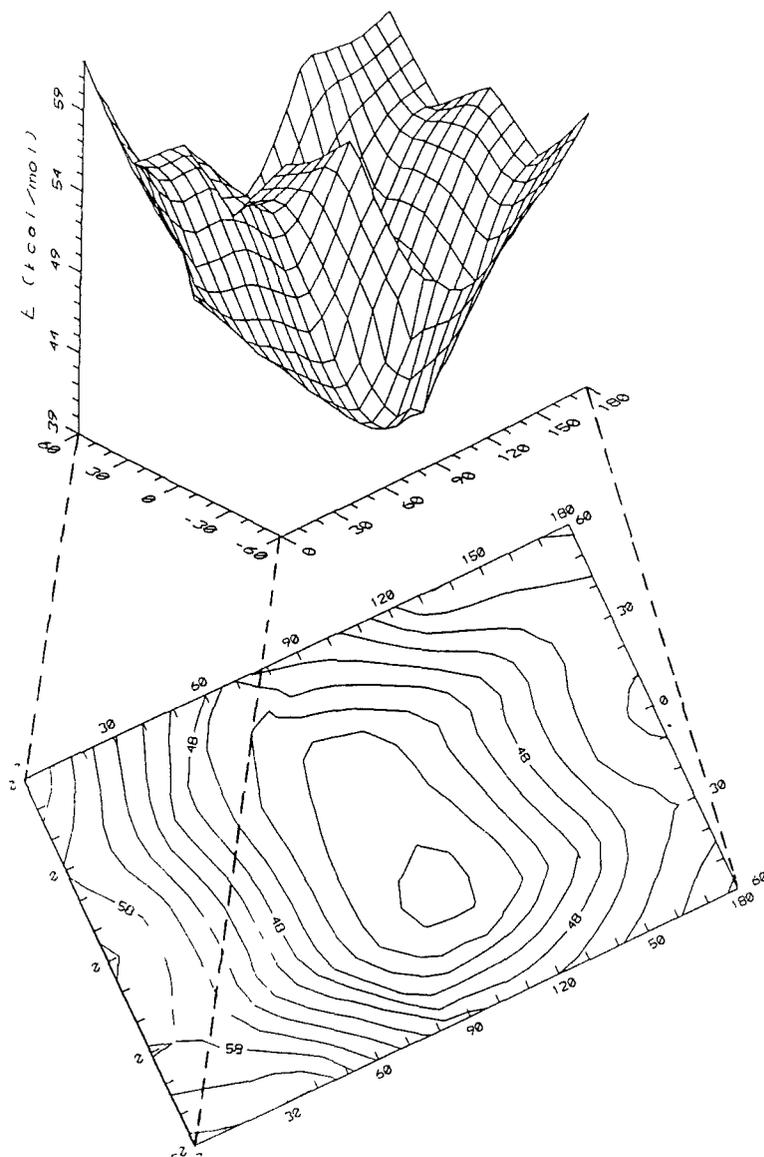
**Figura VII.3 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método semiempírico AM1 para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxiétileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



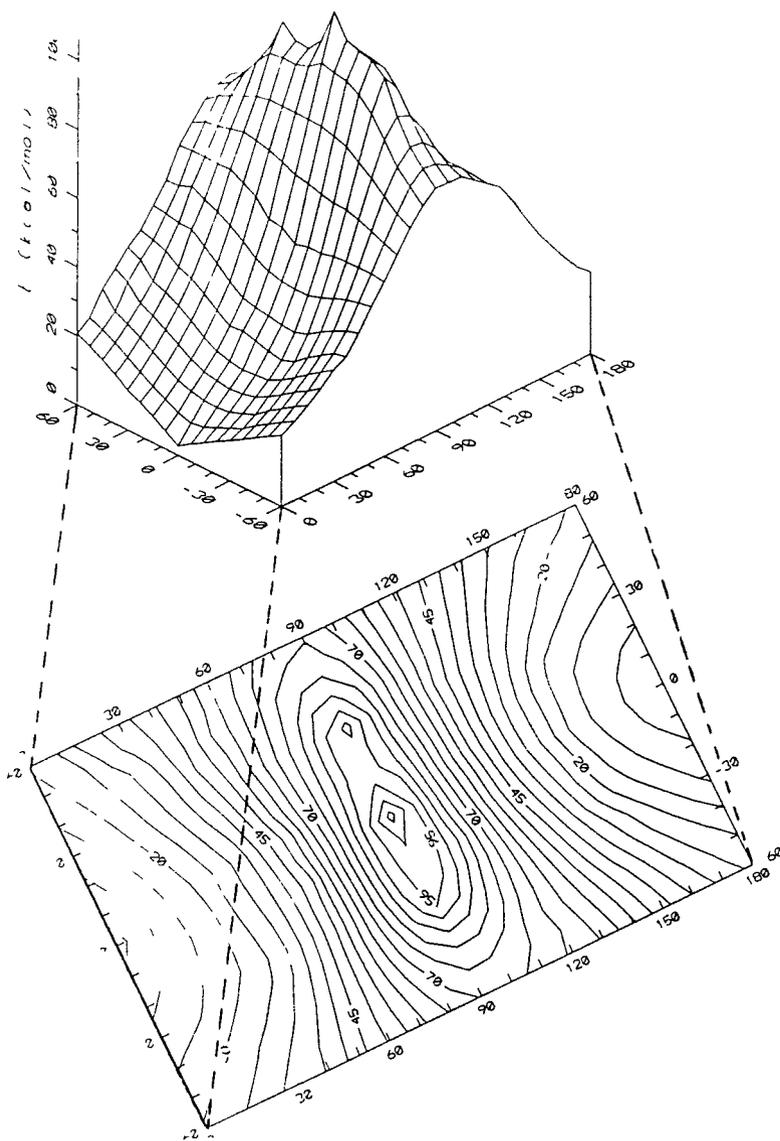
**Figura VII.3 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método semiempírico AM1 para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroietileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



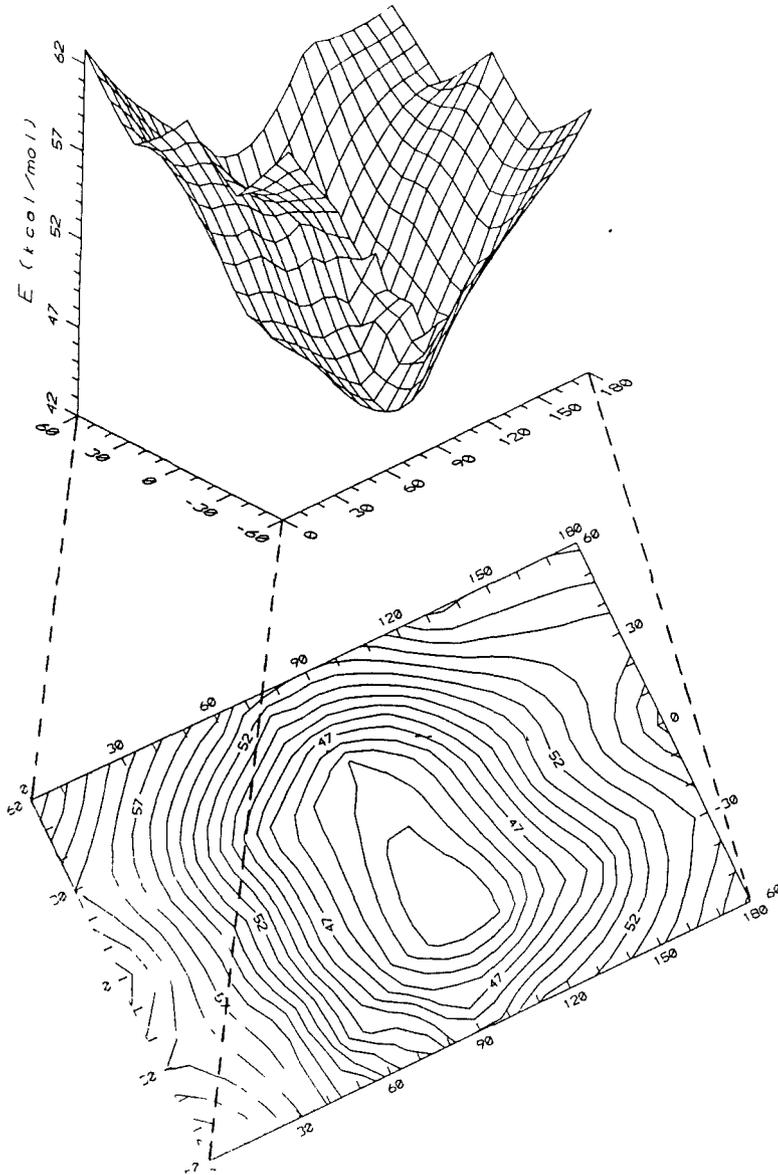
**Figura VII.4 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/4-31G para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



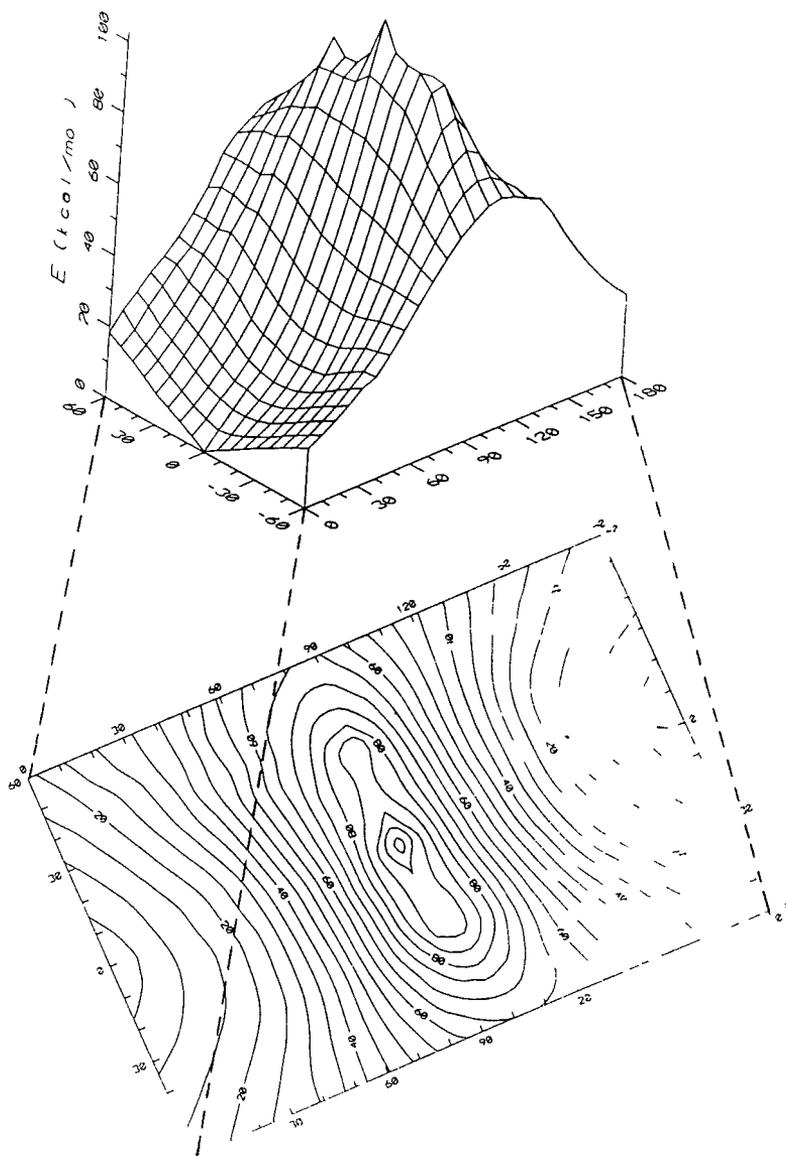
**Figura VII.4 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/4-31G para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



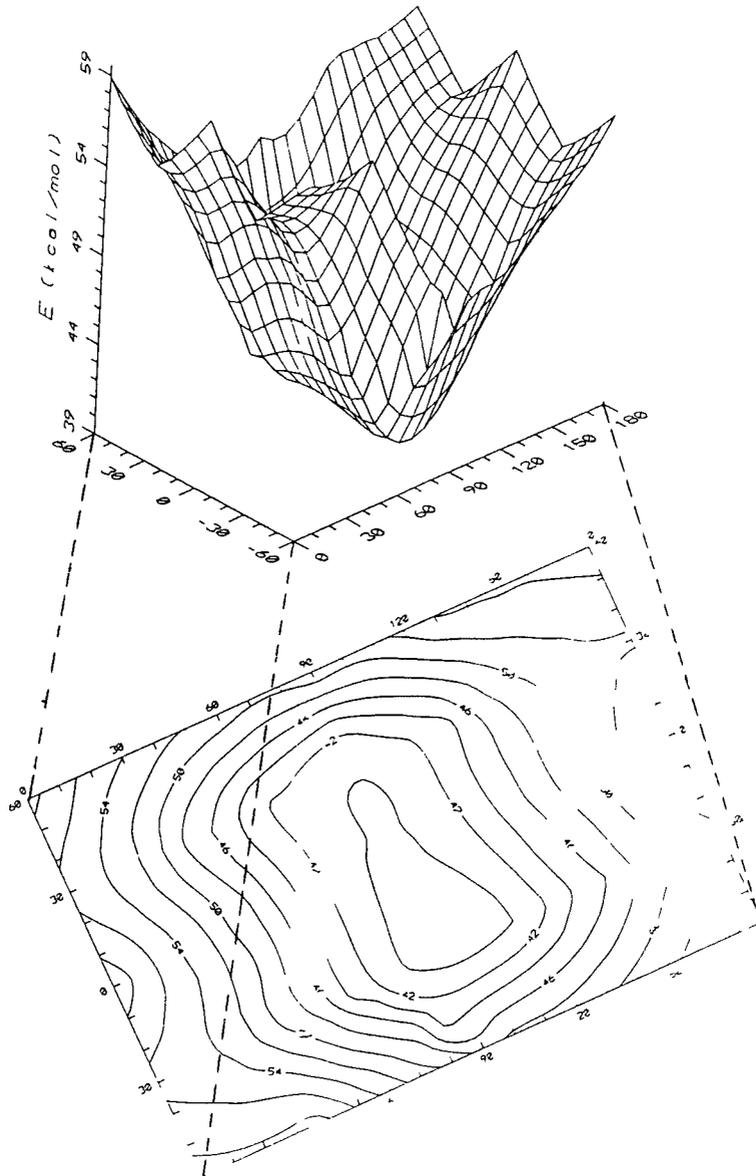
**Figura VII.5 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/3-21G\* para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



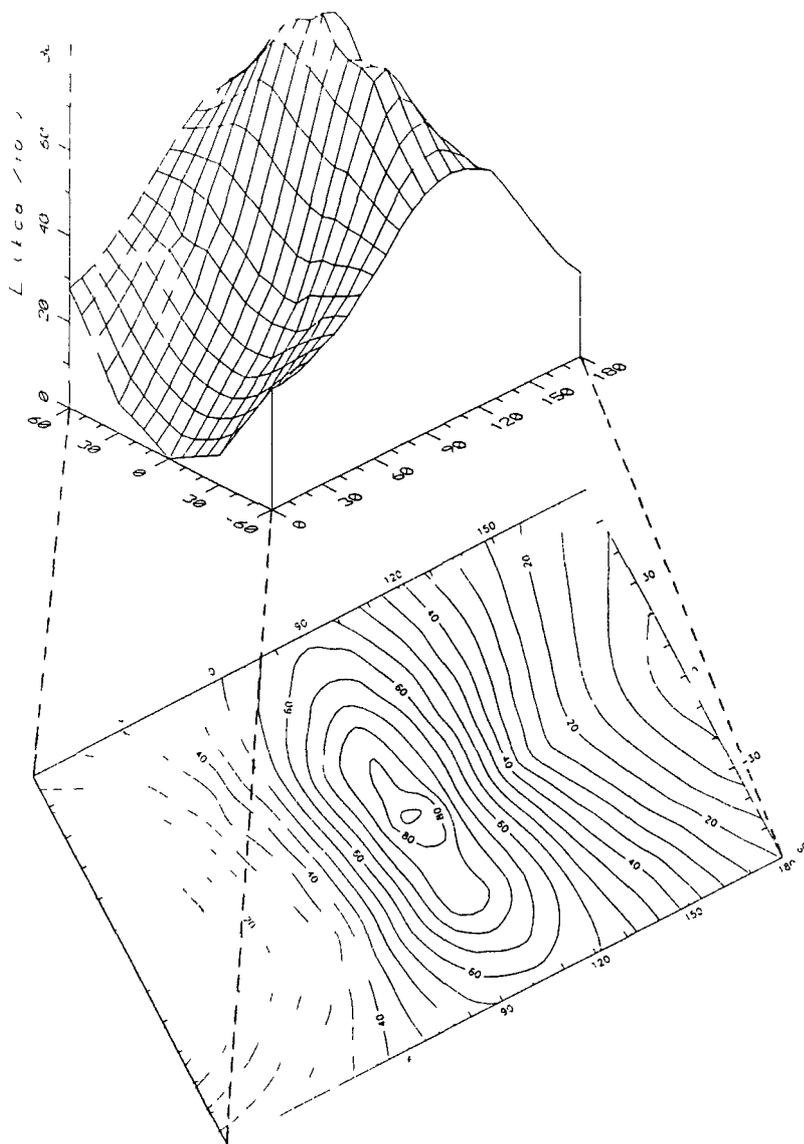
**Figura VII.5 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/3-21G\* para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroxietileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



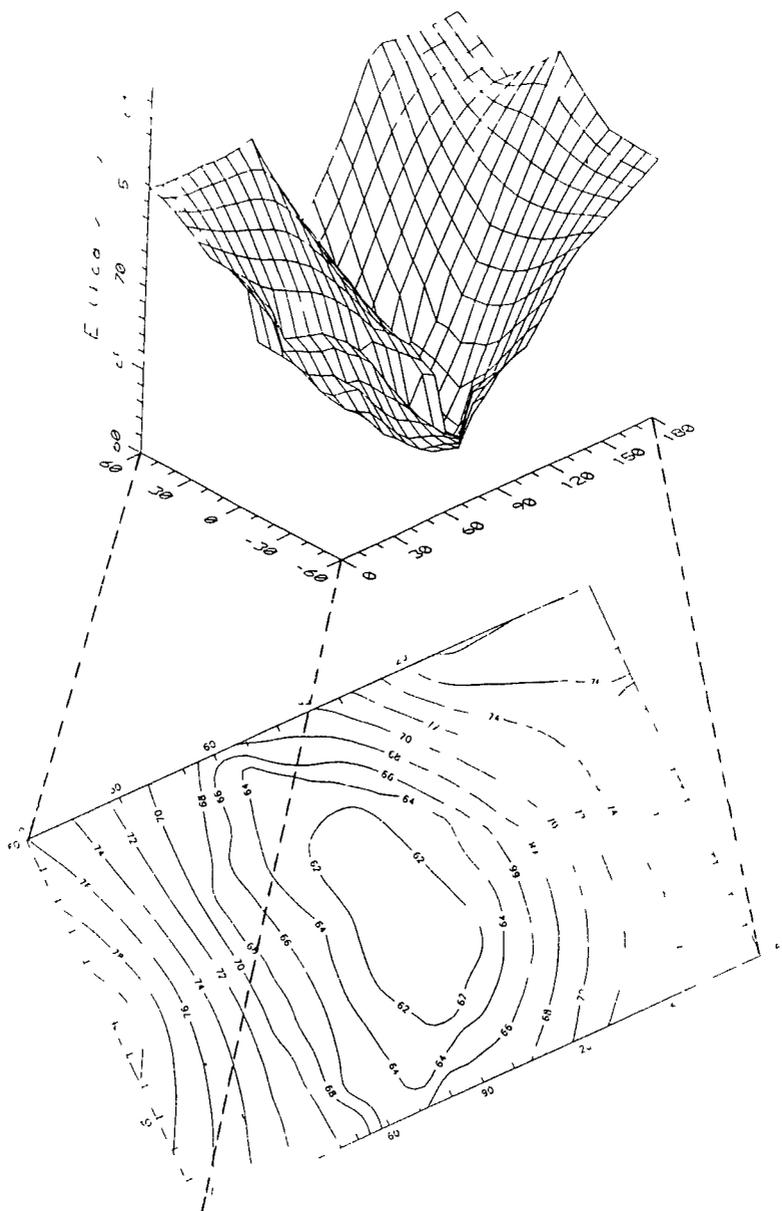
**Figura VII.6 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/6-31G\* para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



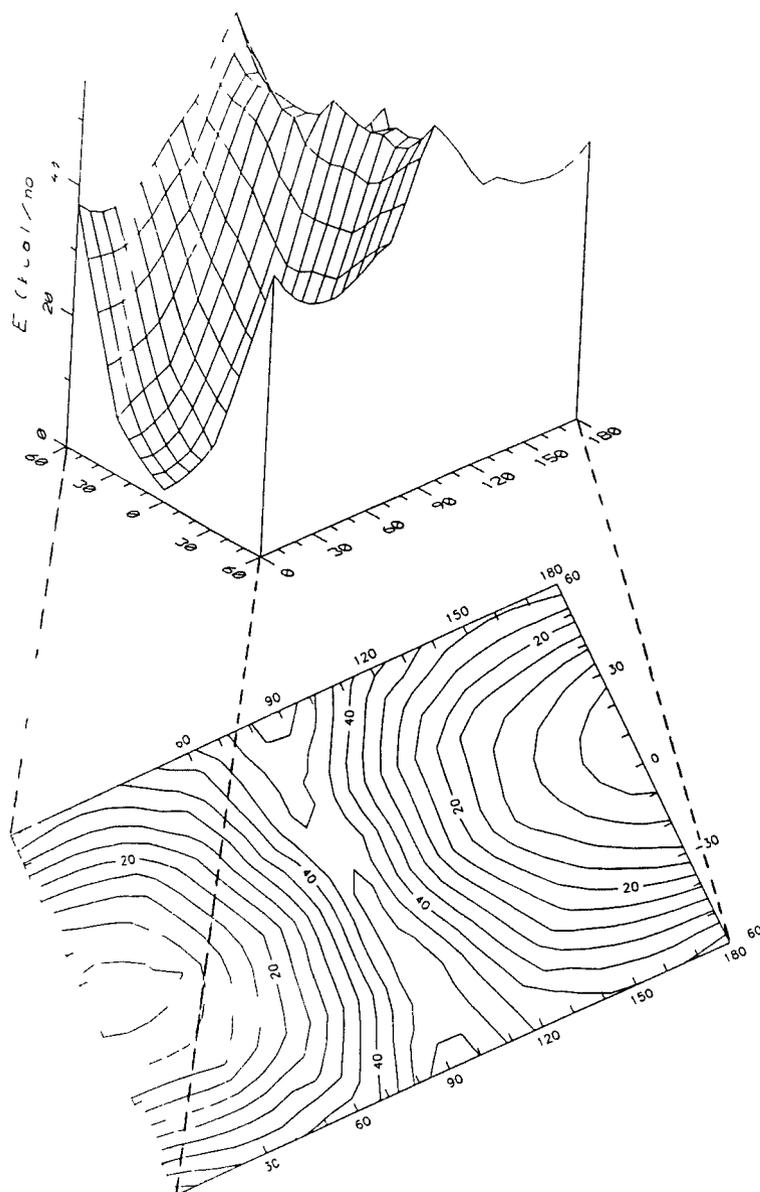
**Figura VII.6 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/6-31G\* para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



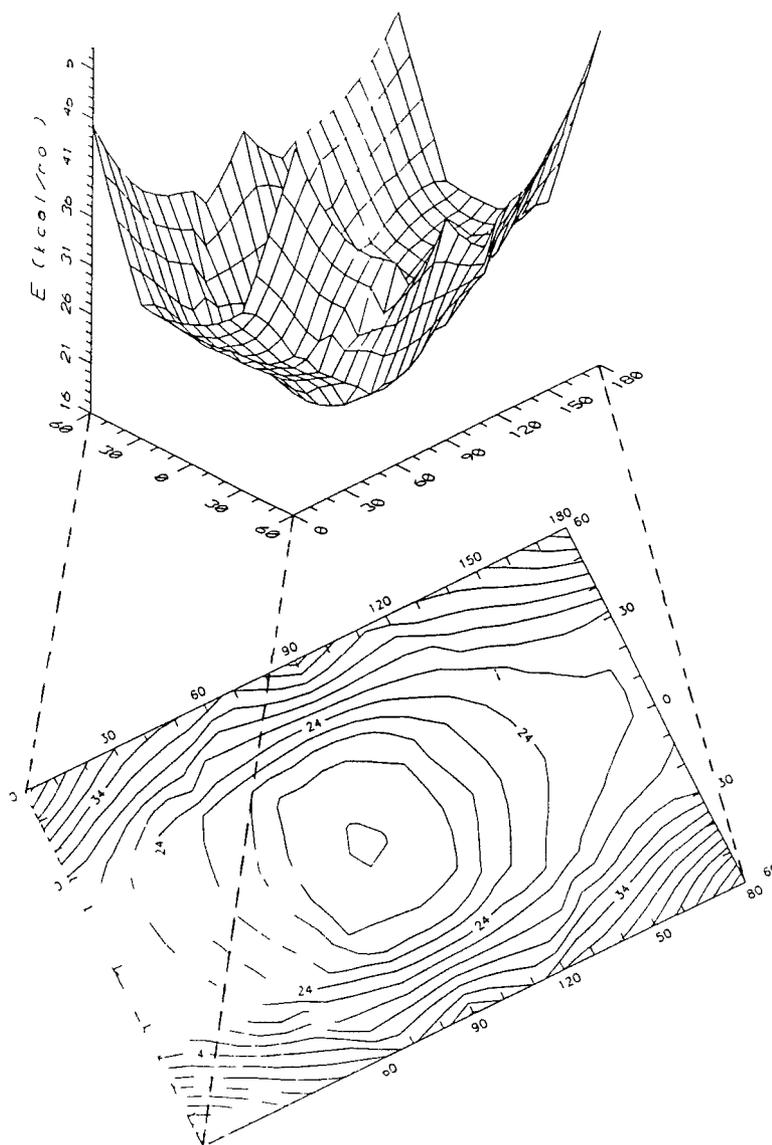
**Figura VII.7 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método MP2/6-31G\* para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.7 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método MP2/6-31G\* para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.13 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método semiempírico AM1 para el estado singlete de la molécula modelo (2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.13 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (idem, de -60 a +60), calculada con el método semiempírico AM1 para el estado triplete de la molécula modelo (2,3,4-trihidroxi-2-pentén-1,5-diolato). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.

