

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

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

Abril de 1991



## **CAPITOL 3**

# **RESULTATS I DISCUSSIO**



Al llarg d'aquest capítol presentarem els resultats obtinguts mitjançant diferents metodologies teòriques, en l'estudi del mecanisme d'acció catalítica de l'anhidrasa carbònica.

Com ja hem fet en la introducció dividirem el mecanisme d'actuació de l'anhidrasa carbònica en els mateixos cinc passos que estan representats en la figura 2 d'aquesta memòria. En un primer apartat d'aquest capítol, comentarem els resultats recollits en l'estudi de la desprotonació de l'aigua coordinada al  $Zn^{+2}$  per donar l'espècie catalíticament activa  $EZn^{II}(OH^-)$  (pas 5, figura 2). En un segon apartat, estudiarem la interacció del  $CO_2$  amb el centre actiu de l'enzim, l'atac nucleofílic del  $EZn^{II}(OH^-)$  al  $CO_2$  i la formació del bicarbonat (passos 1, 2, i 3, figura 2). En un tercer apartat mostrarem els resultats que hem obtingut sobre la inhibició aniònica de l'anhidrasa carbònica. Aquest treball ens ha servit com a pas previ per estudiar complexos pentacoordinats de zinc, com el que es forma en la darrera etapa del mecanisme. Per acabar, en el quart apartat presentarem l'estudi que hem fet d'aquesta darrera

etapa que correspon al bescanvi del bicarbonat per l'aigua (pas 4, figura 2). Aquest bescanvi permet recuperar l'enzim en condicions per recomençar el cicle catalític.

### 3.1 GENERACIO DE L'ESPECIE CATALITICAMENT ACTIVA

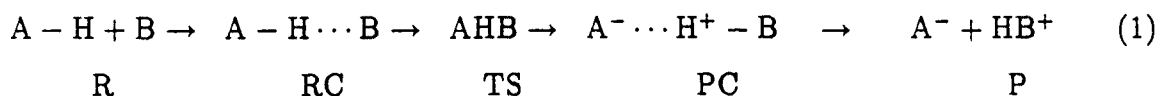
Una primera aproximació al centre actiu de l'enzim és considerar únicament el dicatió  $Zn^{+2}$ . Lògicament aquesta és una aproximació poc realista, però ens permet un estudi millor de les interaccions moleculars a un nivell de càlcul més alt que quan es tenen en compte d'alguna manera els lligands coordinats al zinc. Ens servirà, a més a més, per analitzar el paper catalític del catió. El següent nivell d'aproximació consisteix en incorporar lligands coordinats al metall.

Per això subdividirem aquest apartat en dos. En un de primer estudiarem la reacció de transferència protònica en el dímer d'aigua catalitzada per  $Zn^{+2}$  com a primera aproximació a la transferència protònica que té lloc en l'enzim. A més, compararem també els resultats que s'obtenen quan els catalitzadors són altres dicacions metàl·lics com ara el  $Be^{+2}$  o el  $Mg^{+2}$ , i també quan el catalitzador és el protó o una càrrega dipositiva situada a diferents distàncies del dímer d'aigua. En un segon apartat, tindrem en compte els lligands que el  $Zn^{+2}$  té coordinats a l'enzim mitjançant l'ús de diferents models de centre actiu com poden ésser el  $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)$  o bé el  $(ImH)_3Zn^{II}(H_2O)$ . També es veurà com la consideració de l'efecte de l'entorn millora notablement la descripció del sistema, que es fa més propera als resultats experimentals.

### 3.1.1 TRANSFERENCIA PROTONICA EN EL DIMER D' AIGUA CATALITZADA PER CATIONS DIVALENTS (Zn<sup>+2</sup>, Be<sup>+2</sup> i Mg<sup>+2</sup>)

La importància de les transferències protòniques en molts sistemes bioquímics ha estat àmpliament constatada. [365,366] Una de les transferències protòniques més elementals que es poden considerar és la que té lloc en el dímer d'aigua, que porta a la formació dels ions hidroxil i hidroni. Aquest procés en fase gasosa és molt costós des d'un punt de vista energètic, si bé es sap que es dona fàcilment en molts sistemes bioquímics (CA, CPA, LADH, ...) que disposen de dications metàl·lics en el seu centre actiu. Cal pensar, doncs, que els dications són capaços de catalitzar la transferència protònica en el dímer d'aigua.

Un esquema general de la transferència protònica entre les espècies AH i B es pot escriure com:



on R, RC, TS, PC, i P representen els reactius, el complex dels reactius, l'estat de transició, el complex dels productes, i els productes, respectivament.

Per al dímer d'aigua, l'esquema (1) presenta RC, però no es troba ni TS ni tampoc PC. En aquest cas, l'energia augmenta uniformement des del RC inicial fins als ions separats. Quan un monocatió com el Li<sup>+</sup> s'incorpora al sistema, s'ha vist que si bé tot el perfil queda estabilitzat, encara no apareix cap PC. [367] Si el Li<sup>+</sup> es substitueix per un H<sup>+</sup> és té el sistema H(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub><sup>+</sup>. Per a aquest s'ha demostrat que la transferència protònica presenta un perfil en forma de U. [368-371] En aquest cas només es troba

un complex simètric en el que el protó que es transfereix es troba a mig camí entre els dos oxígens.

Segons ens consta, ningú ha estudiat la influència de dications en la transferència protònica en el dímer d'aigua, encara que es coneixen estudis que tracten de la influència de dications en altres transferències protòniques. Així Basch *et al.* [372] han estudiat la transferència protònica en el dímer d'imidazol sota la influència d'un dicatió  $Zn^{+2}$ . Aquests autors han trobat que en el dímer d'imidazol aïllat l'RC està més estabilitzat que el PC, mentre que en presència de  $Zn^{+2}$  el PC passa a ésser més estable que l'RC, fet que dóna lloc a una substancial disminució de la barrera energètica.

El que ens proposem és fer un estudi comparatiu del paper que juguen diferents dications en la transferència protònica en el dímer d'aigua, tenint en compte com a objectiu fonamental la comparació del paper catalític de diferents dications en aquests tipus de processos. Ens centrarem principalment en el  $Zn^{+2}$  donat que és el que està més relacionat amb el centre actiu de la CA. Compararem aquests resultats amb els obtinguts amb  $Be^{+2}$  i  $Mg^{+2}$ , i amb el cas més general d'una càrrega dipositiva situada a diferents distàncies del dímer d'aigua, per tal d'entendre els trets específics del  $Zn^{+2}$  en aquest tipus de processos.

L'estudi del procés senzill que es considera en aquest apartat ens ha servit també per dur a terme una discussió metodològica que ens serà útil a l'hora d'elegir la metodologia pel tractament de processos més complexos.

Es ben sabut que per a una descripció quantitativa de les transferències protòniques en sistemes carregats cal usar bases grans que incloguin funcions de polarització i funcions difuses. A més s'ha de procurar introduir correccions de correlació electrònica i energia de punt zero. [366,368-371,373] Ara bé, si la mida del sistema impedeix



arribar a uns nivells de càlcul tan sofisticats, i el que es cerca és un tractament semiquantitatiu, n'hi ha prou amb afegir funcions de polarització, i en el cas de què apareixin anions funcions difuses. [102,374-377] En el nostre estudi totes les espècies carregades són positives, i per això per arribar a un nivell de càlcul semiquantitatiu hem utilitzat una base (33321/3321/21/1) per al Zn, que és doble- $\zeta$  per als orbitals  $s$ ,  $p$ , i  $d$  de valència, i que inclou a més una funció de polarització  $f$ . Aquesta base ha estat construïda a partir de la base 3-21G, [304,308] recentment estesa als àtoms de la tercera i quarta files, i s'hi ha afegit una funció  $f$  d'exponent 1.3375. [378] Al mateix nivell s'han representat els altres àtoms (Be, Mg, i O), és a dir, a partir de la base 3-21G afegint-hi funcions de polarització  $d$  ( $\alpha_{Be}=0.4000$ , [379]  $\alpha_{Mg}=0.1750$ , i  $\alpha_O=0.8000$  [379]). A aquesta base l'hem anomenada 3-21G(d,f). A més, per tal de discutir la importància d'incloure-hi funcions de polarització i del desdoblament de les funcions de valència s'han fet càlculs amb bases menors. Així en primer lloc, hem utilitzat la base mínima MINI-3 [311,316] que no presenta funcions de base  $p$  per al Be, Mg, i Zn; en segon lloc, hem fet càlculs amb la base 3-21G sense funcions de polarització; i finalment hem portat a terme càlculs amb pseudopotencials. En aquest darrer cas, hem utilitzat els pseudopotencials de Hay i Wadt [326,327] per representar les capes internes del Zn i Mg, mentre que per als electrons de valència hem utilitzat funcions de base [3s,2p,5d/1s,1p,2d] per al Zn i [3s,3p/1s,1p] per al Mg, així com la base 4-31G [299] per a l'hidrogen i l'oxigen.