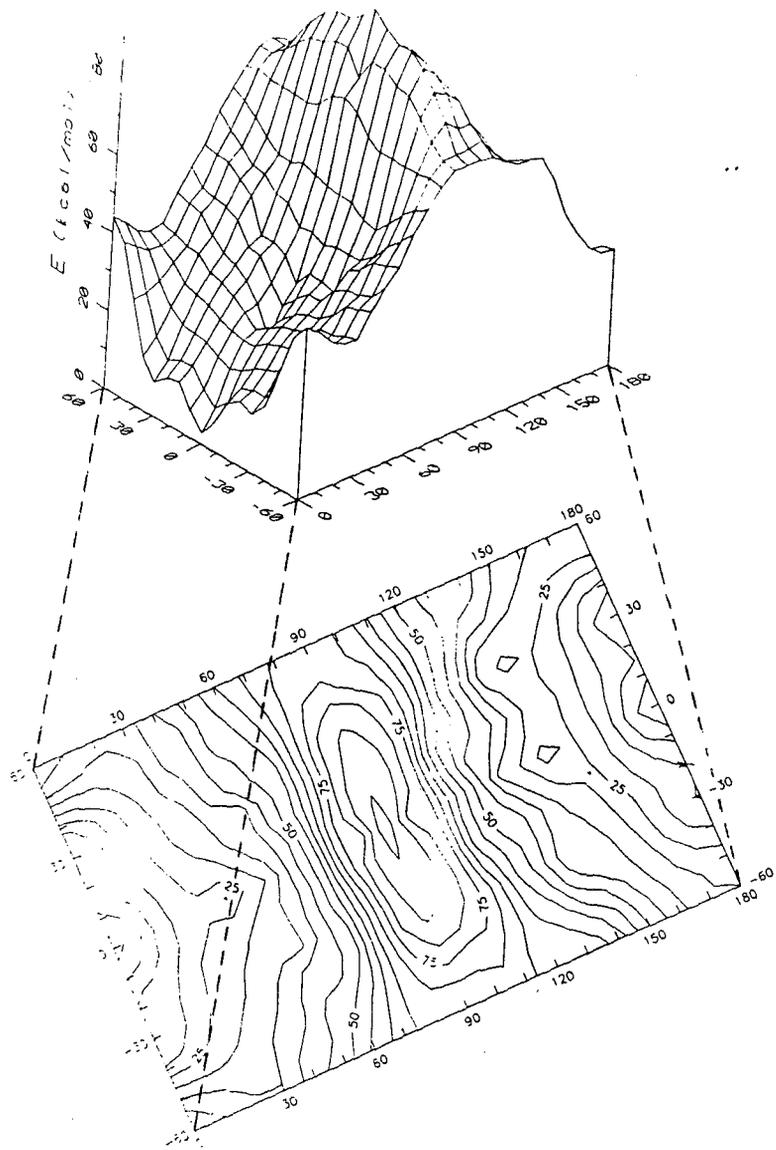
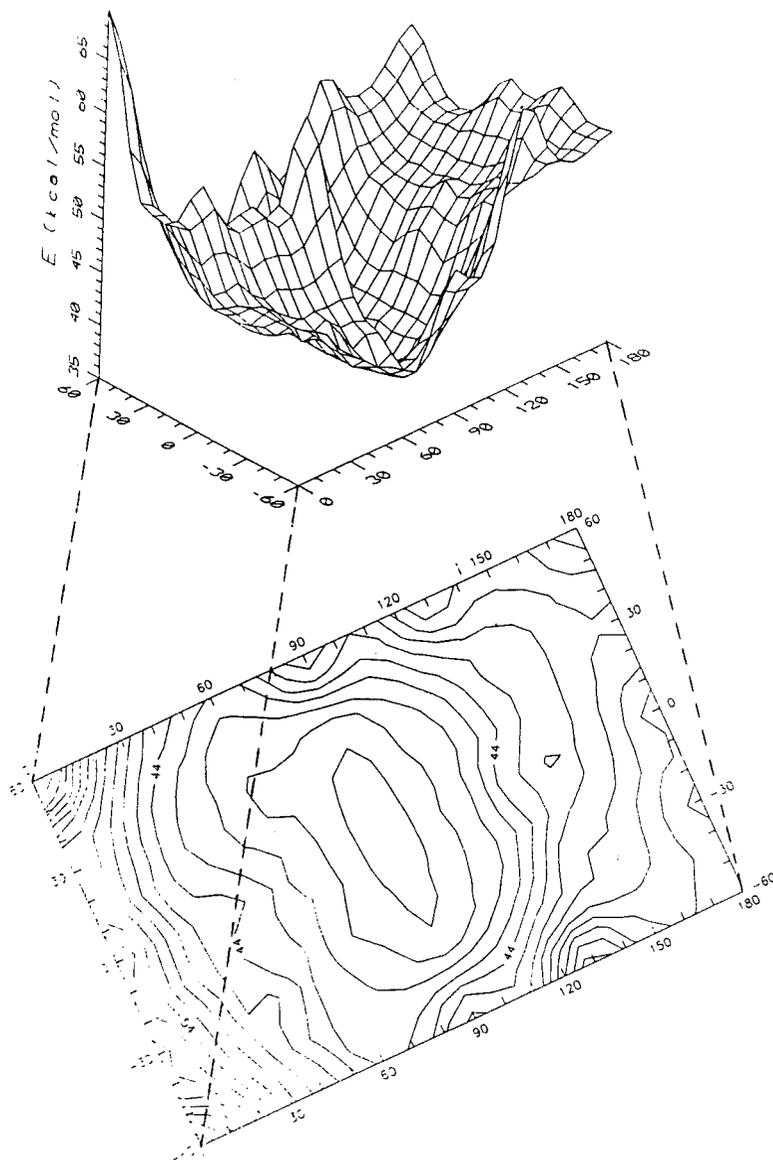
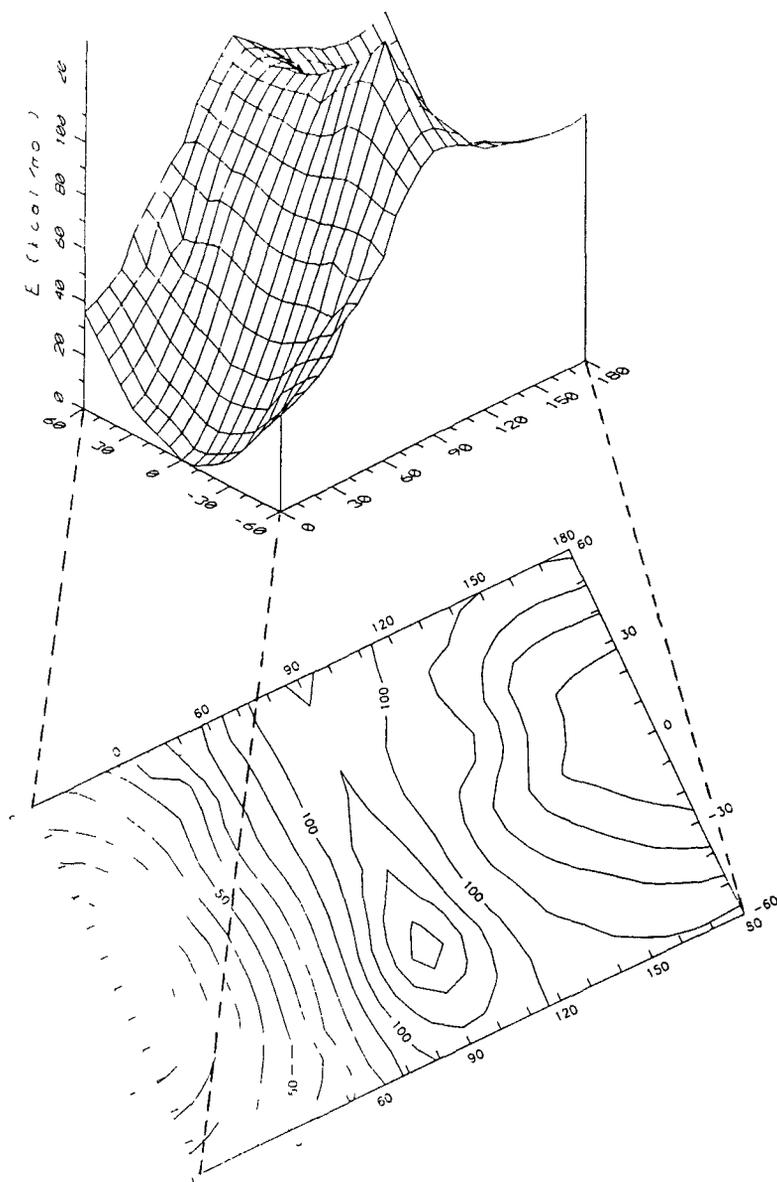


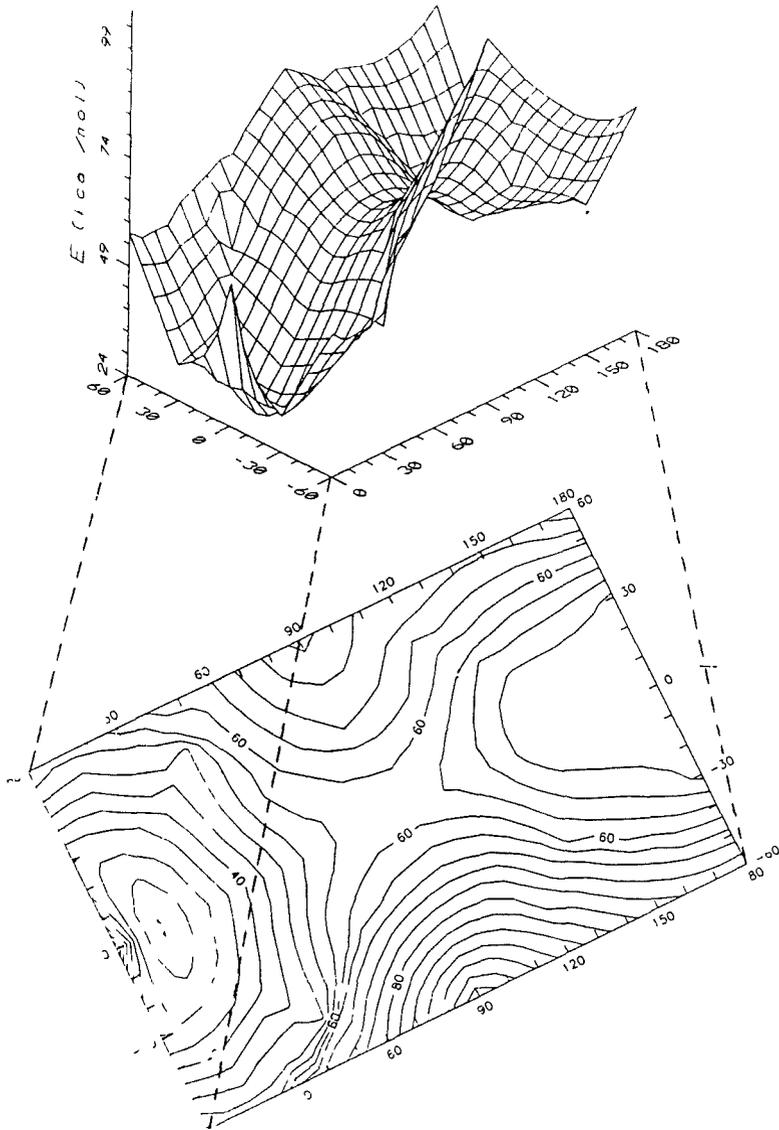
Figura VII.14 a. SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/3-21G para el estado singlete de la molécula modelo (2,3,4-trihidroxí-2-pentén-1,5-diolato). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.14 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/3-21G para el estado triplete de la molécula modelo (2,3,4-trihidroxipentén-1,5-diolato). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.17 a.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/4-31G para el estado singlete de la molécula modelo (1,2-dihidroxi-etileno con inclusión del catión  $Mg^{2+}$ ). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.



**Figura VII.17 b.** SEP en función de  $\phi$  (en grados, de 0 a 180) y  $\delta$  (ídem, de -60 a +60), calculada con el método HF/4-31G para el estado triplete de la molécula modelo (1,2-dihidroxietileno con inclusión del catión  $Mg^{2+}$ ). Se presenta una vista tridimensional y las líneas de contorno.

## VII.2 MECANISMO MOLECULAR DE LA ENOLIZACIÓN

### VII.2.1 INTRODUCCIÓN

El tautomerismo es un fenómeno importante en química y biología<sup>48</sup>. En particular, la tautomería cetoenólica juega un papel fundamental en el mecanismo de gran número de procesos biológicos. Aunque los enoles simples se consideran especies de vida corta en síntesis orgánica<sup>49,50</sup>, en los procesos enzimáticos son especies de vida más larga que juegan un papel clave como intermedios. Por ejemplo, se han identificado en reacciones catalizadas por Rubisco<sup>2</sup> y triosafosfato isomerasa<sup>23,51,52</sup>, así como en reacciones catalizadas por descarboxilasas<sup>53</sup> y en la mutagénesis del DNA<sup>54,55</sup>.

En el caso de la Rubisco, una vez que la enzima ha sido activada (ver apartado II.2.1), se acepta generalmente que el primer paso del proceso catalítico es el de enolización<sup>2</sup>. Esta etapa, según Saver y Knowles, debe ser, al menos de manera parcial, limitante de la velocidad del proceso catalítico global<sup>56,57</sup>. En ella se forma un 2,3-enodiol que es formalmente el reactivo de las reacciones de carboxilación y oxigenación.

Como explicamos en el apartado II.2.2 de la presente memoria, hay una cierta controversia por lo que respecta al mecanismo molecular mediante el cual se produce la enolización. Desde el punto de vista teórico, nuestros resultados sugerían que el mecanismo consiste en una transferencia intramolecular de hidrógeno<sup>11</sup>. Sin embargo, no se había realizado ninguna caracterización teórica de la superficie de energía asociada a este proceso. Esta situación nos ha incitado a realizar un estudio teórico de la etapa de enolización, utilizando diferentes modelos moleculares del sustrato real<sup>58</sup>.

Para ello hemos seleccionado cuatro modelos moleculares que describen con distintos grados de aproximación al sustrato real de las reacciones catalizadas por la enzima Rubisco: el sistema hidroxietanal/1,2-dihidroxietileno, que es el modelo mínimo necesario para describir la formación del doble enlace enodiólico;

el sistema hidroxipropanona/1,2-dihidroxi-propeno, en el que se incluye el C1 del sustrato y para el cual hemos realizado un estudio completo de la SEP asociada con la etapa de enolización; el sistema 3,4-dihidroxi-2-pentanona/2,3,4-trihidroxi-2-penteno, en el que el modelo se amplía a toda la cadena de carbonos del sustrato; y el sistema ácido 3,4-dihidroxi-2-pentanona-1,5-bifosfórico/ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, que salvo por el hecho de tener protonados los grupos fosfato corresponde con el sustrato real: la D-Ribulosa-1,5-bifosfato.

En los distintos modelos moleculares hemos utilizado diferentes niveles de cálculo, en función del tamaño del modelo y de los resultados que íbamos obteniendo con los otros modelos.

Diversos autores han llevado a cabo estudios teóricos de estabilidades relativas, tanto en vacío como en solución, de especies tautoméricas<sup>28,59-62</sup>. La caracterización de estructuras de transición en transferencias de hidrógeno de este tipo no ha sido muy estudiada, aunque se han realizado diversos estudios sobre transferencia intramolecular de protón en el anión hidrógeno oxalato, en el malonaldehído y compuestos relacionados<sup>63-65</sup>. Sólo muy recientemente Yuanqui y colaboradores han caracterizado una ET para la tautomería intramolecular 1,3 en el sistema ácido formhidroxámico-ácido formhidroxímico<sup>66</sup>.

En la presente etapa de enolización, estudiamos el proceso de transferencia intramolecular de hidrógeno desde el C3 hasta el O2. Como veremos, la estructura del punto estacionario encontrado es invariante con respecto al nivel de representación de la función de onda y es también invariante respecto al modelo molecular escogido. Los resultados, obtenidos *in vacuo*, representan una comprobación del postulado de la invariancia fundamental del estado de transición.

Para localizar las ET hemos empleado el método del espacio de control y el espacio complementario, descrito en el apartado IV.3.3. El espacio de control incluye todos los grados de libertad que definen el esquema de enlaces alrededor de los centros C2 y C3, el hidrógeno que se transfiere (Ht) y los ángulos dihedros que definen la conformación de los oxígenos respecto al eje C2C3. Las coordenadas de control se han definido del siguiente modo:

$$\chi^+ = \frac{(R_{O_2} - R_{C_3})(R_{O_2} - R_{C_3})}{|R_{O_2} - R_{C_3}|} = (R_{O_2} - R_{C_3})n_{O_2C_3} \quad (\text{VII.1})$$

que es una definición análoga a la dada en la ecuación IV.20. En ésta,  $R_A$  es el vector de posición del átomo A y  $n_{AB}$  es un vector unitario en la línea que une A con B. Por su parte, definimos la coordenada antisimétrica como:

$$\chi^- = (R_{H_t} - R_{O_2})n_{O_2C_3} \quad (\text{VII.2})$$

Esta definición, a diferencia de la dada en la ecuación IV.22, no está normalizada. Esto es debido a que los cálculos se inician en las cercanías de la geometría del ET. Por su parte, la coordenada  $\rho$  está definida a efectos prácticos como la distancia de  $H_t$  a la línea que une  $O_2$  con  $C_3$ :

$$\rho = \sqrt{\left((R_{H_t} - R_{O_2})n_{O_2H_t}\right)^2 - \left((R_{H_t} - R_{O_2})n_{O_2C_3}\right)^2} \quad (\text{VII.3})$$

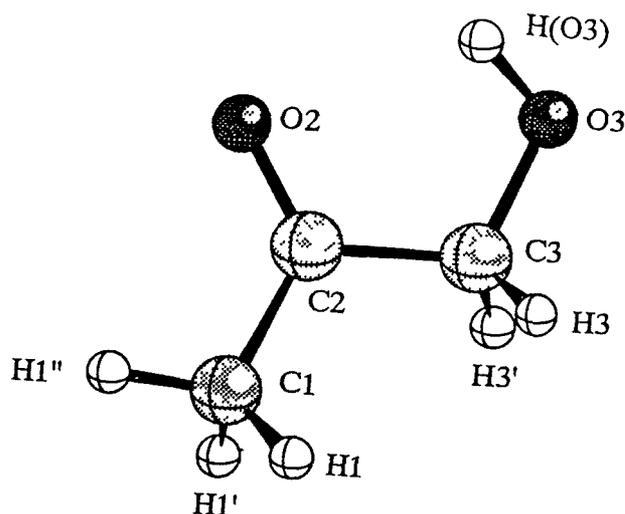
El espacio complementario, definido en coordenadas internas, incluye los enlaces y ángulos de enlace que no participan directamente del proceso químico estudiado. Es en este espacio donde se producen cambios cuando empleamos uno u otro modelo, mientras que el espacio de control se mantiene invariante.

La técnica empleada para localizar el ET es entonces sencilla: se optimiza completamente el espacio complementario manteniendo el espacio de control fijo. Posteriormente se procede de modo inverso, realizando una búsqueda de la ET sobre el espacio de control, manteniendo el complementario fijo. El proceso se repite alternativamente en uno y otro subespacios hasta que se encuentra el ET buscado mediante una caracterización completa de la matriz de segundas derivadas.

Una vez que la geometría del punto estacionario ha sido obtenida se realiza un cálculo final de modos normales, con el fin de caracterizar dicho punto estacionario como un ET: debe poseer una y sólo una frecuencia imaginaria.

## VII.2.2 MODELO DE TRES CARBONOS

El sistema hidroxipropanona/1,2-dihidroxiopropeno se ha estudiado extensamente, tomándolo como modelo base. El tamaño relativamente pequeño de este modelo y el hecho de representar de distinta manera a los dos carbonos del fragmento enediólico han sido los factores que nos han llevado a escogerlo. La numeración que empleamos con este sistema se muestra en la Figura VII.22.



**Figura VII.22** Hidroxipropanona, la forma cetónica del par tautomérico utilizado como modelo del fragmento de la D-Ribulosa-1,5-bifosfato que juega un papel crucial en las reacciones catalizadas por la enzima Rubisco. En la figura se muestra la numeración de los átomos. Los hidrógenos H3 o H3' pueden transferirse al O2. En adelante, llamaremos Ht al hidrógeno transferido y Hn al no transferido.

Hemos empleado el método semiempírico AM1, dada la fiabilidad de éste en reproducir geometrías y su rapidez, para obtener la SEP completa para el proceso químico estudiado. También hemos utilizado el método HF con los

conjuntos de funciones de base 3-21G, 4-31G y 6-31G\*\* para caracterizar las ET obtenidas.

### VII.2.2.1 Estructuras de transición

En la Tabla VII.13 se presentan los resultados obtenidos en los diferentes niveles de cálculo. Se detallan las energías, el único valor propio negativo obtenido de la diagonalización de la Hessiana en cada método y la única frecuencia imaginaria obtenida en el análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso. También se incluyen los parámetros geométricos más importantes definidos en la matriz  $Z$ , las constantes de fuerza asociadas a dichos parámetros geométricos y las correspondientes componentes del vector propio.

La frecuencia imaginaria es esencialmente invariante respecto al nivel de cálculo utilizado, aunque se observa que a medida que aumenta el tamaño del conjunto de funciones de base en los cálculos *ab initio* se incrementa el valor de la frecuencia imaginaria. Se detectan algunas diferencias en las componentes del vector de transición. En los cuatro casos, las componentes dominantes son  $\chi^-$  y  $\rho$ , por tanto el ET está asociado a la transferencia intramolecular de hidrógeno desde C3 a O2.

En los resultados *ab initio*, las fluctuaciones atómicas asociadas con el vector de transición corresponden a un movimiento concertado del grupo de átomos C2-C3-O2-O3-Ht, que describen un anillo pentagonal en el ET (representado en la Figura VII.23). El análisis de modos normales proporciona un valor para la frecuencia imaginaria relativamente bajo, lo que refleja que el movimiento del protón está fuertemente acoplado con los movimientos de los átomos pesados que forman el espacio de control.

El VT proporciona las características esenciales del proceso químico que se estudia. Como puede comprobarse en la Tabla VII.13, hay cuatro contribuciones principales:  $\chi^-$ ,  $\rho$ , C2C3 y C2C3O2C1. En el cálculo 6-31G\*\* también las coordenadas  $\chi^+$  y O3C3C2O2 tienen una importante contribución al VT. El cálculo AM1 y el HF/3-21G proporcionan sólo las dos coordenadas  $\chi^-$  y  $\rho$  como dominantes. Pese a este desacuerdo, la geometría y las constantes de fuerza que

se obtienen con unos métodos y otros son muy semejantes. Por esta razón, el procedimiento AM1 se utilizará para estudiar sistemas más complejos.