Els resultats obtinguts s'han dividit en tres seccions. En la primera es presenta la transferència protònica en els sistemes  $M^{+2}(H_2O)_2$ ; en la segona s'analitza el paper catalític del catió; i en la darrera es fa una discussió metodològica de les diferents bases emprades en els càlculs.

### 3.1.1.1 Transferència protònica en el sistema $M^{+2}(H_2O)_2$

En aquesta secció presentarem l'estudi de la transferència protònica en el dímer d'aigua catalitzada per cations divalents. Per a la reacció amb cada catió metàl·lic hem localitzat un intermedi i un estat de transició. Tot seguit comentarem aquestes estructures, i més endavant discutirem els perfils energètics que s'obtenen per als diferents cations estudiats. Tots els resultats que es presenten a continuació han estat obtinguts amb la base 3-21G(d,f).

#### 3.1.1.1.1 Intermedis en la transferència protònica

La Taula II recull la distància del metall a l'oxigen, distàncies des dels oxígens al protó que es transfereix, ordres d'enllaç de Pauling per a aquests enllaços O-H i càrregues en el metall i en el fragment  $H_3O$ , per als diferents intermedis. Per tal de poder fer comparacions, també s'han inclòs en la Taula II els valors obtinguts per al sistema  $H(H_2O)_2^+$  i per al dímer d'aigua aïllat. Els ordres d'enllaç de Pauling han estat calculats a partir de l'expressió  $B = e^{\frac{R(1)-R(B)}{0.3}}$ . L'ordre d'enllaç per a l' $O_1-H_1$  està referit a la distància O-H en l'aigua ( $R(1)=0.963 \text{ \AA}$ ) i per al  $O_2-H_1$  està referit a la distància O-H en l'ió hidroni ( $R(1)=0.987 \text{ \AA}$ ). A més, les geometries de les espècies  $M^{+2}(H_2O)_2$  ( $M=Zn, Be, i Mg$ ) s'han dibuixat en la figura 5.

La geometria òptima 3-21G(d,f) per al sistema  $H(H_2O)_2^+$  mostra un enllaç d'hidrogen lineal i simètric, en el que el protó està situat entre els dos àtoms d'oxigen. Aquesta estructura pertany al grup puntual de simetria  $D_{2d}$ , amb els plans de les

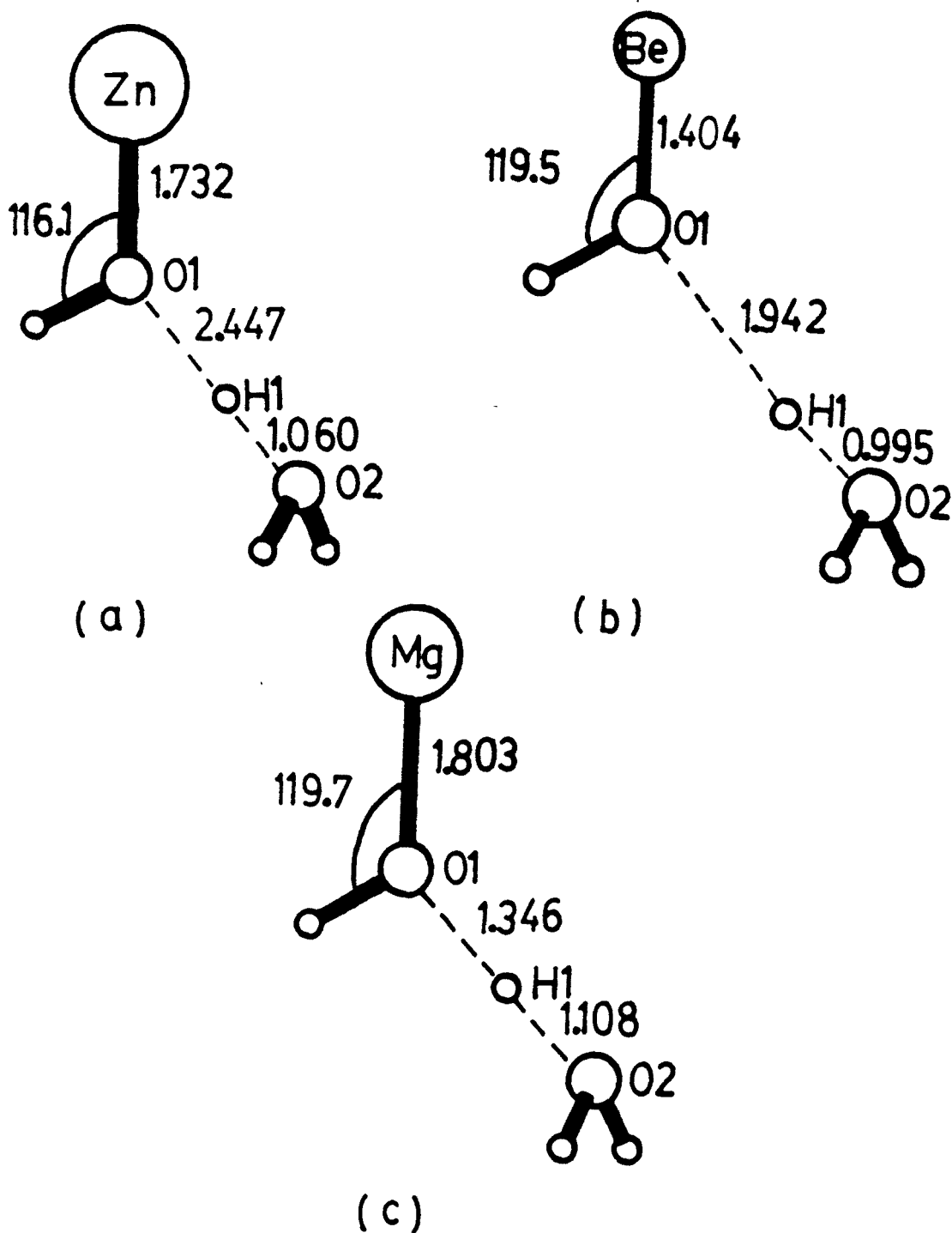


Figura 5: Estructures optimitzades dels intermedis de la transferència protònica obtingudes amb la base 3-21G(d,f): a)  $Zn^{+2}(H_2O)_2$ ; b)  $Be^{+2}(H_2O)_2$ ; i c)  $Mg^{+2}(H_2O)_2$ .

Taula II: Paràmetres geomètrics més significatius, ordres d'enllaç de Pauling (B), i càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i el fragment  $H_3O$  ( $q_{(H_3O)}$ ) per als intermedis  $M^{+2}(H_2O)_2$ , obtinguts amb la base 3-21G(d,f). Les distàncies són en Å i les càrregues en unitats atòmiques.

Ió	$r(MO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$B(O_1H_1)$	$B(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$
$Zn^{+2}$	1.732	1.447	1.060	0.199	0.784	1.568	0.869
$Be^{+2}$	1.404	1.942	0.995	0.001	0.975	1.275	0.939
$Mg^{+2}$	1.803	1.346	1.108	0.279	0.668	1.556	0.834
$H^+$	0.969	1.194	1.194	0.463	0.502	0.523	0.800
-	-	0.967	1.894	0.987	0.049	-	-

dues molècules d'aigua girats  $90^\circ$  un respecte a l'altre. L'estructura d'aquest complex depèn fortament del conjunt de base i del nivell de càlcul emprat. Càlculs previs de gran nivell mostren un complex simètric d'enllaç d'hidrogen. [369,371] Quan l'hidrogen és substituït per dications, la geometria del mínim canvia i la simetria es destrueix, tal com es pot veure en la Taula II a partir dels valors de les distàncies entre els dos oxígens i l'hidrogen que es transfereix. Els intermedis que es troben per al sistema  $H(H_2O)_2^+$  i per als  $M^{+2}(H_2O)_2$  presenten una natura diferent. Mentre que en el primer cas el protó està mig transferit, en les espècies  $M^{+2}(H_2O)_2$  la transferència protònica ja s'ha fet i ja s'ha format l'espècie  $H_3O^+$ . A partir dels ordres d'enllaç de Pauling i de les distàncies  $O_1-H_1$  per als diferents complexos, es pot veure que tant per al  $Zn^{+2}$  com per al  $Mg^{+2}$  es manté un cert caràcter enllaçant entre els àtoms d' $O_1$  i  $H_1$ . Per contra, per al complex de  $Be^{+2}$  aquest enllaç està totalment trencat. Això està relacionat també amb el fet que la distància entre el Be i l' $O_1$  és la més curta en tots aquests intermedis.