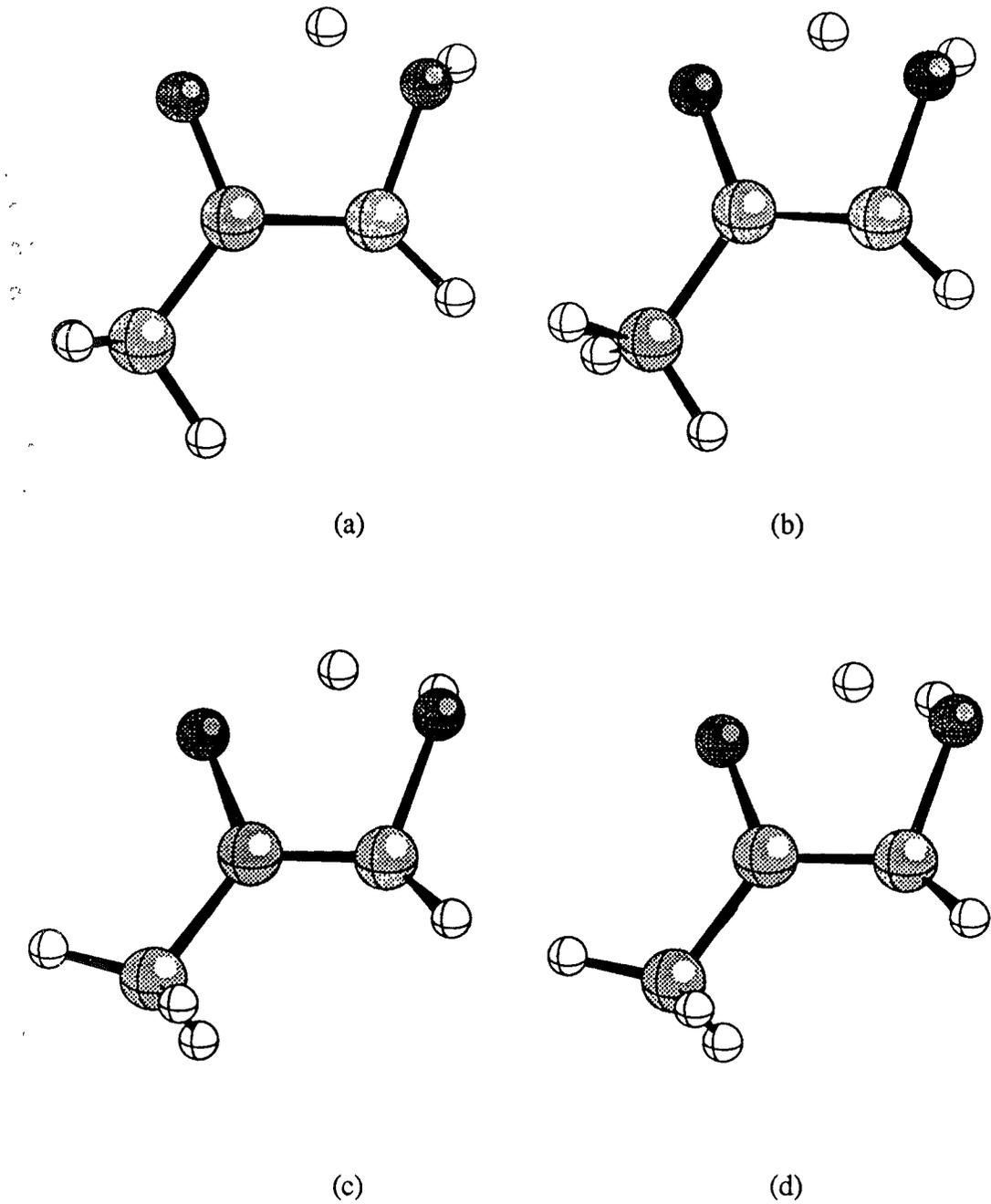
Las componentes correspondientes a las variables  $\chi^-$  y C2C3 se combinan simétricamente en el VT, lo que indica que un acortamiento en el valor de la distancia  $\chi^-$  produce un acortamiento del doble enlace: el movimiento de la proyección de Ht sobre el eje C3O2 acercándose al átomo O2 incrementa el carácter doble del enlace C2C3, mientras que un alejamiento debilita dicho carácter. Por su parte, la componente correspondiente a la variable  $\chi^+$  se combina antisimétricamente con las anteriores (excepto en el resultado HF/3-21G).

**Tabla VII.13 a** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, en unidades atómicas) y componentes del vector propio (C) asociado al único valor propio negativo correspondiente al ET del proceso que lleva de hidroxipropanona a 1,2-dihidroxiopropeno. Se presentan los resultados obtenidos con los métodos AM1 y HF/3-21G.

	AM1			HF/3-21G		
Energía total	-0.054062			-265.232915		
Valor propio	-0.06565			-0.03558		
Frecuencia imaginaria	1292.72i			975.06i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.770	0.06	0.696	0.825	0.13	-0.624
$\chi^+$	2.249	0.78	-0.023	2.246	0.63	-0.050
C2C3	1.386	0.84	0.048	1.353	0.75	-0.051
$\rho$	1.336	0.04	0.708	1.263	0.06	-0.765
O3C3	1.439	0.45	0.056	1.516	0.28	-0.096
C2C3O2	32.17	7.61	-0.037	31.80	6.31	0.067
O3C3C2O2	1.13	0.55	0.006	-4.83	1.05	-0.035
C2C3O2C1	-0.19	0.55	-0.003	2.04	1.02	0.014

**Tabla VII.13 b** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, en unidades atómicas) y componentes del vector propio (C) asociado al único valor propio negativo correspondiente al ET del proceso que lleva de hidroxipropanona a 1,2-dihidroxiopropeno. Se presentan los resultados obtenidos con los métodos HF/4-31G y HF/6-31G\*\*.

	HF/4-31G			HF/6-31G**		
Energía total	-266.294589			-266.692989		
Valor propio	-0.18747			-0.40761		
Frecuencia imaginaria	1167.24i			1257.14i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.825	0.04	0.510	0.854	0.05	0.380
$\chi^+$	2.246	0.57	-0.008	2.221	0.56	-0.117
C2C3	1.353	0.70	0.142	1.359	0.73	0.103
$\rho$	1.263	0.04	0.780	1.205	0.01	0.817
O3C3	1.516	0.33	-0.015	1.482	0.33	0.055
C2C3O2	31.80	6.39	-0.035	31.50	6.30	0.017
O3C3C2O2	-4.83	0.81	-0.002	-4.57	1.05	-0.123
C2C3O2C1	2.04	0.83	-0.241	1.53	0.94	-0.176



**Figura VII.23** Estructura del ET para la tautomería hidroxipropanona/1,2-dihidroxiopropeno, obtenida con el método de cálculo AM1 (a), HF/3-21G (b), HF/4-31G (c) y HF/6-31G\*\* (d).

Los resultados teóricos relativos a las geometrías de los ET que se han obtenido pueden compararse con los datos experimentales de los que se dispone. Las estructuras de un ET análogo (el CABP, para la reacción de carboxilación) y del sustrato unido a la enzima, estudiadas mediante cristalografía de Rayos X de alta resolución, son similares a la del ET calculado por lo que respecta al esqueleto de carbonos y a que su conformación es aproximadamente *cis*. La principal diferencia se da en el valor del ángulo dihedro O3C3C2O2, que representa la rotación alrededor del enlace C2C3 y vale 5° en el ET calculado. Este ángulo vale 53° en el CABP, en el cual el enlace C2C3 es sencillo, y unos 50° en el sustrato, en el cual la enolización aún no se ha producido y dicho enlace también es sencillo. En el ET calculado el enlace C2C3 tiene un carácter intermedio entre doble y sencillo, lo que explica la diferencia observada dado que la rotación alrededor del enlace está más impedida. Salvo esta discrepancia, ambas estructuras son muy similares. Este resultado es interesante ya que las geometrías encontradas por nosotros han sido calculadas *in vacuo*, mientras que las obtenidas experimentalmente se refieren al CABP y al sustrato complejados con la enzima, lo cual representa una nueva confirmación del postulado de la invariancia fundamental de la ET.

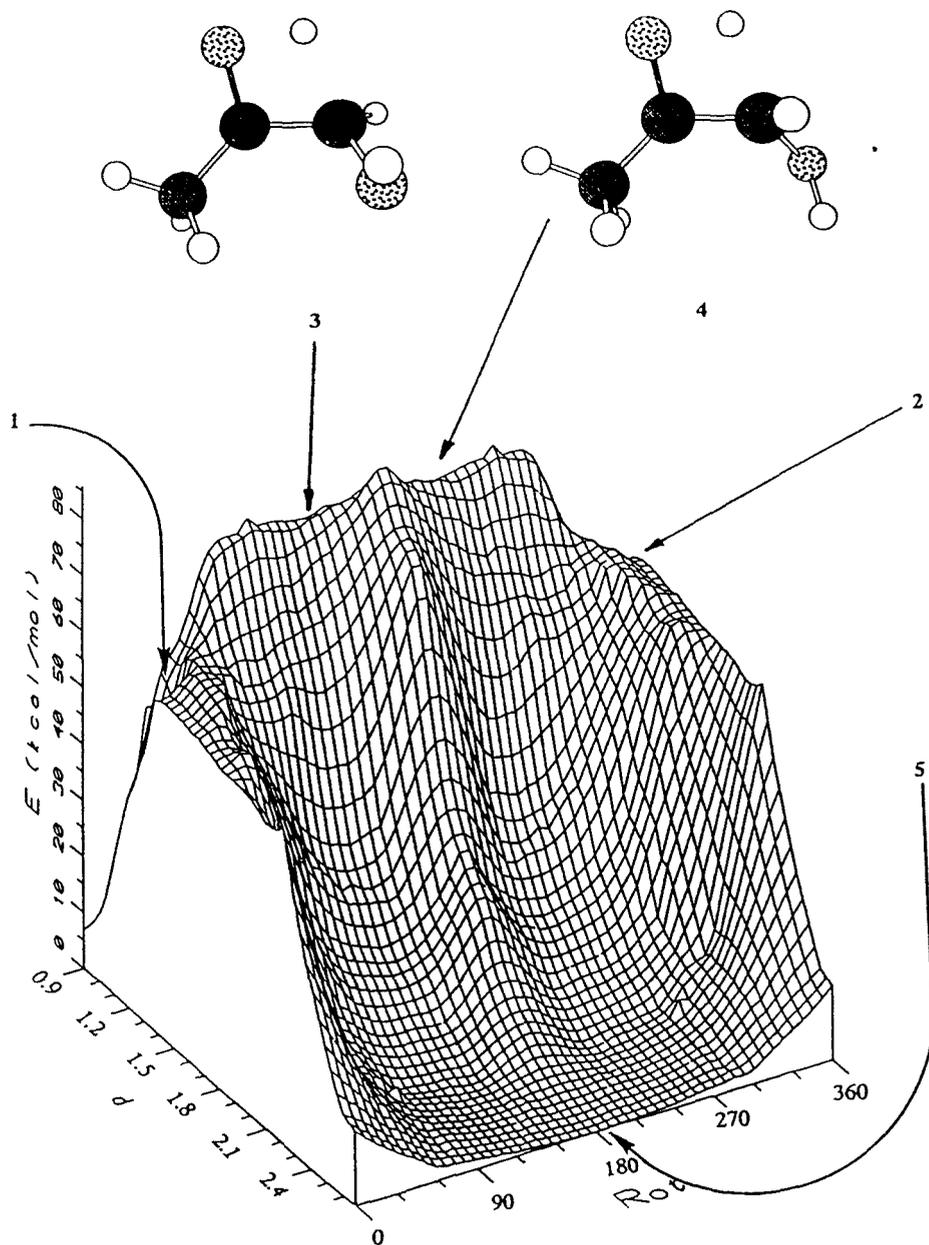
### VII.2.2.2 SEP

Utilizando el método semiempírico AM1 se ha obtenido la SEP completa para el proceso químico que se estudia. Para ello se han elegido como variables la distancia O2Ht que controla el grado de avance del átomo de hidrógeno desde C3 hasta O2 y el ángulo dihedro O2C2C3O3 que controla el cambio conformacional *cis-trans* del doble enlace C2C3. Estas variables se han modificado desde 0.9 hasta 2.8 Å y desde 0° hasta 360°, respectivamente. En cada punto los restantes grados de libertad se han dejado optimizar completamente. Se han calculado de esta manera unos 150 puntos, con el estado electrónico singlete. Se ha realizado así mismo el cálculo de la SEP correspondiente al estado electrónico triplete, encontrándose en todos los puntos correspondientes a ET que la energía del estado triplete es mucho mayor que la del estado singlete, con lo que se concluye que el

estado triplete del sustrato no está directamente implicado en el proceso de enolización.

En la Figura VII.24 se representa la SEP así obtenida, sobre la cual se indica la posición de cinco de los siete puntos estacionarios que se encuentran en esta SEP: Los puntos 1 y 2 corresponden a los ET comentados en el apartado anterior. La única diferencia entre uno y otro es la orientación del hidrógeno hidroxílico unido a O3, pero ambas estructuras tienen asociadas la misma energía, el mismo valor propio negativo y las correspondientes amplitudes en el VT, dada su simetría. Una segunda familia de ET, los puntos 3 y 4, se localizan unas 20 kcal/mol por encima de los anteriores. Su estructura (obtenida con el método AM1) se representa en la figura.

Los ET 3 y 4 tienen asociada una frecuencia imaginaria más alta (unos  $2400i \text{ cm}^{-1}$ ) y corresponden a un movimiento del átomo de hidrógeno sin acoplarse con los movimientos de los átomos pesados. Corresponden a anillos de cuatro miembros en los cuales el átomo Ht está más cerca del oxígeno carbonílico que en los ET anteriores. La geometría, constantes de fuerza, VT, frecuencia imaginaria, energía total y valor propio negativo asociados a estos puntos se detallan en las Tablas VII.14 y VII.15 en los tres niveles de cálculo utilizados en este caso: AM1, HF/4-31G y HF/6-31G\*\*. La estructura calculada con los métodos *ab initio* es similar a la mostrada en la Figura VII.24. El sistema es básicamente *trans*, con una gran carga negativa sobre C2 (aprox. 0.5 unidades atómicas) y una cierta carga positiva sobre C3 (aprox. 0.2 u.a.). Estos ET están relacionados con la conocida propiedad de la Xilulosa 1,5-bifosfato de actuar como inhibidor de la Rubisco; esto se analizará en el apartado VII.2.2.3.



**Figura VII.24** SEP para el proceso que lleva desde hidroxipropanona hasta 1,2-dihidroxipropeno. La SEP se ha obtenido con la metodología AM1 en el estado singlete. La energía relativa, referida al mínimo 5 que corresponde a la forma cetónica *trans* en vacío, se representa en función de la distancia O2Ht ( $d$ , en Å) y del ángulo dihedro O2C2C3O3 (Rot, en grados). En la figura se muestra una vista tridimensional que permite apreciar la topología de la SEP. Se incluyen las estructuras de los ET 3 y 4 y se localizan los puntos estacionarios 1, 2, 3, 4 y 5 sobre la SEP.

**Tabla VII.14 a** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.13 para el estado de transición 3. Se muestran los resultados obtenidos con los niveles de cálculo AM1 y HF/4-31G.

	AM1			HF/4-31G		
Energía total	-0.026070			-266.274347		
Valor propio	-0.38279			-0.37371		
Frecuencia imaginaria	2435.16i			2473.57i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.907	-0.18	0.823	0.896	-0.19	0.845
$\chi^+$	2.178	0.43	-0.261	2.158	0.34	-0.264
C2C3	1.463	0.71	0.169	1.433	0.59	0.167
$\rho$	0.923	0.13	0.206	0.877	0.15	0.180
O3C3	1.384	0.61	-0.004	1.412	0.39	-0.008
C2C3O2	35.29	6.50	-0.034	35.07	5.64	-0.039
O3C3C2O2	139.61	0.03	-0.366	156.89	0.09	-0.357
C2C3O2C1	1.94	0.29	-0.195	0.15	0.43	-0.140

**Tabla VII.14 b** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.13 para el estado de transición 3. Se muestran los resultados obtenidos con el nivel de cálculo HF/6-31G\*\*.

HF/6-31G**			
Energía total	-266.687136		
Valor propio	-0.34474		
Frecuencia imaginaria	2404.41i		
	G	F	C
$\chi^-$	0.896	-0.18	0.861
$\chi^+$	2.155	0.41	-0.255
C2C3	1.443	0.59	0.148
$\rho$	0.814	0.16	0.177
O3C3	1.392	0.43	-0.011
C2C3O2	34.11	6.40	-0.021
O3C3C2O2	156.05	0.08	-0.339
C2C3O2C1	0.28	0.43	-0.135

Tabla VII.15 a Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.13 para el estado de transición 4. Se muestran los resultados obtenidos con los niveles de cálculo AM1 y HF/4-31G.

	AM1			HF/4-31G		
Energía total	-0.025671			-266.269108		
Valor propio	-0.49503			-0.42017		
Frecuencia imaginaria	2452.98i			2592.39i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.908	-0.18	0.867	0.911	-0.20	0.836
$\chi^+$	2.179	0.43	-0.230	2.161	0.31	-0.281
C2C3	1.462	0.60	0.167	1.424	0.58	0.184
$\rho$	0.923	0.12	0.206	0.882	0.14	0.187
O3C3	1.373	0.63	0.013	1.405	0.40	-0.008
C2C3O2	35.24	6.93	-0.051	35.06	5.28	-0.052
O3C3C2O2	231.82	0.03	0.238	207.90	0.09	0.350
C2C3O2C1	-2.45	0.33	0.150	-1.24	0.43	0.146

**Tabla VII.15 b** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.13 para el estado de transición 4. Se muestran los resultados obtenidos con el nivel de cálculo HF/6-31G\*\*.

HF/6-31G**			
Energía total	-266.683502		
Valor propio	-0.38433		
Frecuencia imaginaria	2513.67i		
	G	F	C
$\chi^-$	0.907	-0.19	0.853
$\chi^+$	2.157	0.39	-0.267
C2C3	1.436	0.56	0.166
$\rho$	0.816	0.16	0.184
O3C3	1.387	0.43	-0.010
C2C3O2	34.08	6.11	-0.030
O3C3C2O2	208.33	0.09	0.335
C2C3O2C1	-1.24	0.44	0.142

El punto 5 corresponde a la cetona en su estado fundamental, que es la estructura que se toma como referencia para construir esta SEP. Partiendo de este punto 5, hay dos canales para una transferencia directa del hidrógeno a través de los ET 3 y 4.

El desplazamiento desde las estructuras 3 y 4 hacia el lado de los enodios termina en dos puntos estacionarios que tienen un valor propio negativo a lo largo de la dirección perpendicular a la del descenso. Estos nuevos puntos de silla abren canales para moverse desde cada ET hacia los dos productos enodiólicos: el *trans* (ángulo dihedral de 180°), 7, y el *cis* (ángulo dihedral de 0° o de 360°), 6. Estos puntos en los que hay una bifurcación se han encontrado en otros procesos, como el estudio por parte de nuestro grupo de la reacción de Meyer-Schuster<sup>67</sup> o en otras reacciones químicas<sup>68-76</sup>.

En las Figuras VII.25 y VII.26 se representa la SEP vista desde el punto donde se encuentra la estructura de la cetona y desde el punto donde se encuentran las estructuras de los enoles, respectivamente.

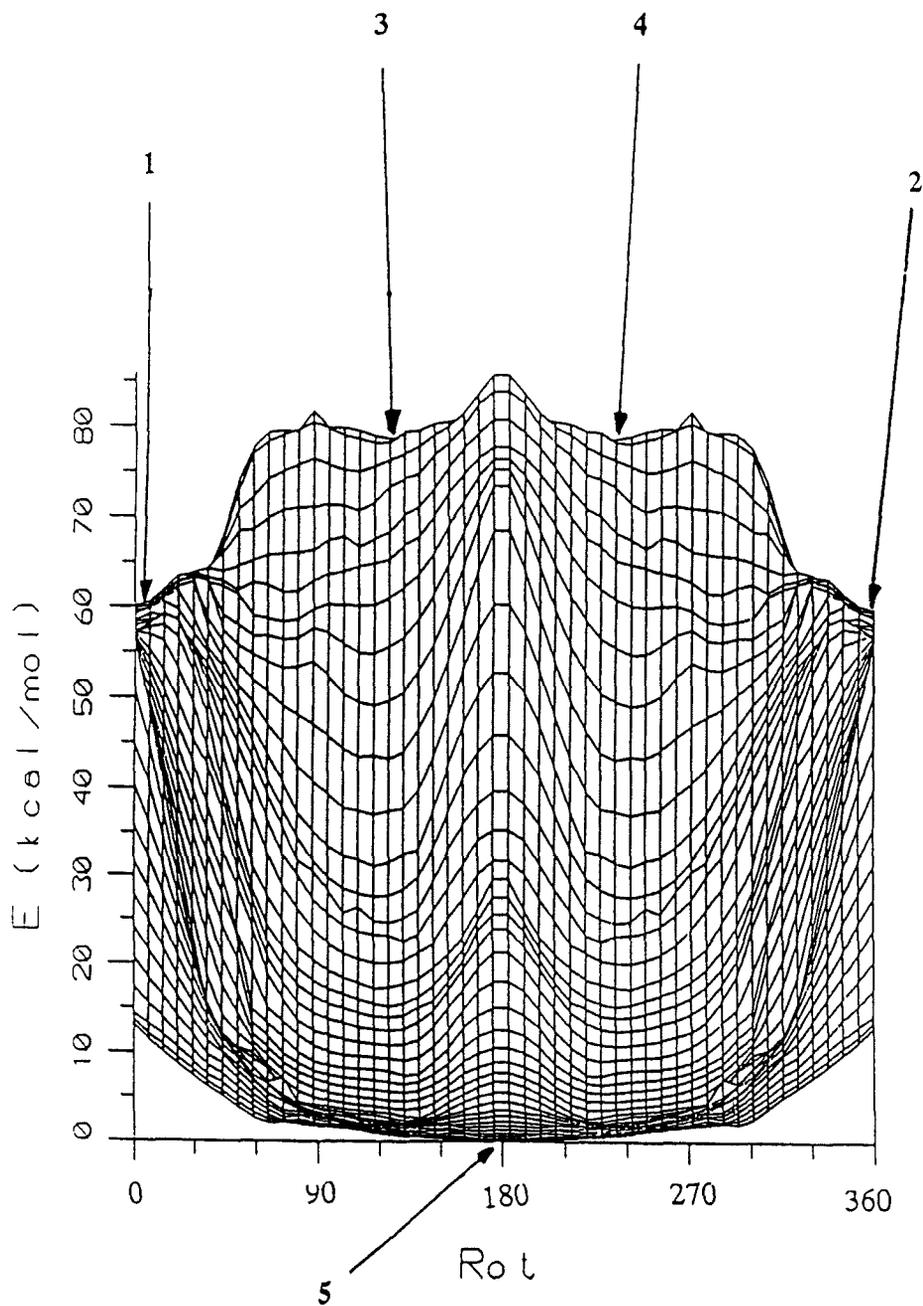
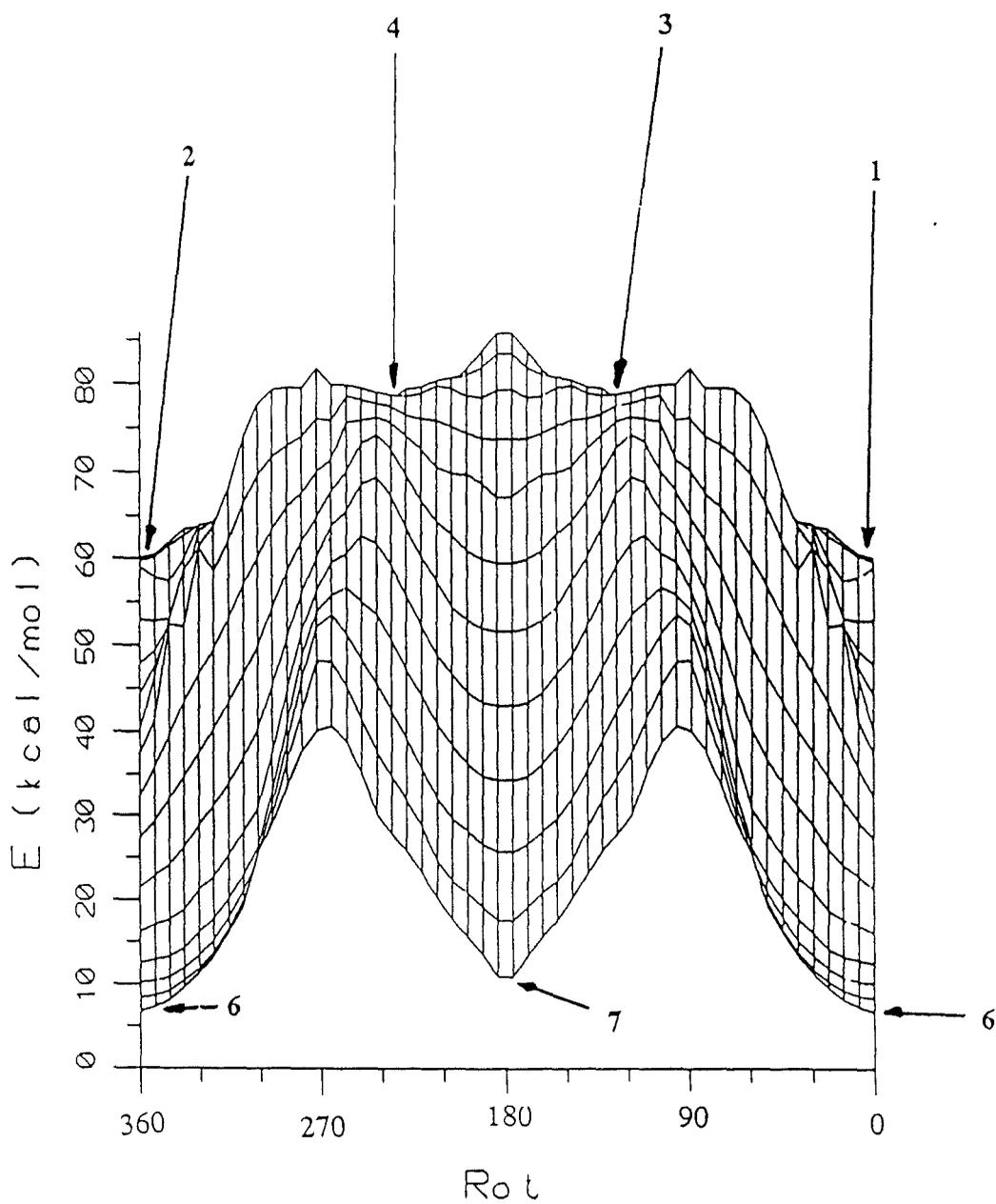
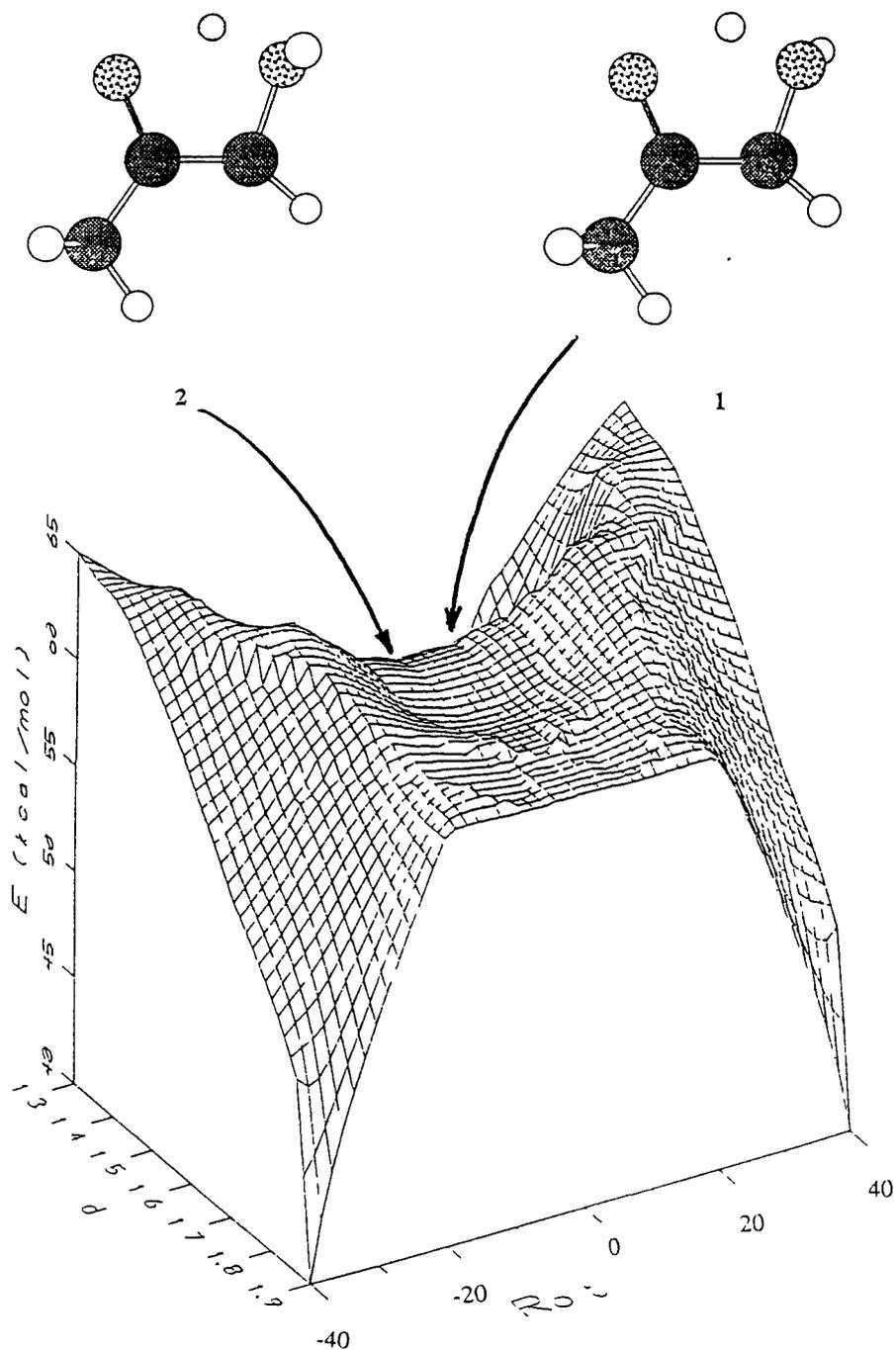