Per tal de poder referir aquesta transferència protònica a l'esquema (1) és necessari

Taula III: Paràmetres geomètrics més significatius, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i el fragment  $H_3O$  ( $q_{(H_3O)}$ ), i barreres energètiques referides als intermedis per als estats de transició en els sistemes  $M^{+2}(H_2O)$ , obtinguts amb la base 3-21G(d,f). Les distàncies són en Å, les energies en kcal/mol i les càrregues en unitats atòmiques.

Ió	$\Delta E$	$r(MO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$
$Zn^{+2}$	9.5	1.704	2.846	0.988	1.433	0.993
$Be^{+2}$	0.1	1.397	2.187	0.990	1.252	0.960
$Mg^{+2}$	14.0	1.746	3.019	0.988	1.405	0.995

desdoblar el sistema  $M^{+2}(H_2O)_2$  en  $M^{+2}(H_2O)$  i  $H_2O$ . Amb aquest esquema al cap, aquests intermedis es corresponen amb les espècies que hem anomenat PC. Es a dir, no es detecta la presència ni de RC ni de TS en la transferència protònica estudiada. Mirant la càrrega del grup  $H_3O$  en la Taula II, es pot veure que la transferència protònica en els sistemes  $M^{+2}(H_2O)_2$  està més avançada per al complex de  $Be^{+2}$ .

### 3.1.1.1.2 Estats de transició en la transferència protònica

Per a tots els sistemes  $M^{+2}(H_2O)_2$  estudiats, hem trobat un estat de transició, a diferència del que passa en el sistema  $H(H_2O)_2^+$ . Les geometries dels estats de transició i els vectors de transició es troben dibuixats en la figura 6. Les barreres energètiques, geometries, càrregues sobre el metall i sobre el fragment  $H_3O$  es mostren en la Taula III.

Quan es comparen les geometries dels estats de transició amb les que es troben per als intermedis, es pot veure que l'ió  $H_3O^+$  ja format en gran part en els intermedis,