Figura VII.25 SEP para el proceso bajo estudio vista desde el lado de la cetona. Se localizan desde esta perspectiva los puntos estacionarios 1, 2, 3, 4 y 5.



**Figura VII.26** SEP para el proceso bajo estudio vista desde el lado de los enodios. Se localizan desde esta perspectiva los puntos estacionarios 1, 2, 3, 4, 6 y 7.



**Figura VII.27** Región de la SEP en la que se encuentran los ET 1 y 2. La estructura de estos ET se indica, así como su localización sobre la SEP

La energía de activación a lo largo de los ET 1 y 2 es, medida desde la cetona 5 en vacío, de unas 60 kcal/mol. Este valor es demasiado elevado pero la enorme deformación llevada a cabo por la enzima cuando se une al sustrato lleva dicho valor a una cota mucho menor. Es decir, en el centro activo no se une el sustrato en su conformación más relajada, sino que debe unirse en una geometría deformada, cercana a la del ET, para que la reacción pueda transcurrir. Esa geometría correspondería con un punto de la SEP cercano al punto ocupado por el ET, es decir, con la del complejo precursor.

Si examinamos con más detalle la zona de la SEP en la que se encuentra el ET (mostrada en la Figura VII.27, junto con las estructuras y localizaciones de los ET 1 y 2) se observa que hay una zona plana en la región entre la forma cetónica *cis* y el ET. Una elevación separa esta meseta de los conformeros *trans*.

Bajando desde los ET se llega al mínimo de la SEP correspondiente al enodiol *cis* (6). En la dirección opuesta se llega a una forma cetónica *cis* inestable respecto de la forma cetónica *trans*, que es el punto estacionario (5) y corresponde al estado de mínima energía del modelo en el vacío.

Hemos estimado los efectos del solvente sobre el proceso mediante los cálculos de las energías de solvatación para los puntos estacionarios: reactivos, ET y productos, utilizando el programa AMSOL. Los resultados obtenidos, que se detallan en la Tabla VII.16, inciden en otro aspecto de la invariancia del ET: la invariancia de la posición del ET en la coordenada de reacción. El valor del grado de avance de la reacción en el ET puede calcularse como:

$$\lambda^{ET} = \frac{1}{2} \frac{E^{ET} - E_{enodiol}}{E^{ET} - E_{cetona}} \quad (\text{VII.4})$$

Utilizando en VII.4 las energías en fase gas y en solución, en ambos casos se obtiene para el grado de avance de la reacción un valor  $\lambda^{TS}=0.44$ , con lo cual el grado de avance se demuestra invariante respecto a este tipo de efectos del solvente.

**Tabla VII.16** Resultados obtenidos con el programa AMSOL respecto a los efectos del solvente sobre el proceso estudiado. Las energías obtenidas para la cetona, el ET y el enodiol se dan en kcal/mol.

	Energía total en fase gas.	Energía libre de solvatación.	Energía total en solución.
Cetona	-93.84	-8.37	-102.21
ET	-33.83	-13.45	-47.28
Enodiol	-86.10	-9.35	-95.45

### VII.2.2.3 Inhibición

Estrechamente relacionado con la etapa de enolización de los procesos catalizados por la Rubisco se encuentra el fenómeno de inactivación de la enzima durante la catálisis. Este fenómeno se detecta cuando se estudia la actividad catalítica de la Rubisco *in vitro*, y consiste en una disminución de la velocidad de catálisis con un tiempo de vida media de varios minutos<sup>77-83</sup>. Esta pérdida de actividad es debida a productos de isomerización del sustrato que se forman durante la catálisis<sup>84-87</sup>. De hecho se ha comprobado que uno de los productos responsables de esta inactivación es la Xilulosa-1,5-bifosfato, un compuesto del que ya se sabía que podía actuar como inhibidor de la Rubisco<sup>88</sup>, y se postula que otros productos responsables de esta inactivación son las sustancias 3-ceto-arabinitol-1,5-bifosfato y 3-ceto-ribitol-1,5-bifosfato<sup>84</sup>.

Este fenómeno no ocurre *in vivo* o, si ocurre, existe algún mecanismo que se encarga de revertir el efecto. De hecho, recientes estudios experimentales indican que la enzima Rubisco Activasa previene y revierte *in vivo* el declive en la actividad de la Rubisco observado *in vitro*<sup>81</sup>.

Puesto que en nuestro estudio de la etapa de enolización se han obtenido diferentes ET que pueden estar relacionados con la propiedad inhibidora de la Xilulosa, decidimos ampliarlo para tratar de dar una explicación desde el punto de vista teórico al fenómeno de la inactivación de la enzima. Aquí presentaremos los

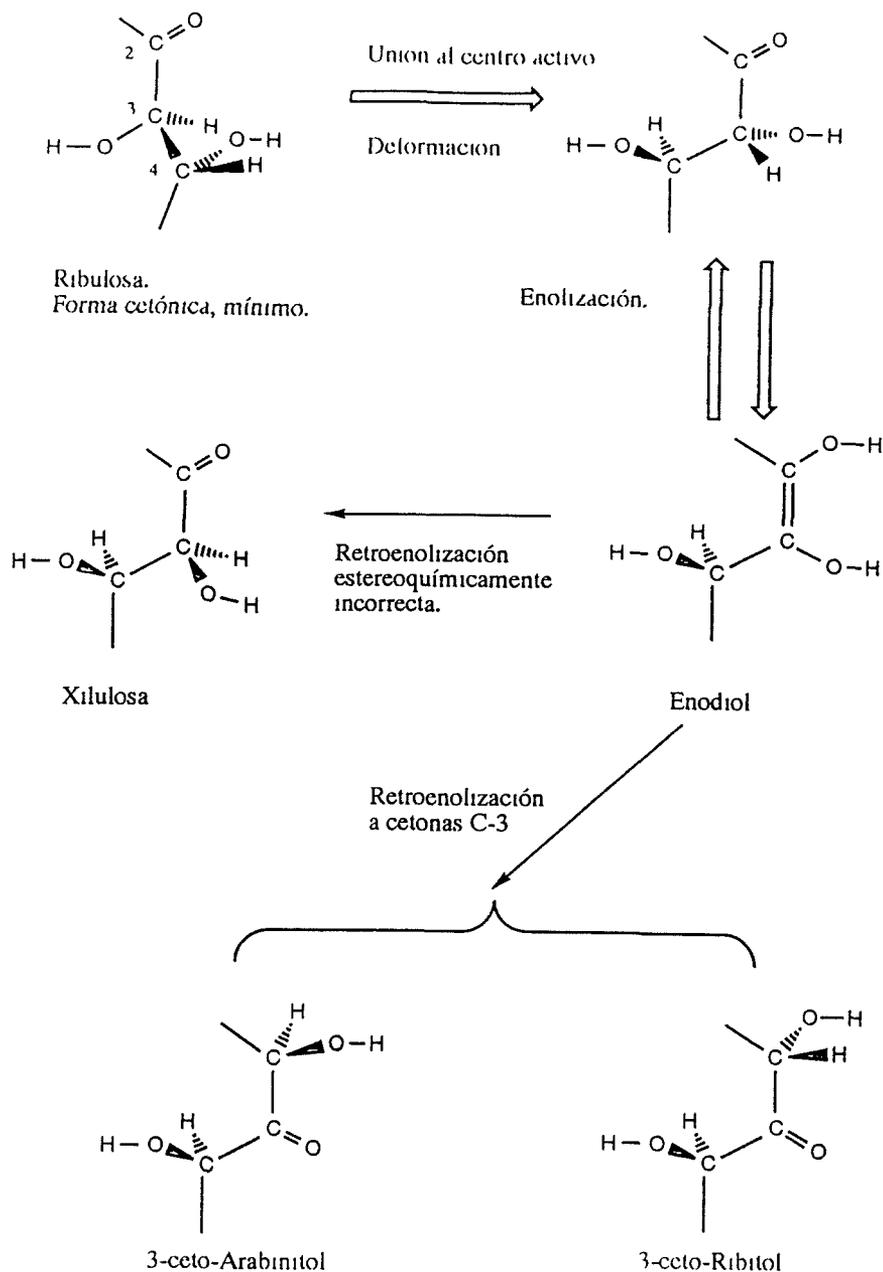
resultados obtenidos, que ponen de manifiesto la relación entre la inactivación y la enolización.

En el Esquema VII.2 presentamos los inhibidores potenciales de la actividad de la Rubisco. Como puede apreciarse en él, todas las vías que llevan a un inhibidor pasan formalmente a través del enodiol o, al menos, de una estructura cercana al enodiol. Por tanto, resulta claro que la inactivación está relacionada con los procesos químicos de enolización y retroenolización. La formación de la Xilulosa es más probable que la del resto de inhibidores, dado que puede obtenerse, antes de que se forme el mismo enodiol, si desde el ET de enolización o del complejo precursor de dicho ET se produce un regreso del Ht hacia C3 de modo que la estereoquímica final en este centro sea distinta de la inicial: en la Ribulosa la estereoquímica del C3 es D y en la Xilulosa es L. Este hecho explica por qué la Xilulosa se encuentra experimentalmente en mucha mayor proporción que los otros dos inhibidores.

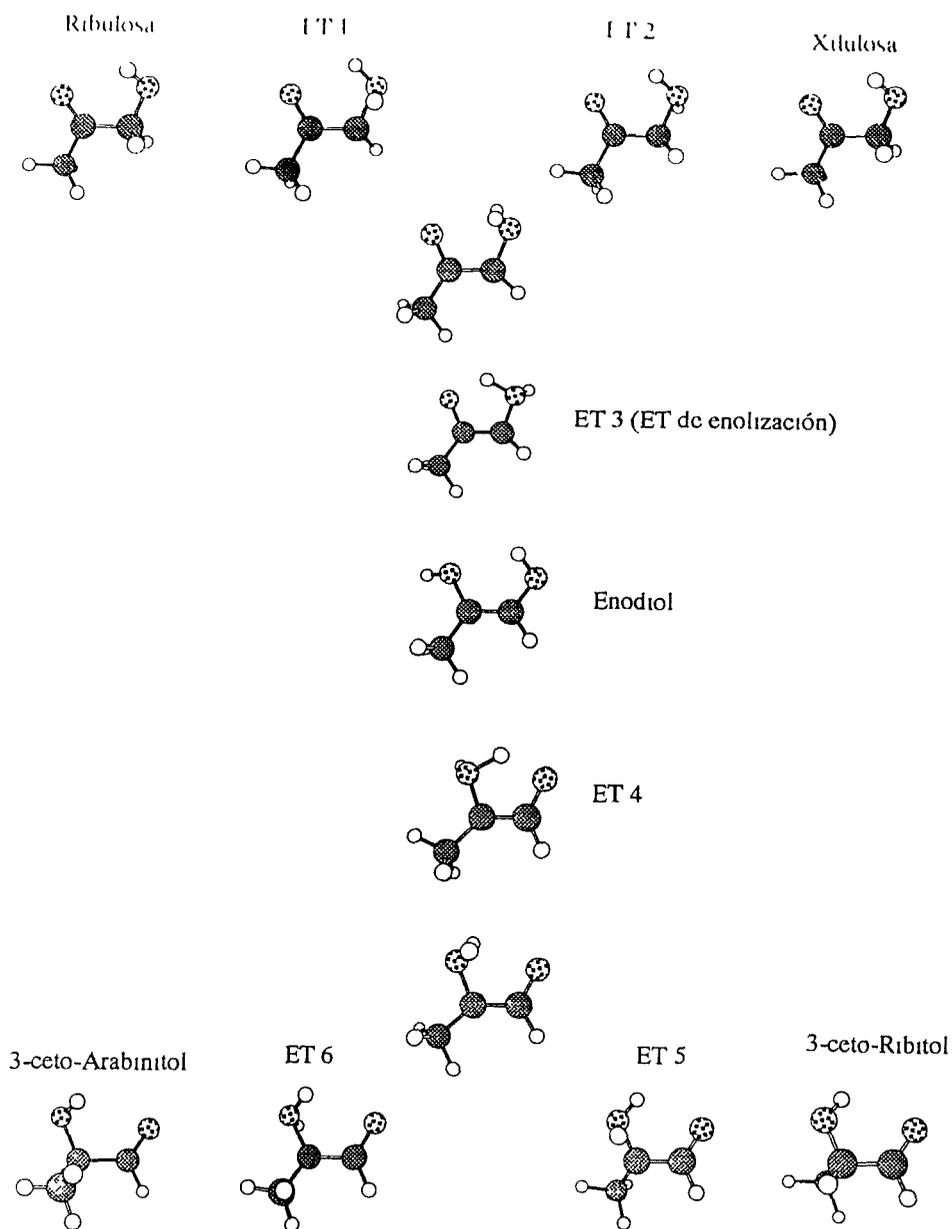
Para la formación de la cetonas en el carbono tres se necesita formalmente la formación previa del enodiol y, a partir de éste, una retroenolización en la que sea el hidrógeno de O3 el que vaya al carbono C2. Su formación será por tanto más difícil, dado que una vez formado el complejo sucesor del ET de enolización (que, como veremos más adelante, coincide con el complejo precursor de carboxilación y de oxigenación) el camino más probable será el de la reacción de carboxilación u oxigenación. Si esta reacción no se produce, la retroenolización aún tiene dos posibilidades: volver a la cetona en C2 o ir a la cetona en C3.

Hemos realizado un primer estudio teórico de estas tautomerizaciones utilizando el modelo de tres carbonos y la metodología semiempírica AM1. Con ello, hemos caracterizado ET para todos los procesos y hemos encontrado dos puntos estacionarios que corresponden formalmente a los alcoholes protonados en C2 y en C3. Las geometrías de todos los puntos estacionarios encontrados se detallan en la Figura VII.28, ordenándolos según la secuencia indicada en el Esquema VII.2.

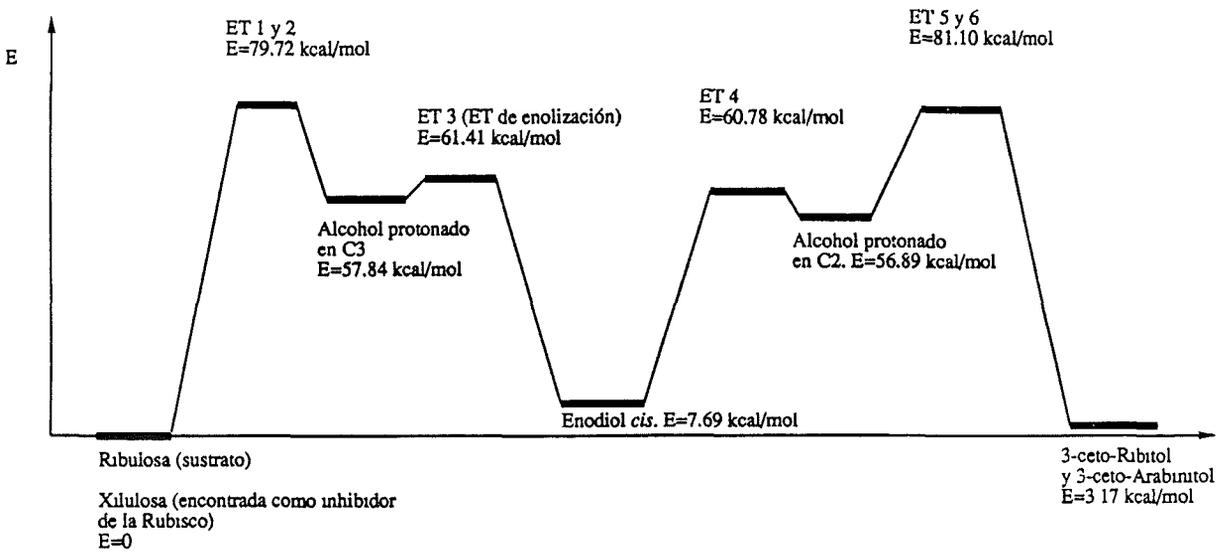
Los datos estructurales y dinámicos para los ET localizados se indican en la Tabla VII.17. Las energías relativas de todos los puntos estacionarios se indican en el Esquema VII.3.



**Esquema VII.2** Mecanismo por el que puede explicarse la formación de los inhibidores de la actividad de la Rubisco experimentalmente detectados. Todos los caminos implican cambios químicos cetó-enólicos.



**Figura VII.28** Puntos estacionarios localizados para los procesos relacionados con la inhibición de la Rubisco.



**Esquema VII.3** Diagrama energético en el que se incluyen los puntos estacionarios localizados para los procesos de inhibición.

**Tabla VII.17 a** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, en unidades atómicas) y componentes del vector propio (C) asociado al único valor propio negativo correspondiente a los ET de los procesos relacionados con el fenómeno de la inhibición. Los resultados se han obtenido con el métodos AM1. Se presentan los valores correspondientes a los ET 1 y 2.

	1			2		
Energía total	-0.024885			-0.024847		
Valor propio	-2.80266			-0.22530		
Frecuencia imaginaria	1871.61i			1873.56i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	2.424	0.03	-0.037	2.425	0.03	0.106
$\chi^+$	2.332	0.83	0.015	2.332	0.82	-0.004
C2C3	1.441	0.77	0.043	1.441	0.77	0.075
$\rho$	1.439	0.11	-0.253	1.438	0.11	-0.906
O3C3	1.483	0.33	0.128	1.483	0.33	0.096
C2C3O2	27.72	7.43	-0.089	27.74	7.43	-0.003
O3C3C2O2	-9.26	-0.15	-0.411	8.89	-0.15	0.322
C2C3O2C1	2.07	0.06	-0.386	-2.46	0.06	0.059

**Tabla VII.17 b** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.17 a para el ET 3.

3			
Energía total	-0.054062		
Valor propio	-0.06565		
Frecuencia imaginaria	1292.72i		
	G	F	C
$\chi^-$	0.770	0.06	0.696
$\chi^+$	2.249	0.78	-0.023
C2C3	1.386	0.84	0.048
$\rho$	1.336	0.04	0.708
O3C3	1.439	0.45	0.056
C2C3O2	32.17	7.61	-0.037
O3C3C2O2	1.13	0.55	0.006
C2C3O2C1	-0.19	0.55	-0.003

La definición de las coordenadas de control cambia a partir del ET 4, ya que el proceso ahora es el intercambio de un átomo de hidrógeno (al que seguimos llamando Ht) entre O3 y C2, y no entre C3 y O2 como en los anteriores. Las nuevas definiciones para  $\chi^-$ ,  $\chi^+$  y  $\rho$  son:

$$\chi^+ = \frac{(R_{O3} - R_{C2})(R_{O3} - R_{C2})}{|R_{O3} - R_{C2}|} = (R_{O3} - R_{C2})n_{O3C2} \quad (\text{VII.5})$$

$$\chi^- = (R_{Ht} - R_{O3})n_{O3C2} \quad (\text{VII.6})$$

$$\rho = \sqrt{\left((R_{Ht} - R_{O3})n_{O3Ht}\right)^2 - \left((R_{Ht} - R_{O3})n_{O3C2}\right)^2} \quad (\text{VII.7})$$

**Tabla VII.17 c** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.17 a para los ET 4 y 5.

	4			5		
Energía total	-0.055065			-0.022647		
Valor propio	-0.09101			-0.55364		
Frecuencia imaginaria	1370.20i			1884.92i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.766	0.05	0.741	2.363	0.03	-0.293
$\chi^+$	2.253	0.91	-0.053	2.352	0.49	0.000
$\rho$	1.329	0.04	0.655	1.450	0.13	0.338
O3C3	1.298	1.08	-0.107	1.244	1.15	0.110
C2O3C3	34.11	4.79	0.025	31.64	-0.30	-0.032
O2C2C3O3	-0.894	0.50	0.008	7.01	-0.15	-0.610
C1C2C3O3	180.71	0.10	-0.006	144.47	0.20	-0.057

**Tabla VII.17 d** Datos estructurales y dinámicos definidos como en la Tabla VII.17 a para el ET 6.

	6		
Energía total	-0.022651		
Valor propio	-0.17259		
Frecuencia imaginaria	1885.53i		
	G	F	C
$\chi^-$	2.365	0.03	0.234
$\chi^+$	2.352	0.49	0.066
$\rho$	1.450	0.13	-0.864
O3C3	1.244	1.15	-0.054
C2O3C3	31.64	-0.31	0.022
O2C2C3O3	-7.04	-0.15	-0.266
C1C2C3O3	215.53	0.20	-0.034

Con estos resultados puede darse una explicación teórica de la formación de inhibidores durante el proceso catalítico *in vitro*. Aunque seguimos trabajando en este extremo empleando métodos que representan mejor las interacciones de hidrógeno, puede asegurarse que la inactivación de la enzima está relacionada con la peculiar conformación que los ET del paso de enolización, precursores y sucesores tienen en el centro activo de la Rubisco.

### VII.2.3 MODELO DE CINCO CARBONOS

El sistema 3,4-dihidroxi-2-pentanona/2,3,4-trihidroxi-2-penteno se ha estudiado con el objeto de comprobar la independencia de los resultados obtenidos con el modelo de tres carbonos respecto del tamaño del modelo molecular. La numeración sigue la tendencia utilizada en el modelo de tres carbonos, con lo cual los nuevos átomos son C4, H4, O4 y H(O4); C5 y los tres hidrógenos unidos a él: H5, H5' y H5".

Estos nuevos átomos se añaden al espacio complementario, con lo cual el espacio de control se mantiene con los mismos átomos que en el caso anterior. Por esa razón, no es de esperar que se produzcan cambios sustanciales en la naturaleza de las ET.

Los niveles de cálculo empleados han sido el semiempírico AM1 y el *ab initio* HF con el conjunto de funciones de base 3-21G.

Se han encontrado para este modelo ET equivalentes a los encontrados en el modelo de tres carbonos. En la Tabla VII.18 se indican los datos estructurales y dinámicos relativos a estas ET obtenidos con los dos niveles de cálculo empleados.

Como puede apreciarse, el valor de la frecuencia imaginaria es en este caso ligeramente dependiente del método de cálculo empleado, resultando menor la obtenida con el método HF. Sin embargo, las variables geométricas y las componentes del VT, así como las constantes de fuerza, son esencialmente invariantes respecto al nivel de cálculo.

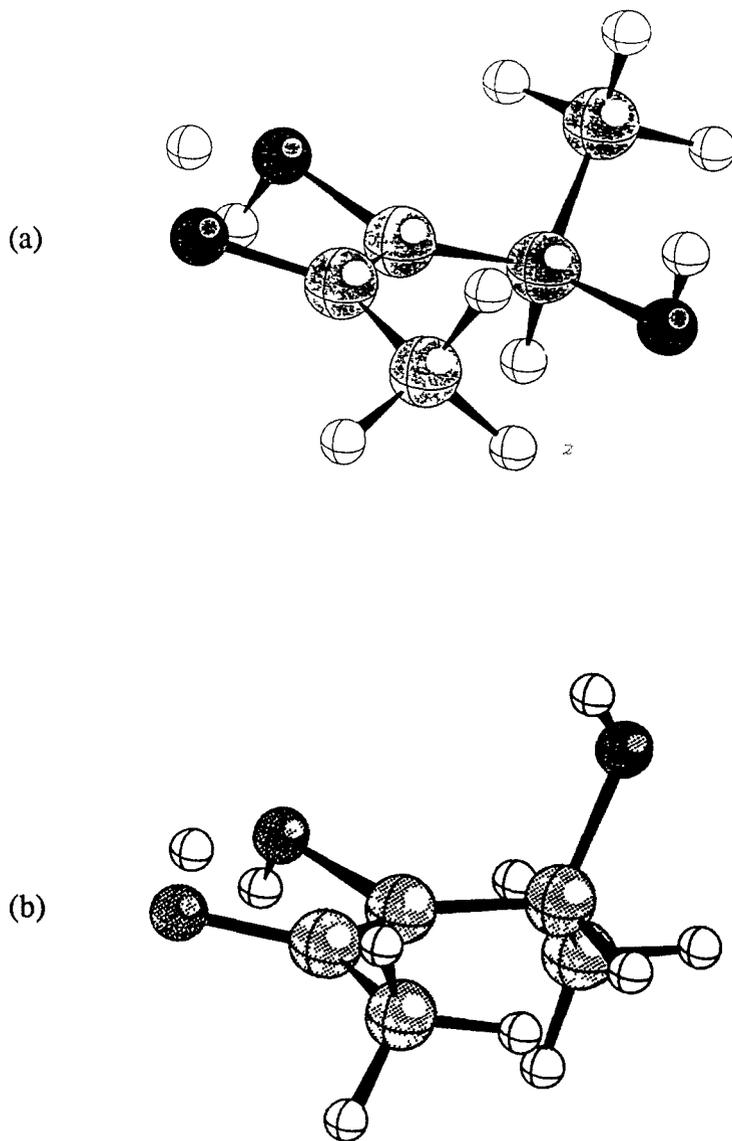
Si comparamos los resultados obtenidos con los presentados en la Tabla VII.13 para el modelo molecular de tres carbonos, queda patente la esencial independencia de geometrías, valor de la frecuencia imaginaria, componentes del

VT y constantes de fuerza respecto del modelo molecular utilizado. Este resultado se puede generalizar. De hecho, la estereoquímica obtenida en el modelo pequeño se respeta en el modelo grande, como puede observarse en la Figura VII.29.

Puede apreciarse que existe una diferencia en la orientación de los grupos unidos a C4, que varía según el método de cálculo utilizado. Esto es consecuencia de que el enlace C3C4 es sencillo y, por tanto, el giro a su alrededor está permitido.

**Tabla VII.18** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, en unidades atómicas) y componentes del vector propio (C) asociado al único valor propio negativo correspondiente al ET del proceso que lleva de 3,4-dihidroxi-2-pentanona a 2,3,4-trihidroxi-2-penteno. Se presentan los resultados obtenidos con los métodos AM1 y HF/3-21G.

	AM1			HF/3-21G		
Energía total	-0.146860			-417.326853		
Valor propio	-0.06619			-0.06590		
Frecuencia imaginaria	1324.47i			1064.80i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	0.759	0.06	0.697	0.733	0.08	0.419
$\chi^+$	2.250	0.78	-0.020	2.270	0.58	-0.031
C2C3	1.392	0.84	0.051	1.350	0.66	0.049
$\rho$	1.328	0.04	0.709	1.153	0.05	0.872
O3C3	1.444	0.45	0.057	1.524	0.38	0.034
C2C3O2	32.11	7.67	-0.039	31.12	6.65	-0.045
O3C3C2O2	0.62	0.54	0.025	1.66	0.67	-0.035
C2C3O2C1	0.00	0.55	-0.004	0.18	0.73	-0.008



**Figura VII.29** Estructura del ET para la tautomería 2,3-dihidroxi-2-pentanona/2,3,4-trihidroxi-2-penteno, obtenida con el método de cálculo AM1 (a) y HF/3-21G (b).

También en este modelo puede realizarse una comparación de la estructura calculada para el ET con el fragmento correspondiente del ET análogo para la reacción de carboxilación, el CABP, y las conclusiones obtenidas son las mismas que en el caso del modelo de tres carbonos: una importante similitud en la estructura de la cadena de carbonos y una diferencia grande en el ángulo dihedro que describe la rotación alrededor del enlace C2C3.

#### VII.2.4 MODELO DE DOS CARBONOS

Dado que en el proceso de enolización se desarrollan cargas negativas sobre algunos de los átomos implicados, la inclusión de funciones difusas en el conjunto de funciones de base podría modificar los resultados. Con objeto de comprobar este extremo, hemos analizado un sistema molecular más pequeño (el par tautomérico hidroxietanal/1,2-dihidroxietileno) que permite unos tiempos de CPU razonables con un elevado nivel de cálculo. La numeración empleada en este modelo es análoga a la utilizada en los anteriores.

El método utilizado ha sido el HF/6-31++G\*\*. Una vez que la geometría del ET ha sido encontrada se realiza un análisis de modos normales con objeto de comprobar que la estructura encontrada tiene asociada una y sólo una frecuencia imaginaria.

Se ha encontrado para este modelo un ET equivalente a los encontrados en el modelo de tres carbonos y el de cinco. En la Tabla VII.19 se indican los datos estructurales y dinámicos relativos a esta ET.

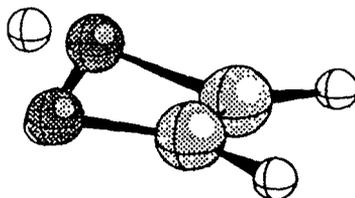
**Tabla VII.19** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos ( $G$ , distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza ( $F$ , en unidades atómicas) y componentes del vector propio ( $C$ ) asociado al único valor propio negativo correspondiente al ET del proceso que lleva de hidroxietanal a 1,2-dihidroxietileno. Se presentan los resultados obtenidos con el método HF/6-31++G\*\*.

HF/6-31++G**			
Energía total	-278.6691		
Valor propio	-0.10918		
Frecuencia imaginaria	278.6691i		
	G	F	C
$\chi^-$	0.956	0.42	-0.524
$\chi^+$	2.259	1.06	-0.192
C2C3	1.356	0.85	0.000
$\rho$	1.408	0.04	-0.365
O3C3	1.523	0.23	0.307
C2C3O2	28.71	9.59	0.052
O3C3C2O2	-0.53	1.01	-0.059
C2C3O2H2	0.91	1.02	0.016

Como puede apreciarse, el valor de la frecuencia imaginaria es en este caso diferente del obtenido con otros modelos y niveles de cálculo. Sin embargo, las variables geométricas y las componentes del VT, así como las constantes de fuerza, son semejantes.

Si comparamos los resultados obtenidos con los presentados en la Tabla VII.13 para el modelo molecular de tres carbonos, queda patente la esencial independencia de geometrías, componentes del VT y constantes de fuerza respecto del modelo molecular y nivel de cálculo utilizado.

En la Figura VII.30 se indica la geometría del ET encontrado. Como puede verse, en lo comparable es equivalente a las encontradas en los otros modelos moleculares con otros niveles de cálculo.



**Figura VII.30** Estructura del ET para la tautomería hidroxietanal/1,2-dihidroxi-etileno, obtenida con el método de cálculo HF/6-31++G\*\*.

## VII.2.5 MODELO CON INCLUSIÓN DE GRUPOS FOSFATO

Una comprobación final de la bondad de los resultados obtenidos con los modelos moleculares que representan al sustrato real puede hacerse mediante el uso en los cálculos del propio sustrato: la D-Ribulosa-1,5-bifosfato. La única salvedad es que en el modelo protonamos los grupos fosfato, con lo cual la molécula modelo es el ácido 3,4-dihidroxi-2-pentanona-1,5-bifosfórico.

El gran tamaño de este modelo nos ha inclinado a utilizar con él la metodología semiempírica AM1, ya que como hemos visto reproduce de manera suficientemente aproximada la geometría y componentes del VT.

Se ha encontrado para este modelo un ET equivalente a los encontrados en los modelos anteriores. En la Tabla VII.20 se indican los datos estructurales y dinámicos relativos a esta ET.

**Tabla VII.20** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ) obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso, parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, en unidades atómicas) y componentes del vector propio (C) asociado al único valor propio negativo correspondiente al ET del proceso que lleva de ácido 3,4-dihidroxi-2-pentanona-1,5-bifosfórico a ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico. Se presentan los resultados obtenidos con el método AM1.

AM1			
Energía total	-0.656667		
Valor propio	-0.08267		
Frecuencia imaginaria	1532.19i		
	G	F	C
$\chi^-$	0.723	0.03	0.688
$\chi^+$	2.247	0.75	-0.030
C2C3	1.384	0.86	0.046
$\rho$	1.295	0.03	0.715
O3C3	1.443	0.45	0.073
C2C3O2	32.39	7.32	-0.035
O3C3C2O2	1.25	0.49	0.019
C2C3O2C1	0.67	0.52	-0.011

Como puede apreciarse, el valor de la frecuencia imaginaria es en este caso similar al obtenido en los modelos de tres y cinco carbonos, aunque distinto del obtenido con el modelo de dos carbonos y el nivel de cálculo HF/6-31++G\*\*.

Si comparamos los resultados obtenidos con los presentados en la Tabla VII.13 para el modelo molecular de tres carbonos, queda patente la esencial

independencia de geometrías, componentes del VT y constantes de fuerza respecto del modelo molecular y nivel de cálculo utilizado.

En la Figura VII.31 se indica la geometría del ET encontrado. Como puede verse, en lo comparable es equivalente a las encontradas en los otros modelos moleculares y niveles de cálculo.

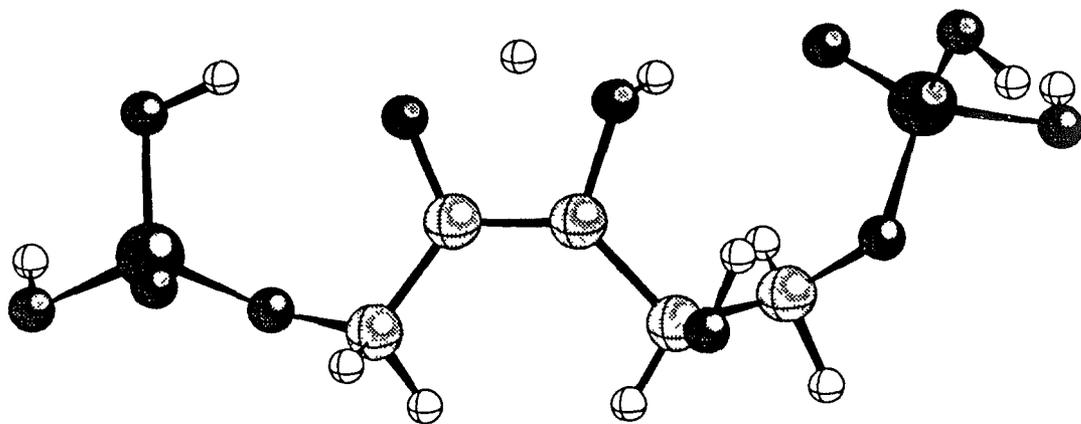


Figura VII.31 Estructura del ET para la tautomería ácido 3,4-dihidroxi-2-pentanona-1,5-bisfosfórico/ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bisfosfórico, obtenida con el método de cálculo AM1.

## VII.2.6 CONCLUSIONES

En todos los modelos moleculares utilizados hemos encontrado estructuras de transición correspondientes al proceso intramolecular de transferencia protónica. Estas ET muestran unas geometrías y un VT esencialmente independientes del nivel de cálculo utilizado. La posibilidad de una transferencia de hidrógeno intramolecular simplifica el complicado conjunto de pasos propuesto en la literatura y lo reemplaza por un único paso. Además, la controversia entre estudios cristalográficos, estudios de mutagénesis dirigida y estudios cinéticos sobre la base capaz de arrancar un protón de C3 queda superada con este proceso intrínseco que no necesita la participación directa de grupos externos al sustrato<sup>9</sup>.

Las ET tienen forma de anillos pentagonales y se caracterizan por un movimiento colectivo del conjunto de átomos Ht, C2, C3, O2 y O3. De las geometrías y VT obtenidos se deduce que en el proceso de transferencia desde C3 hasta O2 el átomo O3 juega un papel esencial, de tal manera que el átomo Ht se apoya en este oxígeno en su movimiento desde el átomo C3 hasta el átomo C2. Así mismo, la rotación alrededor del enlace C2C3 se produce acoplada a la transferencia de hidrógeno.

De la similitud en la estructura del esqueleto de carbonos entre las ET obtenidas para la enolización y el compuesto CABP se deduce que el centro activo de la Rubisco está preparado para atrapar el sustrato en una conformación de alta energía, a la que llamamos complejo precursor. La energía necesaria para deformar el sustrato hasta esta estructura es proporcionada por las interacciones que unen el sustrato a la enzima. De esta manera, tanto desde un punto de vista estructural como energético, la conformación de equilibrio del sustrato y la que se une al centro activo son muy diferentes.

Aunque pequeñas, las diferencias estructurales entre el CABP y el ET de enolización son significativas por lo que respecta al ángulo dihedral O2C2C3O3, que es casi plano en el ET y de 53° en el CABP. Precisamente este ángulo, como se ha indicado antes, juega un papel esencial en el proceso y la variación de su valor es una de las fuentes de la energía de activación.

Se ha analizado utilizando el modelo de tres carbonos, con el empleo del método semiempírico AM1, la SEP completa para el proceso de transferencia de

hidrógeno. Sobre esta SEP se ha localizado una segunda familia de ET relacionados con la transferencia de hidrógeno. En ésta, las geometrías corresponden a anillos de cuatro miembros (Ht, C2, C3 y O2) y el movimiento del hidrógeno no está acoplado con el movimiento de otros átomos. Estos ET se encuentran energéticamente desfavorecidos respecto de los encontrados anteriormente, y posiblemente están relacionados con la propiedad inhibidora de la acción catalítica de la Rubisco que posee la Xilulosa-1,5-bifosfato.

Los resultados obtenidos con los cálculos que tienen en cuenta el solvente indican que la posición del ET sobre la coordenada de reacción es independiente de los efectos del solvente, abundando en el postulado de la invariancia fundamental del ET.

También en el modelo de tres carbonos se ha realizado un estudio semiempírico de la inactivación de la enzima durante la catálisis. Con esta metodología se han caracterizado todas las ET relacionadas con el fenómeno, y de los resultados obtenidos se deduce la estrecha relación entre el paso de enolización y la inactivación. Aunque seguimos realizando estudios teóricos acerca de este comportamiento de la enzima, las primeras conclusiones apuntan hacia una serie de estructuras parecidas en las que un pequeño desplazamiento de un átomo de hidrógeno puede llevar al sistema hacia los procesos reactivos o hacia los procesos relacionados con la inactivación.

La equivalencia entre los resultados obtenidos con el modelo molecular de dos carbonos y los obtenidos con el resto de modelos nos lleva a concluir que el hecho de incluir funciones difusas en el cálculo no modifica en lo sustancial las conclusiones que de los resultados pueden extraerse.

Por último, en el modelo molecular que incluye los grupos fosfato (que corresponde al sustrato de la enzima) hemos encontrado también resultados equivalentes a los obtenidos con los modelos anteriores, lo cual nos lleva a concluir que los modelos escogidos son buenas representaciones del sustrato.

## VII.3 MECANISMO MOLECULAR DE LA CARBOXILACIÓN

### VII.3.1 INTRODUCCIÓN

Una vez que la enzima Rubisco ha sido activada (ver apartado II.2.1) y el sustrato D-Ribulosa-1,5-bifosfato se encuentra en el centro activo, el sistema está preparado para que se produzcan las transformaciones químicas que la enzima cataliza. Como ya se ha indicado, una vez producida la enolización, puede tener lugar el proceso de carboxilación, que se encuentra en el inicio de la vía fotosintética, o el proceso de oxigenación, con el que comienza la vía fotorrespiratoria. Ambos procesos pueden ser discutidos simultáneamente y por esa razón, en el apartado VII.4.5 se presenta un análisis conjunto de los resultados obtenidos al estudiar ambas reacciones químicas.

En la etapa de carboxilación, una molécula de  $\text{CO}_2$  se adiciona al enodiol, formándose un intermedio de seis carbonos, cuya presencia ha sido confirmada mediante experimentos de captura con borohidruro<sup>89</sup>. Con objeto de obtener información sobre el mecanismo concreto mediante el cual tiene lugar esta reacción es necesaria la caracterización teórica del ET y su comparación con datos experimentales.

Para caracterizar el ET hemos estudiado la adición de  $\text{CO}_2$  a diferentes modelos moleculares que representan al sustrato real: el 1,2-dihidroxiopropeno, en el que el sustrato se representa mediante un compuesto de tres carbonos, el 2,3,4-trihidroxi-2-penteno, en el que el modelo se amplía a toda la cadena de carbonos del sustrato y el ácido 2,3,4-dihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, que corresponde al sustrato real excepto por el hecho de que consideramos protonados los grupos fosfato.

En los distintos modelos moleculares hemos utilizado diferentes niveles de cálculo en función del tamaño del modelo y de los resultados obtenidos en los otros modelos.

El método empleado en la localización del ET es el del espacio de control y el espacio complementario, descrito en el apartado IV.3.3. El espacio de control incluye todos los grados de libertad asociados a los centros C2 y C3 y al CO<sub>2</sub> que se adiciona: las distancias, ángulos y ángulos dihedros. Las coordenadas de interconversión química se han definido según las ecuaciones IV.23 y IV.24.

Una vez localizado el punto estacionario se realiza un cálculo de modos normales con el fin de comprobar que la estructura encontrada posee una y sólo una frecuencia imaginaria y, por tanto, corresponde a un ET.

### VII.3.2 MODELO DE TRES CARBONOS

La adición de CO<sub>2</sub> sobre 1,2-dihidroxiopropeno se ha estudiado con métodos *ab initio*, dado el tamaño pequeño del sistema. En la Figura VII.32 se representa el modelo y la numeración empleada. El nivel de cálculo utilizado ha sido el HF/3-21G.

En la Tabla VII.21 se presentan los resultados obtenidos. Se detallan los valores de la energía, el único valor propio negativo obtenido de la diagonalización de la Hessiana y la frecuencia imaginaria obtenida del análisis de modos normales en coordenadas cartesianas ponderadas en peso. También se presentan los parámetros geométricos más importantes, las constantes de fuerza asociadas a ellos y las correspondientes componentes del vector de transición.

El valor bajo de la frecuencia imaginaria indica que en el ET el movimiento del CO<sub>2</sub> está acoplado con los movimientos de otros átomos pesados, concretamente los átomos C2 y C3. Por su parte, las componentes del VT muestran que las principales contribuciones son las relacionadas con las coordenadas que hemos denominado  $\chi^-$  y  $\chi^+$ , así como las relacionadas con la distancia C2C3 (el doble enlace), la distancia O2(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>) en la cual el enlace cambia de doble a sencillo y, de modo importante, el ángulo de apertura del CO<sub>2</sub>. Los signos de las componentes del VT indican que un incremento en  $\chi^-$  y  $\chi^+$  (esto es, un alejamiento del CO<sub>2</sub> respecto del carbono C2), resulta en un incremento del ángulo de apertura del CO<sub>2</sub> y una disminución de la longitud del enlace C2C3. En el proceso químico, por tanto, todas estas variables geométricas cambian de

manera concertada y el valor propio negativo de la Hessiana resulta del acoplamiento de todas ellas.

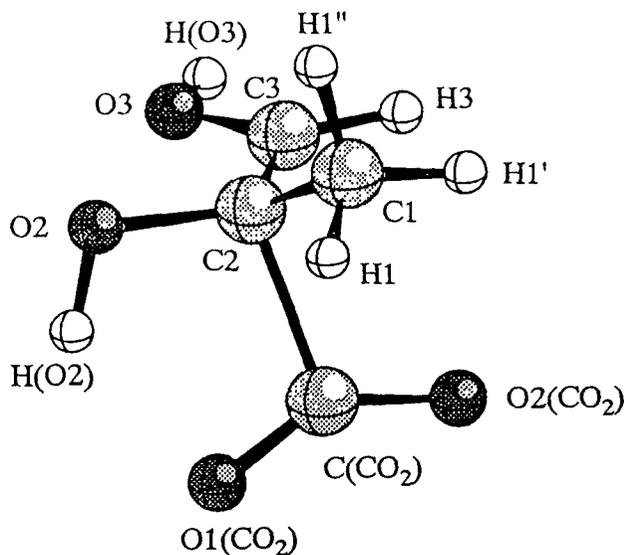


Figura VII.32 Adición del  $\text{CO}_2$  sobre 1,2-dihidroxiacetona. En la figura se muestra la numeración de los átomos.

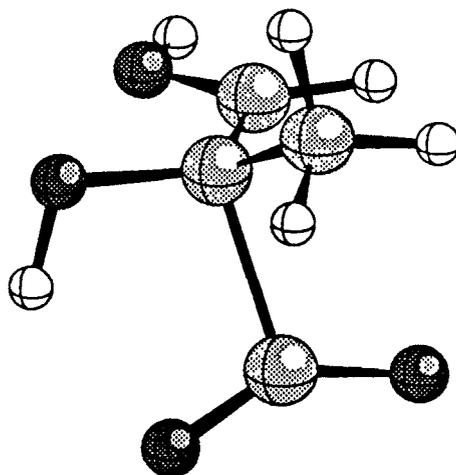
El valor del ángulo de apertura del  $\text{CO}_2$  en el ET es de  $143^\circ$ . Es remarcable la invariancia de este grado de libertad en ET que se han caracterizado para etapas de carboxilación en diferentes enzimas. Así, este valor resulta comparable con el valor del mismo ángulo en un modelo de la formiato deshidrogenasa (entre  $138$  y  $136^\circ$  según el conjunto de funciones de base utilizado)<sup>90</sup> o de reacciones catalizadas por la enzima anhidrasa carbónica ( $134^\circ$ )<sup>91-93</sup>.