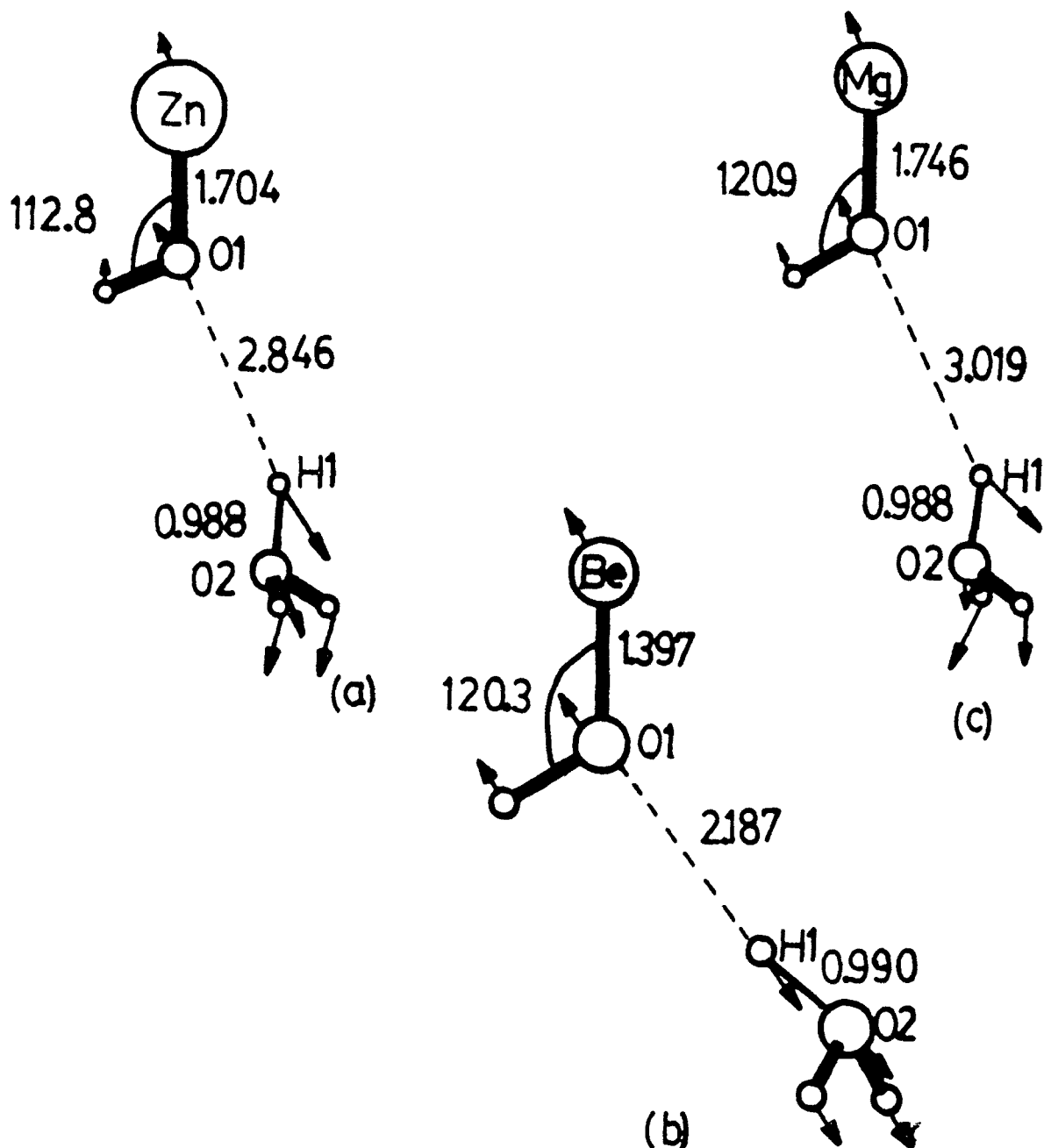


Figura 6: Estructures dels estats de transició i vector de transició per a la transferència protònica calculats amb la base 3-21G(d,f): a)  $Zn^{+2}(H_2O)_2$ ; b)  $Be^{+2}(H_2O)_2$ ; i c)  $Mg^{+2}(H_2O)_2$ .

es troba ara molt més allunyat de la resta del sistema. Així mateix, quan més llarga és la distància entre aquests dos fragments catiónics en l'intermedi, més curta és en l'estat de transició. Els ordres d'enllaç dels enllaços O-H que es trenquen i es formen juntament amb les càrregues sobre el fragment  $\text{H}_3\text{O}$ , porten a la mateixes conclusions.

Un altre aspecte interessant és que les distàncies  $\text{M}-\text{O}_1$  s'han escurçat en passar de l'intermedi a l'estat de transició, el que està relacionat amb el fet que la transferència de càrrega cap al  $\text{Zn}^{+2}$  és més important en l'estat de transició, tal com es confirma a partir dels valors de la càrrega sobre el metall en les Taules II i III.

El vector propi associat a l'únic valor propi negatiu del Hessià dibuixat en la figura 6 indica que aquests estats de transició no corresponen al procés de transferència protònica, sinó al procés de separació entre les dues espècies carregades  $\text{MOH}^+$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

### 3.1.1.1.3 Perfils de reacció en la transferència protònica

Els perfils energètics per a la reacció de transferència protònica estan representats en la figura 7. La coordenada de reacció  $R_c$  s'ha elegit com la diferència entre les distàncies  $\text{O}_1-\text{H}_1$  i  $\text{O}_2-\text{H}_1$ . Com ja s'ha indicat, en passar de l'intermedi a l'estat de transició la distància metall-oxigen disminueix, el que fa recomanable la seva optimització. Si no es fa així la barrera energètica augmenta i la transferència electrònica es més petita. En la figura 7, les energies estan referides al sistema  $\text{M}^{+2}(\text{H}_2\text{O})$  i  $\text{H}_2\text{O}$  per al qual la coordenada de reacció ( $R_c$ ) té un valor de  $-\infty$ , mentre que per als productes finals,  $\text{MOH}^+$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $R_c = \infty$ . Si l'energia fos referida al dímer d'aigua i el catió metàl·lic per separat, les energies de l'intermedi serien de respectivament

-160.0, -235.1 i -137.7 kcal/mol, per al  $Zn^{+2}$ ,  $Be^{+2}$  i  $Mg^{+2}$ .