**Tabla VII.21** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para el ET de adición de  $\text{CO}_2$  a 1,2-dihidroxiopropeno. Los resultados se han obtenido con el método HF/3-21G.

HF/3-21G			
Energía total	-451.795222		
Valor propio	-0.02656		
Frecuencia imaginaria	325.89i		
	G	F	C
$\chi^-$	1.842	0.08	-0.857
$\chi^+$	1.805	0.01	-0.227
C2C3	1.399	0.57	0.178
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.203	0.84	0.091
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.213	0.78	0.110
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2	111.10	0.54	0.088
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )	143.18	0.61	-0.295
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2C3	60.98	0.07	-0.073
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )C2	-175.79	0.06	-0.059

La geometría del ET encontrado se muestra en la Figura VII.33. Una comparación con el ET análogo experimentalmente determinado, el CABP, muestra que la conformación de la cadena de carbonos del ET es similar a la del CABP. Las principales diferencias entre ambas estructuras se refieren a la distancia C2C(CO<sub>2</sub>) que es necesariamente más larga en el ET que en el CABP, dado que en el primero el enlace todavía no está formado. El valor de esta distancia en el ET calculado es de 1.886 Å, demasiado larga para considerarse un enlace C-C. De hecho, un análisis de los órdenes de enlace sobre la estructura de transición muestra para esta distancia un valor de 0.44, que corresponde a un enlace a medio formar. La segunda diferencia corresponde con el ángulo de rotación alrededor del enlace C2C3, que vale 11.7° en el ET calculado y 53° en el CABP. Esta diferencia se debe a que el CABP posee todos sus carbonos

saturados, mientras que en el ET se está desarrollando un carbocatión sobre el átomo C3, y al distinto carácter del enlace C2C3 en uno y otro: es sencillo en el CABP y entre sencillo y doble en el ET (orden de enlace de 1.15).



**Figura VII.33** Geometría del ET para la adición de CO<sub>2</sub> sobre 1,2-dihidroxiopropeno, calculada al nivel HF/3-21G.

### VII.3.3 MODELO DE CINCO CARBONOS

En una segunda aproximación al proceso de carboxilación que tiene lugar en el centro activo de la Rubisco, hemos estudiado la adición de CO<sub>2</sub> sobre 2,3,4-trihidroxi-2-penteno. Con ello, por un lado, comprobaremos la independencia de los resultados obtenidos respecto del modelo molecular escogido. Por otro lado, obtendremos una estructura más comparable en el CABP (excepto en los fosfatos), con lo cual podremos contrastar mejor los datos teóricos con los experimentales.

La numeración utilizada al estudiar este modelo molecular sigue el criterio general empleado en esta memoria, de modo que los átomos añadidos son C4 y C5, con los correspondientes átomos de oxígeno e hidrógeno.

Los nuevos átomos se añaden al espacio complementario, con lo cual no es de esperar que se produzcan cambios sustanciales en la geometría y valores del VT obtenidos con el modelo más reducido.

Hemos utilizado para este modelo dos niveles de cálculo: el semiempírico AM1 y el HF/3-21G. De este modo, compararemos los resultados obtenidos con el método *ab initio* con los obtenidos utilizando el modelo de tres carbonos y con los resultados obtenidos con el método AM1. Éste último se empleará, posteriormente, en el estudio del sustrato real.

Se han encontrado en este caso ET equivalentes al encontrado con el modelo anterior. En la Tabla VII.22 se indican los datos estructurales y dinámicos relativos a los ET encontrados con los dos niveles de cálculo utilizados.

También en este caso el valor de la frecuencia imaginaria es relativamente bajo, lo que indica que la reacción está controlada por movimientos de átomos pesados. Por su parte, las componentes del VT muestran que las principales contribuciones son las relacionadas con las coordenadas internas  $\chi_+$ ,  $\chi_-$ , C2C3, O2(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>), O2(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>)C2 y O1(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>)O2(CO<sub>2</sub>). La única diferencia respecto al modelo anterior es que en éste la participación en el VT de la coordenada interna O2(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>)C2 es mayor. Respecto a los signos de las componentes del VT, llama la atención la diferencia en los signos de  $\chi_+$  y  $\chi_-$ . En el modelo de tres carbonos, ambas componentes tenían el mismo signo. En cambio, en el modelo de cinco carbonos los signos son distintos, lo que indica que los movimientos que representan se combinan ahora antisimétricamente. En cualquier caso, las tendencias son equivalentes: un alejamiento del CO<sub>2</sub> (aumento de  $\chi_-$ ) implica una disminución en la longitud del enlace C2C3 y un incremento en el ángulo de apertura del CO<sub>2</sub>. El valor de dicho ángulo de apertura oscila entre 137° (AM1) y 143° (HF/3-21G), es decir, la invariancia en este grado de libertad se mantiene con el cambio del modelo.

**Tabla VII.22** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza asociadas a dichos parámetros (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para la adición de  $\text{CO}_2$  sobre 2,3,4-trihidroxi-2-penteno. Se presentan los resultados obtenidos con los métodos AM1 y HF/3-21G.

	AM1			HF/3-21G		
Energía total	-0.283932			-603.882030		
Valor propio	-0.02495			-0.02898		
Frecuencia imaginaria	372.43i			390.27i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	1.695	0.10	-0.863	1.842	0.07	-0.883
$\chi^+$	1.848	0.05	0.116	1.805	0.06	0.118
C2C3	1.427	0.62	0.167	1.399	0.56	0.178
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.225	1.07	0.077	1.203	0.85	0.088
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.234	1.02	0.090	1.213	0.79	0.106
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2	112.95	0.56	0.161	111.10	0.65	0.135
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )	137.74	0.44	-0.372	143.18	0.60	-0.309
O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2C3	43.23	0.03	-0.032	60.98	0.10	0.021
O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )C2	-177.82	0.05	-0.049	-175.79	0.07	-0.065

Los parámetros geométricos que definen el espacio de control (cálculo HF/3-21G) son exactamente iguales a los obtenidos en el modelo anterior. Sólo se detectan pequeñas diferencias en algunos valores, como el ángulo dihedro de rotación alrededor del doble enlace, que en este modelo vale  $4.4^\circ$  frente a los  $11.7^\circ$  del modelo anterior.

Así mismo, resulta remarcable la esencial invariancia en el valor de la frecuencia imaginaria calculada para este modelo y para el anterior.

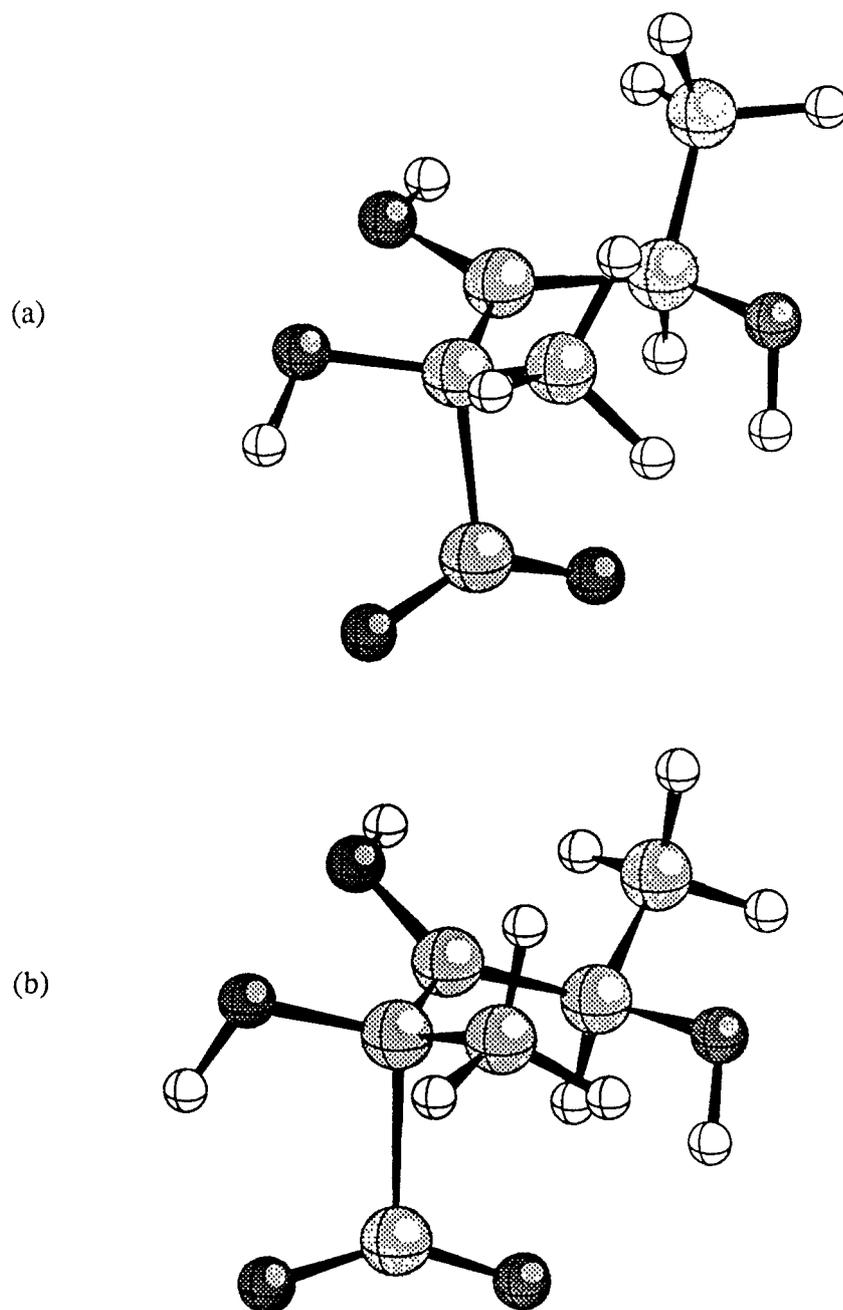
Si comparamos los resultados AM1 y los *ab initio*, se observa que la principal diferencia se da en el valor del ángulo dihedro O2(CO<sub>2</sub>)C(CO<sub>2</sub>)C2C3, mientras que el resto de parámetros geométricos son muy similares, así como los valores de las constantes de fuerza y las componentes del VT. Por consiguiente, el

método AM1 reproduce bien estos parámetros y será empleado en el siguiente modelo.

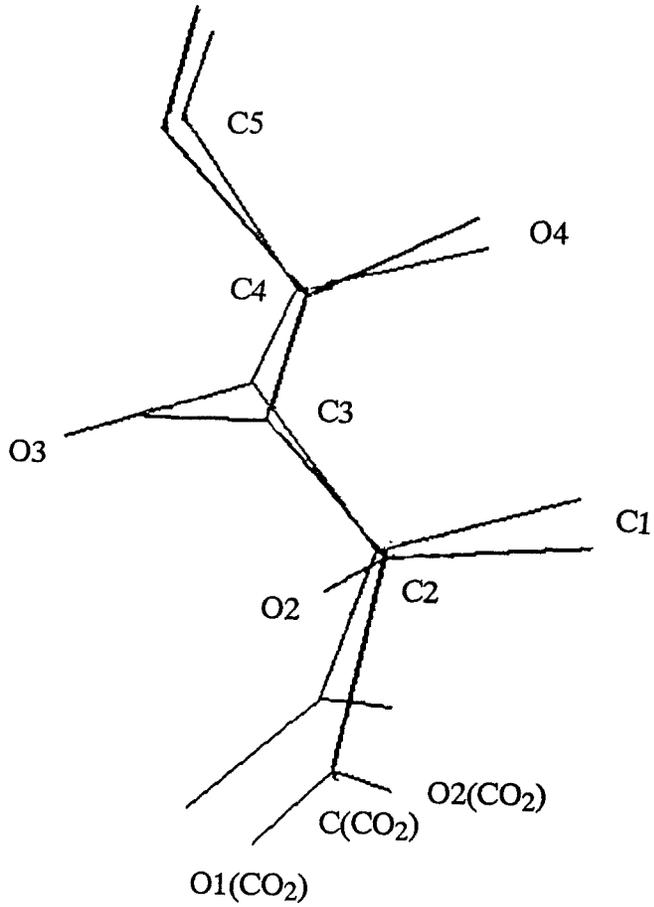
En la Figura VII.34 se presenta la geometría del ET según los resultados de ambos niveles de cálculo. Un examen de estas figuras muestra claramente que con ambos métodos de cálculo se obtienen estructuras muy semejantes.

Si se comparan los ET calculados con el CABP se observa de nuevo una gran similitud. La orientación de C5 es un poco distinta, dada la libertad de giro alrededor del enlace simple C3C4 que posee la estructura. Si se realiza en la estructura del ET calculado un giro sobre este enlace, de manera que la orientación de los grupos unidos a C4 se corresponda con la orientación del CABP, se comprueba que ambas estructuras se superponen. Este giro, dado que no afecta al espacio de control, no cambia la naturaleza del ET, que sigue caracterizándose como tal. En un experimento de simulación se sustituyó la cadena de carbonos del CABP por la obtenida para el ET de carboxilación con el giro arriba indicado y se colocó en el interior del centro activo de la enzima, sin que se produjeran impedimentos estéricos. En la figura VII.35 se muestra la superposición entre el ET y el CABP, cuya estructura experimentalmente determinada se presenta en la Figura VII.36.

Una última comparación puede realizarse entre el ET para el proceso de carboxilación (Figura VII.34) y el ET para el proceso de enolización (Figura VII.29). Se observa la gran similitud existente entre ambas estructuras, lo que implica que el complejo sucesor de la enolización corresponde al precursor de la carboxilación.



**Figura VII.34** Geometría de los ET para la adición de  $\text{CO}_2$  sobre el C2 de 2,3,4-trihidroxi-2-penteno, calculados con el método AM1 (a) y HF/3-21G (b).



**Figura VII.35** Comparación entre las estructuras del ET de carboxilación (línea gruesa) y el CABP (línea fina). Puede apreciarse el grado de superposición de ambas estructuras.

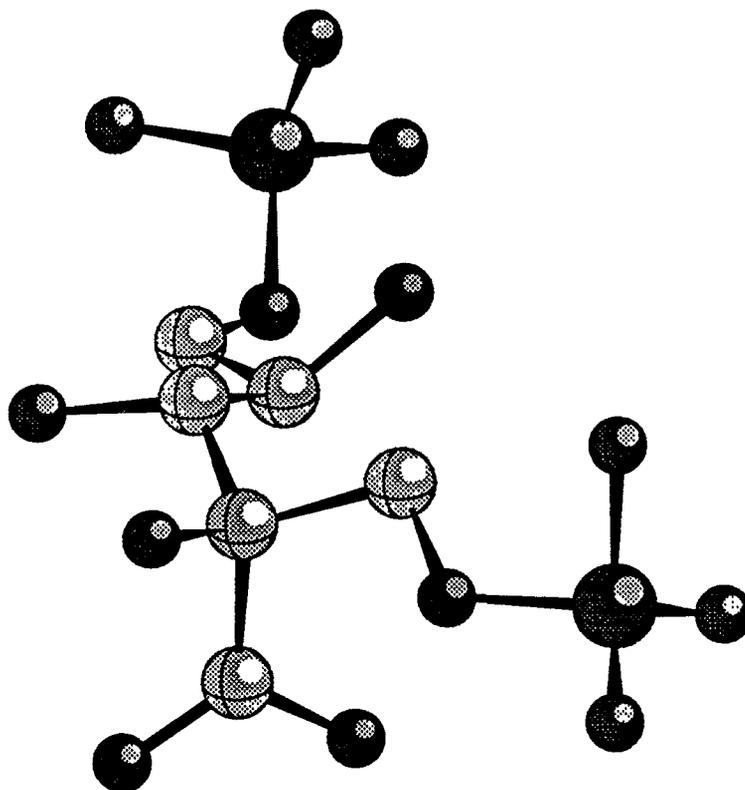


Figura VII.36 Estructura del CABP, según las coordenadas experimentalmente determinadas mediante cristalografía de Rayos X<sup>44</sup>

### VII.3.4 MODELO CON INCLUSIÓN DE GRUPOS FOSFATO

Hemos realizado una última comprobación de la independencia de los resultados obtenidos respecto al modelo molecular. Para ello, se ha estudiado la adición de CO<sub>2</sub> sobre el ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, que corresponde al sustrato real con la única salvedad de que se considera que los grupos fosfato se encuentran protonados.

**Tabla VII.23** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria (cm<sup>-1</sup>), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza asociadas a dichos parámetros (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para la adición de CO<sub>2</sub> sobre ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico. Se presentan los resultados obtenidos con el método AM1.

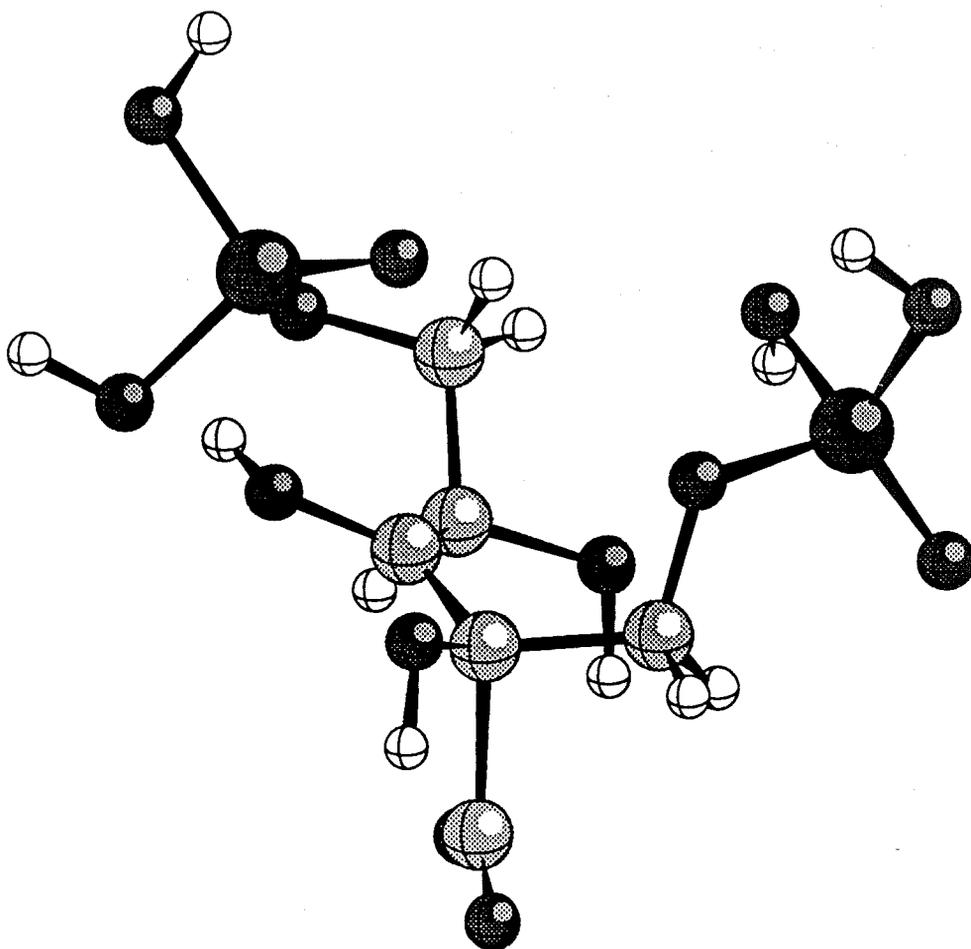
		AM1		
Energía total		-0.786732		
Valor propio		-0.11690		
Frecuencia imaginaria		409.19i		
		G	F	C
	$\chi^-$	1.684	0.08	0.788
	$\chi^+$	1.986	0.04	0.271
	C2C3	1.436	0.59	-0.173
	O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.224	1.07	-0.069
	O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )	1.231	1.02	-0.074
	O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2	112.38	0.51	-0.218
	O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )	140.25	0.39	0.369
	O2(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )C2C3	24.54	0.04	0.235
	O1(CO <sub>2</sub> )C(CO <sub>2</sub> )O2(CO <sub>2</sub> )C2	-180.01	0.05	-0.046

El gran tamaño de este modelo, juntamente con el hecho de que el método semiempírico AM1 reproduce bien tanto los valores geométricos como los parámetros que caracterizan las estructuras de transición, aconsejan su utilización.

Con este modelo se ha encontrado un ET equivalente a los encontrados en anteriores modelos. En la Tabla VII.23 se detallan los datos estructurales y dinámicos relativos a este ET.

Una comparación de los resultados mostrados en dicha tabla con los que se presentan en la Tabla VII.22 pone de manifiesto que la frecuencia imaginaria es ahora un poco mayor, que  $\chi^-$  y  $\chi^+$  se combinan de nuevo simétricamente, como en el modelo de tres carbonos, y que hay una mayor participación en el VT de la componente correspondiente a la coordenada interna  $O_2(CO_2)C(CO_2)C_2C_3$ . La geometría, en cambio, es muy parecida, así como las constantes de fuerza.

La similitud entre los resultados obtenidos en ambos modelos se aprecia mejor mediante la comparación de la estructura de transición en este modelo (mostrada en la Figura VII.37) y la correspondiente al modelo anterior (Figura VII.34). El parecido es grande, salvo muy pequeñas diferencias, producto de rotaciones alrededor de enlaces sencillos.



**Figura VII.37** Geometría del ET para la adición de  $\text{CO}_2$  sobre el C2 del ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, calculada al nivel AM1.

## VII.4 MECANISMO MOLECULAR DE LA OXIGENACIÓN

### VII.4.1 INTRODUCCIÓN

En la etapa de oxigenación (ver apartado II.2.4), una molécula de  $O_2$  se adiciona al carbono 2 del enodiol, formándose un intermedio que posteriormente se fragmenta, dando lugar a los productos de la reacción de oxigenación: fosfoglicolato y 3-D-fosfoglicerato<sup>94</sup>. Esta reacción representa una limitación al rendimiento de las plantas, dado que en ella se disipa energía en forma de calor y se produce  $CO_2$ <sup>95</sup>.

Desde el punto de vista teórico, para que esta reacción tenga lugar debe producirse una inversión de spin, dado que el estado fundamental del sustrato es singlete, mientras que el del oxígeno molecular es triplete. Sin embargo, como vimos en el apartado VII.1, el estado electrónico triplete del sustrato se encuentra accesible como consecuencia de la deformación a que se encuentra sometido en el interior del centro activo de la enzima.

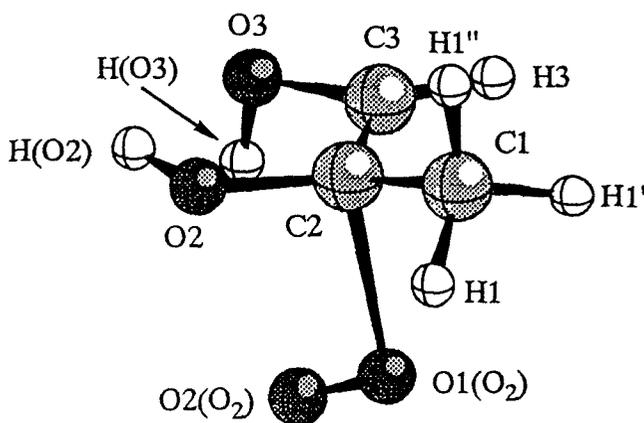
Con objeto de confirmar los resultados obtenidos sobre bifuncionalidad y esclarecer el mecanismo molecular de la oxigenación, es conveniente caracterizar teóricamente el ET para dicho proceso y compararlo con los datos experimentales de que se dispone. Con este fin hemos seleccionado los mismos modelos moleculares para representar al sustrato real que en el apartado anterior: el 1,2-dihidroxiopropeno, el 2,3,4-trihidroxi-2-penteno y el ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico. En cada uno de ellos hemos utilizado diferentes niveles de cálculo en función de su tamaño y de los resultados obtenidos con otros modelos.

El método empleado en la localización del ET es el de la partición del espacio, incluyendo en el espacio de control todos los grados de libertad que definen el esquema de enlaces alrededor de los centros C2 y C3 y el  $O_2$  que se adiciona. Las coordenadas de interconversión química se han definido, igual que en el apartado anterior, por las ecuaciones IV.23 y IV.24.

Una vez encontrado cada punto estacionario se ha realizado un análisis de modos normales que confirma que la estructura encontrada corresponde a un ET.

### VII.4.2 MODELO DE TRES CARBONOS

La adición de  $O_2$  sobre 1,2-dihidroxiopropeno se ha estudiado con métodos *ab initio*, mediante cálculos HF/3-21G, dado el relativamente pequeño tamaño del sistema. En la Figura VII.38 se representa el modelo y se incluye la numeración empleada.



**Figura VII.38** Adición del  $O_2$  sobre 1,2-dihidroxiopropeno. En la figura se muestra la numeración de los átomos.

Según hemos visto en el apartado VII.1, la reacción de oxigenación se produce mediante combinación del sustrato en estado triplete y del oxígeno en estado también triplete. Esta combinación puede llevar a la formación de supermoléculas en estado singlete, triplete o quintuplete. Por esta razón, para la oxigenación se realizó una búsqueda de puntos de silla de índice uno tanto sobre la hipersuperficie reactiva singlete como sobre la triplete, encontrándose en cada una de ellas una estructura de transición. Por su parte, cálculos puntuales demostraron que el estado quintuplete se encuentra muy desfavorecido energéticamente respecto a los estados singlete y triplete. De las ET encontradas en estos dos estados electrónicos, la de menor energía corresponde al estado triplete, relacionada con el proceso de adición de  $O_2$  sobre el doble enlace. La ET singlete describe un proceso en el que la rotura O-O se está produciendo, con lo que puede estar relacionada con procesos que ocurran en pasos catalíticos subsiguientes al estudiado aquí. En la Tabla VII.24 se presentan los resultados obtenidos en ambos estados electrónicos.

Como puede comprobarse en esta tabla, cada ET corresponde a un proceso diferente. El obtenido en el estado electrónico triplete está controlado por las mismas variables que en el caso de carboxilación y, por tanto, corresponde al proceso de adición de  $O_2$ . El del estado singlete, en cambio, está totalmente controlado por la orientación de la molécula de oxígeno; además, la distancia de enlace  $O2(O_2)O1(O_2)$  es demasiado grande para que pueda seguir considerándose una molécula de oxígeno. De hecho, el orden de enlace, que vale 1.19 en el estado triplete, queda reducido a 0.31 en el estado singlete. Por su parte, la distancia  $C2O1(O_2)$  es mucho mayor en el estado triplete (1.93 Å) que en el singlete (1.49 Å). Con ello, el ET localizado en el estado singlete corresponde a un estado en el que el enlace oxígeno-oxígeno está prácticamente roto y se ha formado un enlace entre uno de los átomos del oxígeno y el C2 o un epóxido con el átomo de oxígeno y los carbonos C2 y C3.

**Tabla VII.24** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para los ET encontrados en el estado electrónico triplete (T) y singlete (S) al estudiar la adición de  $\text{O}_2$  sobre 1,2-dihidroxipropeno. Los resultados se han obtenido con el método HF/3-21G.

	T			S		
Energía total	-414.053872			-414.014229		
Valor propio	-0.10119			-0.00637		
Frecuencia imaginaria	628.45i			122.43i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	1.925	-0.04	-0.934	1.260	0.43	0.008
$\chi^+$	1.588	0.03	-0.021	0.696	0.18	-0.004
C2C3	1.395	0.54	0.235	1.486	0.61	0.000
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )	1.379	0.33	0.132	1.697	0.09	0.010
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2	108.25	0.26	0.009	155.82	0.03	0.009
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2C3	-54.60	0.03	0.005	184.37	0.00	0.999

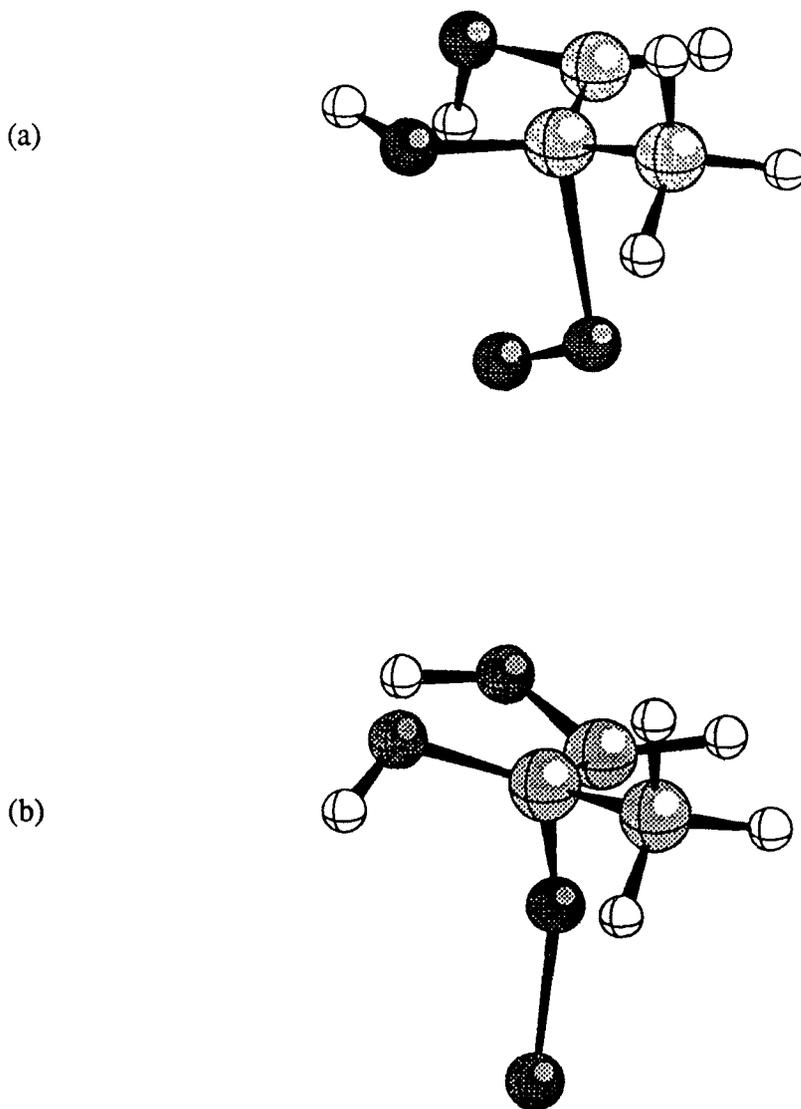
El ET triplete corresponde a la adición de  $\text{O}_2$  y un análisis de la densidad de spin revela que ésta se encuentra localizada en los átomos C3, C2, O1(O<sub>2</sub>) y O2(O<sub>2</sub>), con lo cual el carácter triplete del ET se debe a los orbitales  $\pi$  del enodiol y del oxígeno, en un proceso en el que participan cuatro electrones.

El valor de la frecuencia imaginaria es algo mayor que en el caso de la carboxilación, lo cual es lógico porque en este proceso participan menos átomos pesados, pero en el proceso siguen acoplándose movimientos de los átomos C2, C3 y los dos oxígenos que se adicionan.

Como se aprecia en el VT, las principales contribuciones son las correspondientes a las coordenadas internas  $\chi^-$ , C2C3 y O2(O<sub>2</sub>)O1(O<sub>2</sub>). Como en el caso de la carboxilación, un acercamiento del  $\text{O}_2$  implica un alargamiento de los enlaces C2C3 y O1(O<sub>2</sub>)-O2(O<sub>2</sub>).

La geometría de ambos ET (triplete y singlete) se presenta en la Figura VII.39. Una comparación del ET triplete con los correspondientes ET para la

enolización (Figura VII.23) y la carboxilación (Figura VII.33) pone de manifiesto la semejanza entre todos ellos, con lo cual de nuevo puede concluirse que el complejo sucesor del ET de enolización es el complejo precursor de la oxigenación, como también lo era de la carboxilación. Así mismo, la comparación de este ET con el fragmento correspondiente del CABP lleva a concluir que el ET corresponde al proceso real y a constatar de nuevo el postulado de la invariancia fundamental del ET.



**Figura VII.39** Geometría del ET para la adición de  $O_2$  sobre 1,2-dihidroxiopropeno (a), cuyo estado electrónico es triplete, y del ET caracterizado en estado singlete (b). Ambos se han calculado al nivel HF/3-21G.

### VII.4.3 MODELO DE CINCO CARBONOS

Hemos empleado un segundo modelo molecular, más cercano al sustrato real de la enzima, en la caracterización de la etapa de oxigenación. En este apartado describiremos los resultados obtenidos al estudiar la adición de O<sub>2</sub> sobre 2,3,4-trihidroxi-2-penteno.

Como en el caso de la carboxilación y la enolización, los nuevos átomos se añaden al espacio complementario y no es de esperar que se produzcan grandes variaciones en los resultados.

Los puntos de silla se han buscado con dos niveles de cálculo: el semiempírico AM1 que se empleará también en el apartado siguiente en el estudio del modelo con inclusión de grupos fosfato y el HF/3-21G.

También en este modelo se realizó una búsqueda del ET en los estados electrónicos singlete y triplete y, como antes, se encontraron ET en ambas, siendo de menor energía el del estado electrónico triplete. El ET encontrado en estado singlete tampoco corresponde con el proceso estudiado, sino, probablemente, con algún paso posterior de la catálisis.

En la Tabla VII.25 se indican los datos estructurales y dinámicos relativos a los ET encontrados con los dos niveles de cálculo en los dos estados electrónicos estudiados.

**Tabla VII.25 a** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para los ET encontrados en el estado electrónico triplete (T) y singlete (S) al estudiar la adición de  $\text{O}_2$  sobre 2,3,4-trihidroxi-2-penteno. Los resultados se han obtenido con el método AM1.

	T			S		
Energía total	-0.225739			-0.079883		
Valor propio	-0.10508			-0.03753		
Frecuencia imaginaria	740.67i			266.38i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	1.707	0.03	-0.927	1.385	0.58	-0.081
$\chi^+$	1.876	0.04	-0.276	1.388	0.08	-0.459
C2C3	1.450	0.66	0.135	1.537	0.37	-0.031
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )	1.127	0.94	0.190	1.759	-0.15	0.549
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2	113.71	0.31	0.008	109.03	0.12	0.262
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2C3	-101.45	0.01	0.025	-74.70	-0.06	-0.622

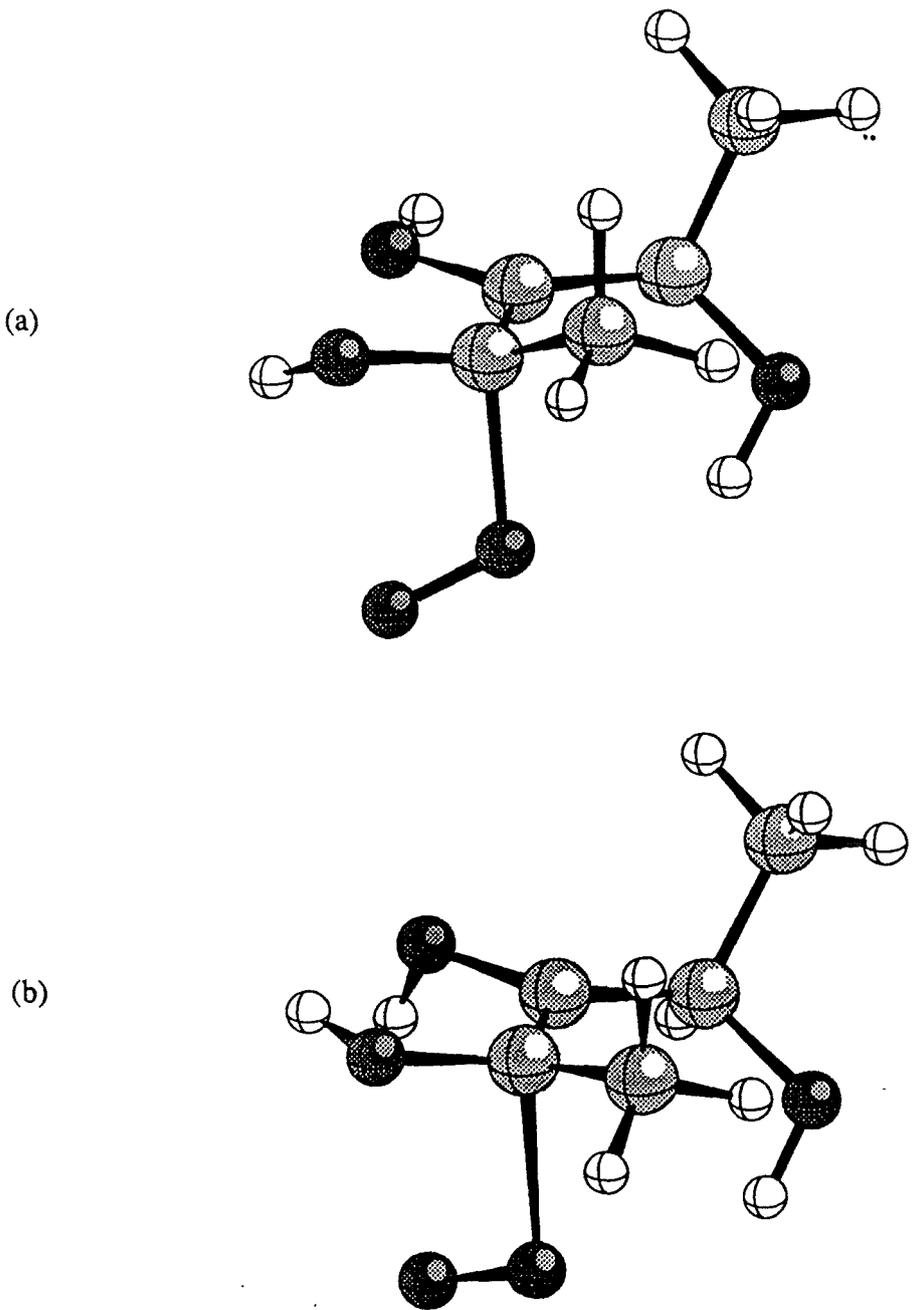
**Tabla VII.25 b** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para los ET encontrados en el estado electrónico triplete (T) y singlete (S) al estudiar la adición de  $\text{O}_2$  sobre 2,3,4-trihidroxi-2-penteno. Los resultados se han obtenido con el método HF/3-21G.

	T			S		
Energía total	-566.137379			-566.117315		
Valor propio	-0.12308			-0.02000		
Frecuencia imaginaria	560.21i			135.35i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	2.002	-0.04	-0.921	1.272	0.42	0.035
$\chi^+$	1.507	0.01	-0.052	0.733	0.18	0.047
C2C3	1.389	0.47	0.277	1.481	0.60	-0.029
$\text{O}_2(\text{O}_2)\text{O}_1(\text{O}_2)$	1.380	0.43	0.162	1.687	0.09	-0.008
$\text{O}_2(\text{O}_2)\text{O}_1(\text{O}_2)\text{C}_2$	106.80	0.13	-0.136	146.57	0.02	-0.475
$\text{O}_2(\text{O}_2)\text{O}_1(\text{O}_2)\text{C}_2\text{C}_3$	-57.89	0.01	0.006	195.65	-0.01	0.877

Si comparamos los resultados presentados en la Tabla VII.25 b con los de la Tabla VII.24 se observa un buen acuerdo entre los valores para el ET triplete en un modelo y el otro, tanto por lo que respecta a parámetros geométricos como por lo que respecta a constantes de fuerza y componentes del vector de transición.

La frecuencia imaginaria es ligeramente mayor en el modelo de tres carbonos, pero resulta evidente que ambos ET describen el proceso que estudiamos de adición del  $\text{O}_2$  sobre el doble enlace enodiolico.

En la Figura VII.40 presentamos los ET en estado triplete calculados con la metodología AM1 y la *ab initio*. Como puede verse, las diferencias son escasas aunque más importantes que en el caso de la carboxilación. Sobre todo se diferencian en la orientación de los hidrógenos unidos a  $\text{O}_2$  y  $\text{O}_3$  y la orientación del  $\text{O}_2$  que se adiciona. Esto también puede comprobarse en los datos presentados en la Tabla VII.25.



**Figura VII.40** Geometría de los ET para la adición de  $O_2$  sobre el C2 de 2,3,4-trihidroxi-2-penteno, calculados con el método AM1 (a) y HF/3-21G (b). El estado electrónico de ambos es triplete.

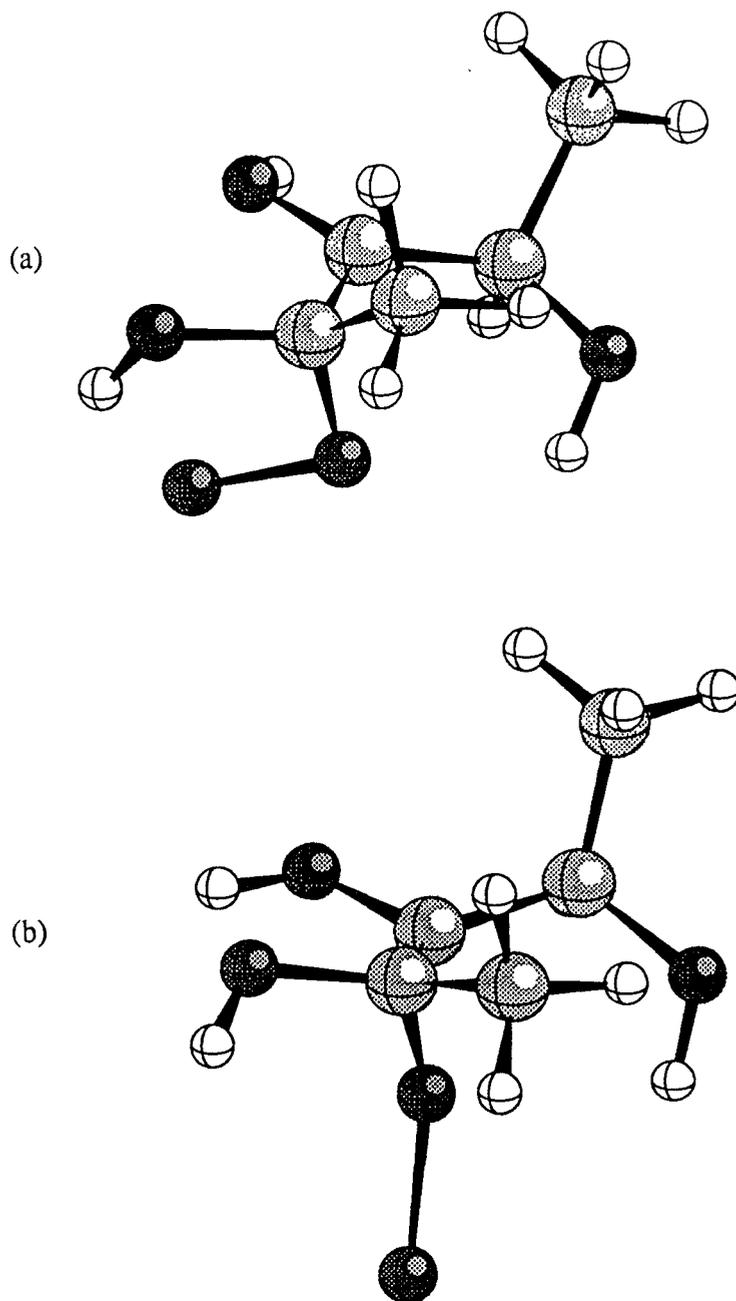


Figura VII.41 Geometría de los ET encontrados en el estado electrónico singlete al estudiar la adición de  $O_2$  sobre el C2 de 2,3,4-trihidroxi-2-penteno, calculados con el método AM1 (a) y HF/3-21G (b).

Si se comparan los ET encontrados en el estado triplete (Figura VII.40) con los ET obtenidos para el proceso de carboxilación (Figura VII.34) y de enolización (Figura VII.29) se comprueba el gran parecido entre todas las estructuras. Y lo mismo ocurre al compararlos con el CABP (Figura VII.36).

Los ET obtenidos para el estado singlete (presentados en la Figura VII.41) difieren bastante entre sí (sobre todo en la orientación del O<sub>2</sub>), aunque el *ab initio* es similar al obtenido con el modelo de tres carbonos (Figura VII.39 b).

#### VII.4.4 MODELO CON INCLUSIÓN DE GRUPOS FOSFATO

Finalmente se ha comprobado la independencia de los resultados obtenidos respecto del modelo molecular empleado mediante la utilización del ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, que corresponde con el sustrato real de la enzima. El gran tamaño de este modelo ha aconsejado la utilización de la metodología AM1.

Como en los anteriores modelos se ha realizado una búsqueda de ET en los estados electrónicos singlete y triplete y se han encontrado ET en ambos. Los datos estructurales y dinámicos relativos a estos ET se detallan en la Tabla VII.26.

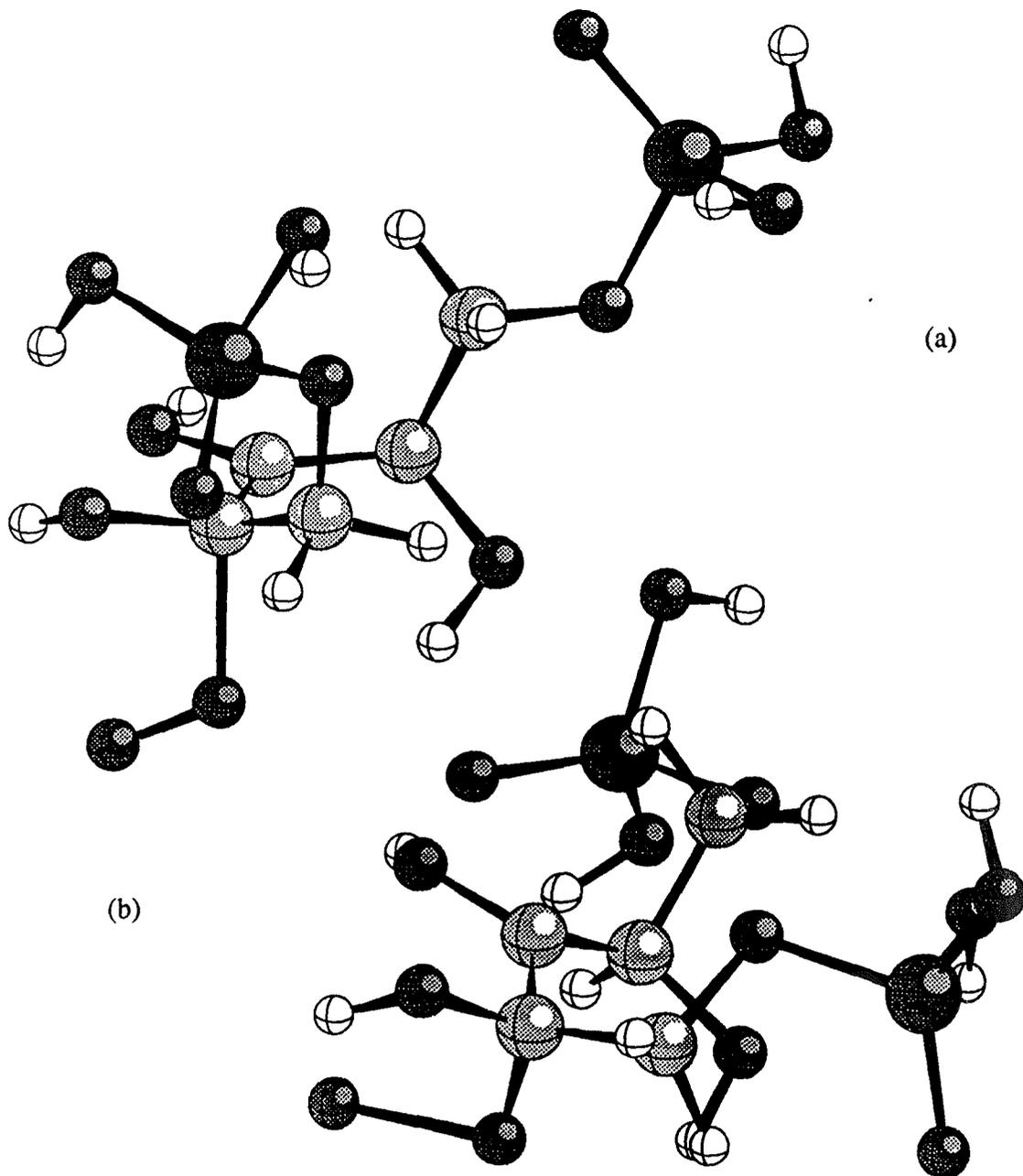
Los valores que hacen referencia al ET triplete pueden compararse con los correspondientes valores detallados en la Tabla VII.25 a. Como se puede apreciar, tanto los parámetros geométricos como las constantes de fuerza y componentes del vector de transición son similares, con lo cual se concluye que el modelo de cinco carbonos es una buena aproximación al sustrato real. Lo mismo sucede, aunque la similitud es menor, si se comparan los valores que hacen referencia al ET singlete.

En la Figura VII.42 se presentan los ET obtenidos en ambos estados electrónicos con el uso del presente modelo. Ambos difieren entre sí, como ya se ha comentado en el caso de los modelos anteriores, en el fragmento correspondiente al O<sub>2</sub> que se adiciona al C2 del doble enlace.

Si se comparan estas estructuras con las presentadas en la Figura VII.40 a (para el estado triplete) y VII.41 a (para el singlete) queda patente la afirmación anterior sobre el grado de aproximación que se obtiene con el empleo de los modelos reducidos.