A la figura 7 es pot veure clarament com la forma simètrica del sistema  $H(H_2O)_2^+$  desapareix en els sistemes  $M^{+2}(H_2O)_2$ . Les corbes per al  $Mg^{+2}$  i  $Zn^{+2}$  segueixen una tendència similar a la corba  $H(H_2O)_2^+$  des dels reactius fins a l'estat de transició. En canvi, per al  $Be^{+2}$  la corba es diferencia des d'un bon principi. Els valors de  $R_c$  en els intermedis són 0.000 per al  $H(H_2O)_2^+$  i 0.387, 0.947 i 0.238 per als sistemes de Zn, Be i Mg respectivament. Com ja s'ha indicat en la secció anterior, l'estat de transició per al  $Mg^{+2}$  ( $R_c = 2.031$ ) es troba més avançat que el del  $Zn^{+2}$  ( $R_c = 1.858$ ), i aquest a la vegada està més avançat que el de  $Be^{+2}$  ( $R_c = 1.197$ ). Això es pot explicar observant la figura 7, on es veu que les posicions de l'estat de transició estan més avançades en la coordenada de reacció quan menys exotèrmica és la reacció, en concordància amb el principi de Hammond. Algunes diferències s'aprecien quan es compara els perfils energètics obtinguts per als tres dications amb el cas més general de perfil de doble pou que es troba habitualment en les transferències protòniques, i que hem representat en l'esquema (1). En primer lloc, i com ja s'ha mencionat, no apareix ni RC ni TS per a la transferència protònica. En segon lloc, tot el procés és altament exotèrmic, amb un TS que correspon a la separació entre dues espècies carregades ( $H_3O^+$  i  $MOH^+$ ).

La semblança entre els perfils de  $Mg^{+2}$  i  $Zn^{+2}$  suggereix que la capa  $3d^{10}$  del  $Zn^{+2}$  no intervé en el procés de transferència protònica. A més, les poblacions de Mulliken per als orbitals  $3d$  no canvien al llarg de la coordenada de reacció. Unicament s'hi veuen petits canvis en la població de l'orbital  $d_{z^2}$ . Ja s'havia assenyalat anteriorment [163,380] que els orbitals  $3d$  del Zn pertanyen al core i interaccionen mínimament amb els altres orbitals. Aquest punt es continuarà discutint més endavant. La transferència de càrrega va als orbitals  $s$  i  $p$  buits del metall.