**Tabla VII.26** Energía total y valor propio negativo (unidades atómicas), frecuencia imaginaria ( $\text{cm}^{-1}$ ), parámetros geométricos más importantes (G, distancias en Å y ángulos en grados), constantes de fuerza (F, unidades atómicas) y componentes del vector de transición (C), para los ET encontrados en el estado electrónico triplete (T) y singlete (S) al estudiar la adición de  $\text{O}_2$  sobre el ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico. Los resultados se han obtenido con el método AM1.

	T			S		
Energía total	-0.723412			-0.592103		
Valor propio	-0.09587			-0.47914		
Frecuencia imaginaria	687.13i			126.71i		
	G	F	C	G	F	C
$\chi^-$	1.657	-0.05	-0.925	1.364	0.68	-0.132
$\chi^+$	1.846	0.01	-0.267	1.563	0.06	-0.387
C2C3	1.454	0.67	0.139	1.555	0.46	0.073
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )	1.132	0.96	0.198	1.782	0.03	0.632
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2	113.93	0.24	-0.029	104.62	0.31	-0.033
O2(O <sub>2</sub> )O1(O <sub>2</sub> )C2C3	-102.78	0.01	0.071	-64.41	0.04	-0.565



**Figura VII.42** Geometría de los ET encontrados en los estados electrónicos triplete (a) y singlete (b) al estudiar la adición de  $O_2$  sobre el C2 del ácido 2,3,4-trihidroxi-2-penteno-1,5-bifosfórico, calculados con el método AM1.

## VII.4.5 CONCLUSIONES

Para el mecanismo molecular de la reacción de carboxilación hemos caracterizado una ET similar mediante todos los modelos utilizados. El análisis del VT indica que la fluctuación corresponde a una variación acoplada de diversos grados de libertad: el doble enlace, la distancia  $C(CO_2)C_2$ , el ángulo de apertura del  $CO_2$  y la distancia  $O_2(CO_2)C(CO_2)$ . La geometría de dicho ET resulta similar al fragmento de un ET análogo, el CABP. Este resultado es importante, por el hecho de que los ET han sido calculados *in vacuo*, mientras que la estructura del CABP se ha derivado de un estudio de Rayos X de dicho compuesto complejo con la enzima Rubisco. Con ello, una vez más, se constata el postulado de la invariancia fundamental del ET.

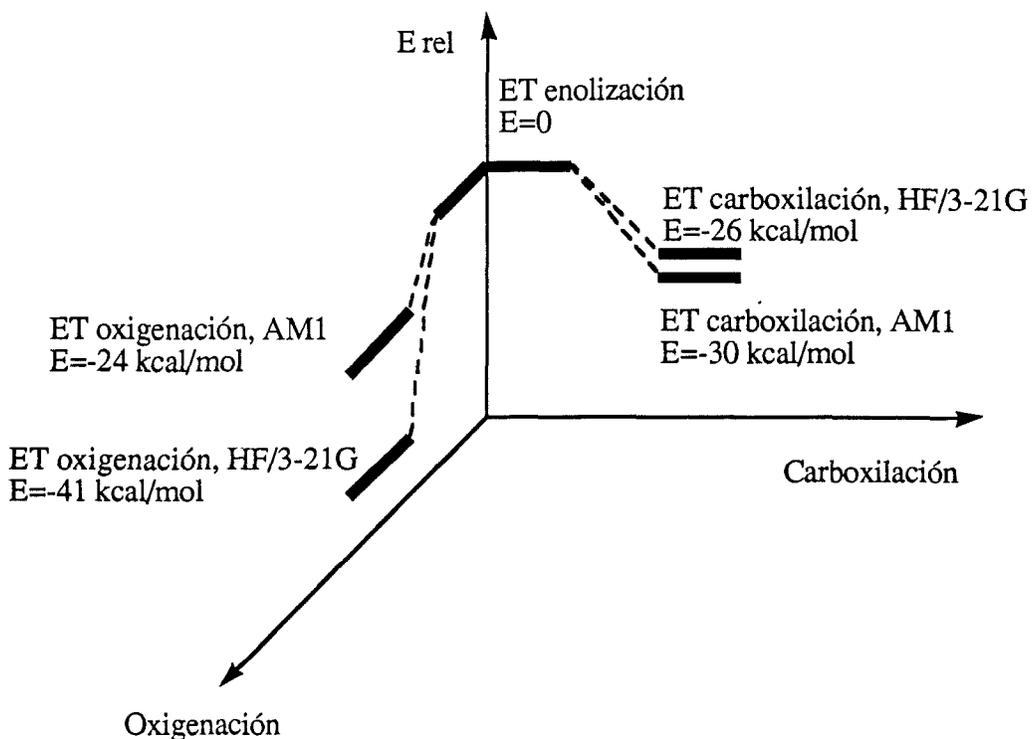
En el estudio del proceso de oxigenación se han localizado con todos los modelos dos ET en diferentes estados electrónicos. El ET de menor energía, localizado en estado triplete, corresponde al mecanismo molecular de la oxigenación. Su geometría resulta similar a la del ET análogo para la carboxilación, CABP, así como a la de los correspondientes ET para los procesos de enolización y carboxilación. El ET en estado electrónico singlete no corresponde al proceso de adición del  $O_2$  sobre el doble enlace sino a la ruptura del enlace O-O del  $O_2$ , relacionada con etapas posteriores del proceso de oxigenación del sustrato catalizado por la enzima.

La similitud entre las geometrías de los ET de enolización, carboxilación y oxigenación indica que los procesos son consecutivos y se encuentran muy relacionados: el complejo sucesor de enolización corresponde con el complejo precursor de carboxilación o de oxigenación. De este modo, los procesos se encadenan mediante una variación mínima en la estructura del sustrato de la enzima y la llegada del  $CO_2$  o del  $O_2$  es suficiente para forzar al sistema hacia el canal reactivo. Con respecto a la proteína, la similitud de los ET puede interpretarse mediante una reformulación del postulado de Pauling<sup>96-98</sup>: dado que el centro activo de la proteína debe ser complementario en forma al ET del proceso que cataliza, si una enzima cataliza más de una reacción, como es el caso de la Rubisco, los ET de esas reacciones deben tener formas muy similares. En la Rubisco, una vez que el sustrato se encuentra en el interior del centro activo, se

produce el proceso de enolización. La enzima está entonces preparada para realizar los procesos de carboxilación y de oxigenación. El hecho de que tenga lugar uno u otro dependerá únicamente de la naturaleza de la molécula de gas que entre en el centro activo.

Si se comparan las estructuras de los ET determinados para las tres etapas estudiadas del proceso catalítico, se observa que la estructura del ET de enolización es la que más difiere de la estructura del fragmento del CABP y del sustrato real de la Rubisco cuando están unidos al centro activo de la enzima. Este resultado sugiere que la energía de activación para el proceso de enolización, en el interior del centro activo, es probablemente mayor que la correspondiente a los otros procesos y está de acuerdo con el hecho encontrado experimentalmente, según el cual el proceso de enolización puede ser parcialmente limitante de la velocidad de la catálisis<sup>56</sup>. Con los datos energéticos de que disponemos pueden hacerse algunas estimaciones semicuantitativas de este hecho: la energía del ET de enolización es mayor que la correspondiente al ET de carboxilación (a la que se resta la energía correspondiente al dióxido de carbono deformado para hacer posible la comparación) por unas 30 kcal/mol (resultado AM1) o unas 26 kcal/mol (resultado HF/3-21G) y es también mayor que la energía del ET de oxigenación (a la que también se resta la energía del fragmento O<sub>2</sub>) por 24 kcal/mol (resultado AM1) o por 41 kcal/mol (resultado HF/3-21G). Con ello se predice, independientemente del nivel de cálculo empleado, que el ET de enolización se encuentra energéticamente por encima de los otros dos y por tanto limita la velocidad del proceso global. En la Figura VII.43 se presentan estos valores.

Al respecto, puede objetarse que no se ha tenido en cuenta la energía necesaria tanto para deformar al dióxido de carbono hasta la geometría que posee cuando forma parte del ET de carboxilación como para deformar al oxígeno en su caso. Sin embargo, esta energía (23.7 kcal/mol (AM1) o 28.6 kcal/mol (HF/3-21G) para el CO<sub>2</sub> y 2.5 kcal/mol (AM1) o 14.2 kcal/mol (HF/3-21G) para el O<sub>2</sub>) se obtiene de las interacciones con los restos aminoácidos que conforman el centro activo y no interfiere en el proceso reactivo que tiene lugar en su interior.



**Figura VII.43** Diferencias energéticas relativas entre los ET de enolización, carboxilación y oxigenación, calculadas mediante los métodos AM1 y HF/3-21G para el modelo molecular de cinco carbonos.

Por su parte, la escasa diferencia estructural de los ET de carboxilación y de oxigenación es un dato a favor de la hipótesis de la inevitabilidad de la oxigenación<sup>99</sup>.

## Referencias

- (1) Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Brändén, C.-I. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 119.
- (2) Andrews, T. J.; Lorimer, G. H. In *The biochemistry of plants.*; M. D. Hatch and N. K. Boardman, Ed.; Academic Press, Inc.: New York, 1987; Vol. 10; pp 131-218.
- (3) Hartman, F. C. In *Plant Protein Engineering*; P. R. Shewry and S. Gutteridge, Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1992; pp 61-92.
- (4) Hartman, F. C.; Soper, T. S.; Niyogi, S. K.; Mural, R. J.; Foote, R. S.; Mitra, S.; Lee, E. H.; Machanoff, R.; Larimer, W. F. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3496.
- (5) Lorimer, G. H.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6468.
- (6) Lorimer, G. H.; Gutteridge, S.; Reddy, G. S. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9873.
- (7) Hartman, F. C.; Lee, E. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11784.
- (8) Mural, R. J.; Soper, T. S.; Larimer, F. W.; Hartman, F. C. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6501.
- (9) Lundqvist, T.; Schneider, G. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12604.
- (10) Lundqvist, T.; Schneider, G. *Biochemistry* **1991**, *30*, 904.
- (11) Tapia, O.; Andres, J. *Mol. Eng.* **1992**, *2*, 37.
- (12) Nebot-Gil, I.; Malrieu, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3325.
- (13) Wang, S. Y.; Borden, W. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7282.
- (14) Morais, J.; Ma, J.; Zimmt, M. B. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3885.
- (15) Buenker, R. J. *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 1368.
- (16) Kaldor, U.; Shavitt, I. *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 191.
- (17) Buenker, R. J.; Bonacic-Koutecky, V.; Pogliani, L. *J. Chem. Phys.* **1980**, *73*, 1836.
- (18) Doany, F. E.; Heilweil, E. J.; Moore, R.; Hochstrasser, M. *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 201.
- (19) Favini, G.; Gamba, A.; Todeschini, R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1985**, 915.

- (20) Lasne, M. C.; Ripoll, J. L. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 1587.
- (21) Duhamel, L.; Launay, J. C. *Tetrahedron Letters* **1983**, *24*, 4209.
- (22) Turecek, F.; Havlas, Z. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4066.
- (23) Alagona, G.; Desmeules, P.; Ghio, C.; Kollman, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3623.
- (24) Knowles, J. R. *Nature* **1991**, *350*, 121.
- (25) Larson, J. R.; Epiotis, N. D.; Bernardi, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5713.
- (26) Hehre, W. J.; Lathan, W. A. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1972**, 771.
- (27) Tachibana, A.; Koizumi, M.; Tanaka, E.; Yamabe, T.; Fukui, K. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1989**, *200*, 207.
- (28) Heinrich, N.; Koch, W.; Frenking, G.; Schwarz, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 593.
- (29) Lin, M. C.; Laidler, K. L. *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 973.
- (30) Buenker, R. J.; Peyerimhoff, S. D. *Chem. Phys.* **1976**, *9*, 75.
- (31) Kollmar, H.; Staemler, V. *Theoret. Chim. Acta* **1978**, *48*, 223.
- (32) Brooks, B. R.; Schaefer III, H. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *106*, 307.
- (33) Said, M.; Maynaud, D.; Malrieu, J. P.; Bach, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 571.
- (34) Luippold, D. A. *Chem. Phys. Letters* **1975**, *35*, 131.
- (35) Orlandi, G.; Palmieri, P.; Poggi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3492.
- (36) Sánchez-Marcos, E.; Maraver, J. J.; Chiara, J. L.; Gómez-Sánchez, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1988**, 2059.
- (37) Wong, M. W.; Frisch, M. J.; Wiberg, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4776.
- (38) Douglas, J. E.; Rabinovitch, B. S.; Looney, F. S. *J. Chem. Phys.* **1955**, *23*, 315.
- (39) Bonacic-Koutecky, V.; Bruckmann, P.; Hiberty, P.; Koutecky, J.; Leforestier, C.; Salem, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 575.
- (40) Salem, L.; Bruckmann, P. *Nature* **1975**, *258*, 526.
- (41) Bruckmann, P.; Salem, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5037.

- (42) Bruni, M. C.; Daudey, J. P.; Malrieu, J. P.; Momicchioli, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3587.
- (43) Bonacik-Koutecky, V. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 396.
- (44) Andersson, I. comunicación personal.
- (45) Tse, J. M.-T.; Schloss, J. V. *Biochemistry* **1993**, *32*, 10398.
- (46) Andrés, J.; Safont, V. S.; Tapia, O. *Chem. Phys. Letters* **1992**, *198*, 515.
- (47) Andrés, J.; Safont, V. S.; Queralt, J.; Tapia, O. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 7888.
- (48) Kwiatkowski, J. S.; Zielinski, T. J.; Rein, R. *Adv. Quantum Chem.* **1986**, *18*, 85.
- (49) Hart, H. *Chem. Rev.* **1979**, *79*, 515.
- (50) Rappoport, Z. *The chemistry of enols*; John Wiley & Sons: Chichester, 1990.
- (51) Bash, P. A.; Field, M. J.; Davenport, G. A.; Petsko, D.; Karplus, M. *Biochemistry* **1991**, *30*, 5826.
- (52) Knowles, J. R. *Nature* **1990**, *350*, 121.
- (53) Johnson, W. P.; Gholamhossein, H.; Whitman, C. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 11001.
- (54) Topal, M. D.; Fresco, J. R. *Nature* **1976**, *263*, 285.
- (55) Topal, M. D.; Fresco, J. R. *Nature* **1976**, *263*, 289.
- (56) Saver, B. G.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5398.
- (57) Fiedler, F.; Mullhofer, G.; Trebst, A.; Rose, I. A. *Eur. J. Biochem* **1967**, *1*, 395.
- (58) Tapia, O.; Andrés, J.; Safont, V. S. *J. Phys. Chem.* **1994**, en prensa.
- (59) Apeloig, Y.; Arad, D.; Rappoport, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9131.
- (60) Kwiatkowski, J. S.; Leszczynski, J. *J. Mol. Struct., THEOCHEM* **1992**, *270*, 67.
- (61) Schlegel, H. B.; Gund, P.; Fluder, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5347.
- (62) Wang, X. C.; Nichols, J.; Feyereisen, M.; Gutowski, M.; Boatz, J.; Haymet, A. D.; Simons, J. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 10419.

- (63) Bosch, E.; Moreno, M.; Lluch, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2072.
- (64) Minkin, V. I.; Simkin, B. Y.; Minyaev, R. M. *Quantum Chemistry of Organic Compounds*; Springer-Verlag: New York, 1990.
- (65) Shida, N.; Almlöf, J.; Barbara, P. F. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 10457.
- (66) Yuanqui, T.; Wengui, D. *Int. J. Quantum Chem.* **1992**, *44*, 319.
- (67) Andrés, J.; Cárdenas, R.; Silla, E.; Tapia, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 666.
- (68) Baker, J.; Gill, M. W. *J. Comput. Chem.* **1988**, *9*, 466.
- (69) Bosch, E.; Moreno, M.; Lluch, J. M.; Bertrán, J. *Chem. Phys. Letters* **1989**, *160*, 543.
- (70) Colwell, S. M. *Theoret. Chim. Acta* **1988**, *74*, 123.
- (71) Colwell, S. M. *Mol. Phys.* **1984**, *51*, 1217.
- (72) Hoffmann, D. K.; Nord, R. S.; Ruedenberg, K. *Theor. Chim. Acta* **1986**, *69*, 265.
- (73) Koseki, S.; Gordon, M. S. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 118.
- (74) Kraus, W. A.; DePristo, A. E. *Theoret. Chim. Acta* **1986**, *69*, 309.
- (75) Malone, S.; Hegarty, A. F.; Nguyen, M. T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1988**, 477.
- (76) Valtazanos, P.; Ruedenberg, K. *Theoret. Chim. Acta* **1986**, *69*, 281.
- (77) Andrews, T. J.; Hatch, M. D. *Biochem. J.* **1969**, *114*, 117.
- (78) Laing, W. A.; Christeller, J. T. *Biochem. J.* **1976**, *159*, 563.
- (79) McCurry, S. D.; Pierce, J.; Tolbert, N. E.; Orme-Johnson, W. H. *J. Biol. Chem.* **1981**, *249*, 6623.
- (80) Mott, K. A.; Berry, J. A. *Plant Physiol.* **1986**, *82*, 77.
- (81) Robinson, S. P.; Portis Jr., A. R. *Plant Physiol.* **1989**, *90*, 968.
- (82) Sicher, R. C.; Hatch, A. L.; Stumpf, D. K.; Jensen, R. G. *Plant Physiol.* **1981**, *68*, 252.
- (83) Yokota, A.; Kitaoka, S. *Plant Cell Physiol.* **1989**, *30*, 183.
- (84) Edmonson, D. L.; Kane, H. J.; Andrews, T. J. *FEBS Letters* **1990**, *260*, 62.
- (85) Edmonson, D. L.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1390.

- (86) Edmonson, D. L.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1376.
- (87) Edmonson, D. A.; Badger, M. R.; Andrews, T. J. *Plant Physiol.* **1990**, *93*, 1390.
- (88) McCurry, S. D.; Tolbert, N. E. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8344.
- (89) Schloss, J. V.; Lorimer, G. H. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4691.
- (90) Tapia, O.; Andrés, J.; Cárdenas, R. *Chem. Phys. Letters* **1992**, *189*, 395.
- (91) Jacob, O.; Cárdenas, R.; Tapia, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8692.
- (92) Jacob, O.; Tapia, O. *Int. J. Quantum Chem.* **1992**, *42*, 1271.
- (93) Tapia, O.; Jacob, O.; Colonna, F. *Theor. Chim. Acta* **1993**, *85*, 217.
- (94) Lorimer, G. H. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **1981**, *32*, 349.
- (95) Mizioroko, H. M.; Lorimer, G. H. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 507.
- (96) Pauling, L. *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
- (97) Pauling, L. *Nature* **1948**, *161*, 707.
- (98) Pauling, L. *Am. Sci.* **1948**, *36*, 51.
- (99) Lorimer, G. H.; Andrews, T. J. *Nature* **1973**, *248*, 359.

## VIII. CONCLUSIONES

### *Primera*

Hemos estudiado la diferencia energética entre los estados electrónicos singlete y triplete de diferentes modelos moleculares que representan al sustrato de la enzima Rubisco, D-Ribulosa-1,5-bifosfato en su forma enodiolica, en función de deformaciones geométricas relacionadas con la rotación alrededor del doble enlace C2C3 y la piramidalización en el carbono C3. Los resultados obtenidos permiten concluir que en un enodiol convenientemente deformado esta diferencia energética puede ser muy pequeña, de manera que ambos estados electrónicos se encuentran energéticamente accesibles. Este resultado es independiente del modelo molecular utilizado para representar el sustrato de la enzima y también es esencialmente independiente del nivel de cálculo empleado: AM1, *ab initio* con diferentes conjuntos de funciones de base: 3-21G, 4-31G, 3-21G\* y 6-31G\*; inclusión de la correlación electrónica (MP2 y CISD) y métodos multideterminantes, CASSCF (2,2). Este hecho permite dar, por

primera vez, una explicación al comportamiento bifuncional de la enzima Rubisco: si una molécula de  $\text{CO}_2$  llega al centro activo, reaccionará con el sustrato en su estado singlete y la enzima catalizará el proceso de carboxilación. Si la molécula que llega es el  $\text{O}_2$ , reaccionará con el sustrato en su estado triplete y la enzima catalizará el proceso de oxigenación. Por consiguiente, la bifuncionalidad exhibida por la Rubisco es consecuencia de la deformación geométrica a la cual se encuentra sometido el sustrato en el interior del centro activo.

### *Segunda*

Hemos estudiado los efectos de la presencia del catión magnesio utilizando un modelo en el que su posición en el centro activo es idéntica a la que se obtiene de los datos de Rayos X. De este estudio se deduce que la presencia del magnesio ejerce un efecto de carácter electrónico, estabilizando la conformación *cis* de la forma enodiolica del sustrato y modulando la energía del estado electrónico triplete del mismo. El magnesio no participa en el mecanismo molecular de las reacciones químicas que tienen lugar en el centro activo de la Rubisco. Este resultado coincide con los datos recientemente publicados sobre la enzima acetolactato sintasa, que cataliza también una reacción de oxigenación.

### *Tercera*

Hemos caracterizado ET correspondientes a transferencias intramoleculares de hidrógeno en modelos moleculares que representan al sustrato de la enzima Rubisco. Estas ET se muestran invariantes respecto al nivel de representación teórica, al modelo utilizado para calcularlas y a los efectos del solvente. Geométricamente tienen forma de anillos pentagonales con el átomo de hidrógeno situado cerca del átomo  $\text{O}_3$  del sustrato, que juega un importante papel ayudando al movimiento del hidrógeno desde el  $\text{C}_3$  hasta el  $\text{O}_2$ . El proceso de transferencia intramolecular de hidrógeno así caracterizado simplifica la complicada serie de etapas a que se recurre en la bibliografía para explicar la formación del enodiol y supera la controversia suscitada por la naturaleza de la base capaz de extraer un protón del sustrato en un proceso intermolecular.

#### *Cuarta*

Hemos caracterizado, en un estudio semiempírico AM1, ET relacionadas con la inactivación que sufre la enzima incubada *in vitro* durante la catálisis. Estas estructuras se encuentran estrechamente relacionadas con la etapa de enolización y suponen una primera explicación teórica de este comportamiento de la Rubisco. De los resultados obtenidos se deduce que hay una serie de estructuras parecidas en las cuales un pequeño desplazamiento de un átomo de hidrógeno lleva al sistema hacia los procesos reactivos o hacia los procesos relacionados con la inactivación: el que lleva desde el ET de enolización a la formación de la Xilulosa en una reacción inversa a la de enolización y una retroenolización que lleva desde el enodiol a la obtención de las cetonas en el carbono 3: 3-ceto-Ribitol y 3-ceto-Arabinitol, que son los tres inhibidores encontrados experimentalmente.

#### *Quinta*

Hemos caracterizado ET correspondientes a la carboxilación de diversos modelos moleculares que representan al sustrato de la Rubisco en su forma enodiólica. Estas ET se muestran invariantes respecto al nivel de cálculo utilizado y también respecto al modelo molecular empleado para obtenerlas. Su geometría es superponible a la del ET análogo experimentalmente determinado, así como muy parecida a la de las ET obtenidas en la etapa de enolización.

#### *Sexta*

Hemos caracterizado ET correspondientes a la oxigenación de diversos modelos moleculares que representan al sustrato de la Rubisco en su forma enodiólica. Estas ET se muestran invariantes respecto al nivel de cálculo utilizado y también respecto al modelo molecular empleado para obtenerlas. Hemos obtenido un ET en estado triplete correspondiente al proceso de oxigenación y otro ET en estado singlete, de mayor energía, correspondiente a la ruptura del enlace O-O asociada a un proceso posterior a la etapa de oxigenación. La geometría del ET del mecanismo molecular de oxigenación es superponible a la del ET análogo experimentalmente determinado para el proceso de carboxilación.

### *Séptima*

Una comparación entre las ET caracterizadas para los procesos de enolización, carboxilación y oxigenación pone de manifiesto la semejanza entre ellas. De este hecho se deduce que el complejo sucesor de la enolización coincide con el complejo precursor tanto de carboxilación como de oxigenación. Las tres ET son semejantes a la estructura del ET análogo para la carboxilación y pueden sustituirse y colocarse en el centro activo sin que se detecten impedimentos estéricos. Estos hechos permiten una reinterpretación del postulado de Pauling: la enzima ha evolucionado de tal manera que su centro activo es complementario en forma a las ET (y a los correspondientes complejos precursores y sucesores) de los procesos químicos que cataliza.

### *Octava*

Los resultados expuestos en esta memoria constatan el postulado de la invariancia geométrica de la estructura de transición: las geometrías de las estructuras de transición y las fluctuaciones descritas por el vector de transición son invariantes respecto a la acción de solventes pasivos. El postulado de Pauling se puede reformular de la siguiente manera: el centro activo de la enzima se ha adaptado, por evolución, a la forma que tienen *in vacuo* las ET (y los correspondientes complejos precursores y sucesores) de los procesos químicos que cataliza. En la Rubisco el proceso de oxigenación es inevitable.