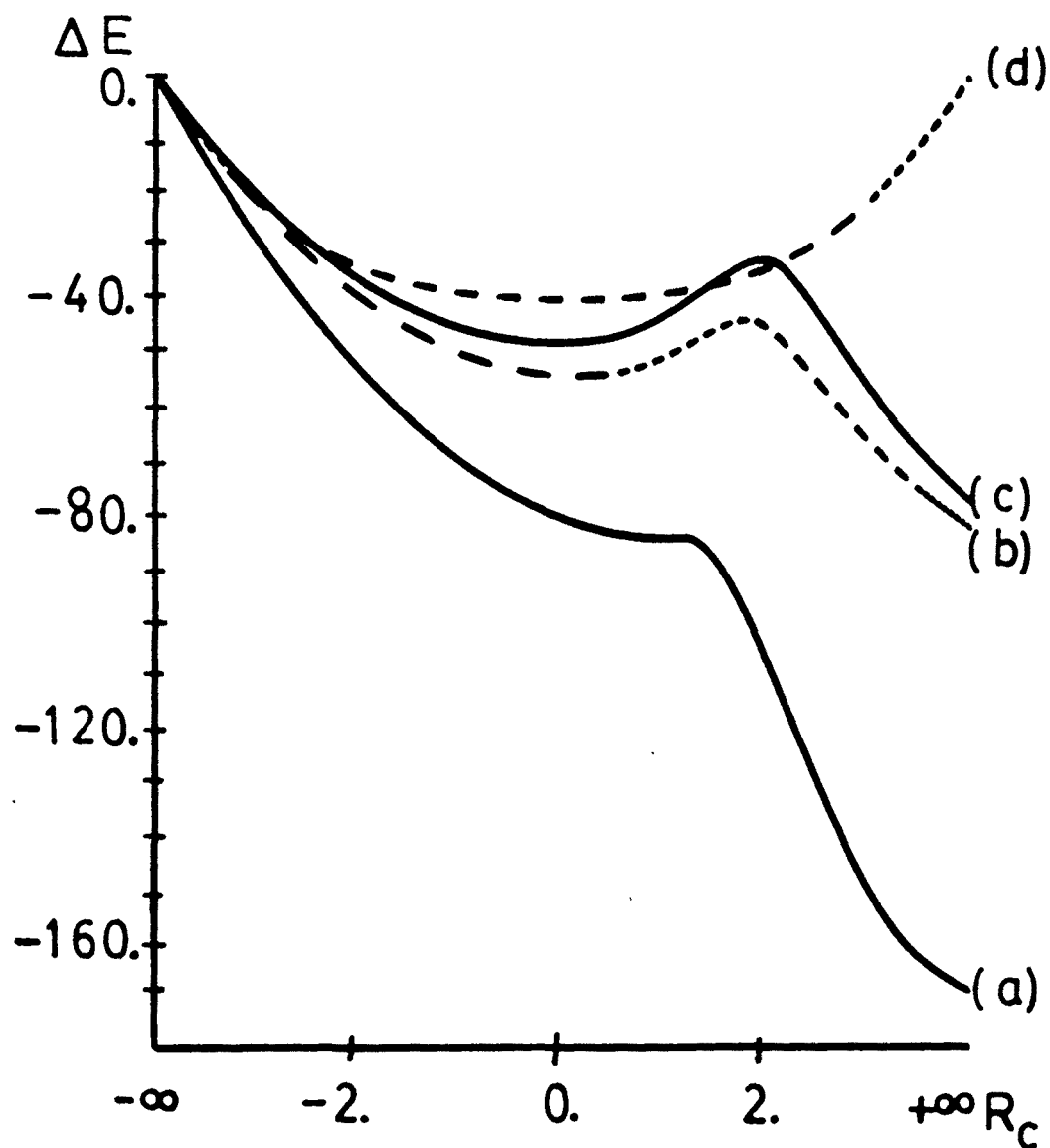


Figura 7: Perfils de reacció per a la transferència protònica en els sistemes  $M^{+2}(\text{H}_2\text{O})_2$  i en el  $\text{H}(\text{H}_2\text{O})_2^+$  obtinguts amb la base 3-21G(d,f): a)  $M=\text{Be}$ ; b)  $M=\text{Zn}$ ; c)  $M=\text{Mg}$ ; i d)  $M=\text{H}$ .  $R_c$  en Å i  $\Delta E$  en kcal/mol.

#### 3.1.1.1.4 Paper catalític del catió

La transferència protònica en el dímer d'aigua aïllat és difícil degut a dues raons: per una banda, és energèticament molt costós formar els ions  $\text{OH}^-$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$  i per altra, ho és també la seva separació. Per exemple, al nivell 3-21G(d,f) s'obtenen 284 kcal/mol de diferència entre el dímer d'aigua i els ions infinitament separats. Per contra, la transferència protònica es veu afavorida si un catió monovalent catalitza el procés. [367,381] En aquest cas, no s'ha de produir una separació de càrrega, sinó més aviat una migració de la càrrega positiva, que és menys costosa des d'un punt de vista energètic. La separació entre el dipol que es crea i la càrrega positiva no és tan difícil com la separació de dues càrregues de signe contrari. En particular, si l'ió monovalent és el  $\text{H}^+$  la diferència entre l'intermedi i els productes infinitament separats ( $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) és de 41 kcal/mol. Si la transferència protònica està catalitzada per un dicatíó, el procés encara es veu més afavorit, el que es pot atribuir a dues raons principals. La primera, és deguda a què la càrrega positiva es deslocalitza en els dos fragments, i la segona, al fet que la presència d'una càrrega positiva en cada fragment ajuda a la seva separació cap als productes finals. Això es tradueix en la gran exotermicitat del procés per als tres cations estudiats en el present treball.

L'efecte catalític dels metalls divalents en la transferència protònica en el dímer d'aigua és la suma de l'efecte electrostàtic i el de transferència de càrrega. Per tal de separar aquests dos factors, hem simulat els cations per una càrrega dipositiva situada a diferents distàncies de l'àtom d'oxigen (1.9, 1.6 i 1.4 Å). D'aquesta manera, ens és possible estudiar l'efecte electrostàtic pur. La presència d'una càrrega dipositiva produeix una important polarització del núvol electrònic del dímer d'aigua. En la figura 8, es presenta la diferència de densitat electrònica entre el dímer d'aigua, i la mateixa estructura quan s'ha col.locat una càrrega dipositiva a 1.4 Å de l'àtom  $\text{O}_1$ . Es

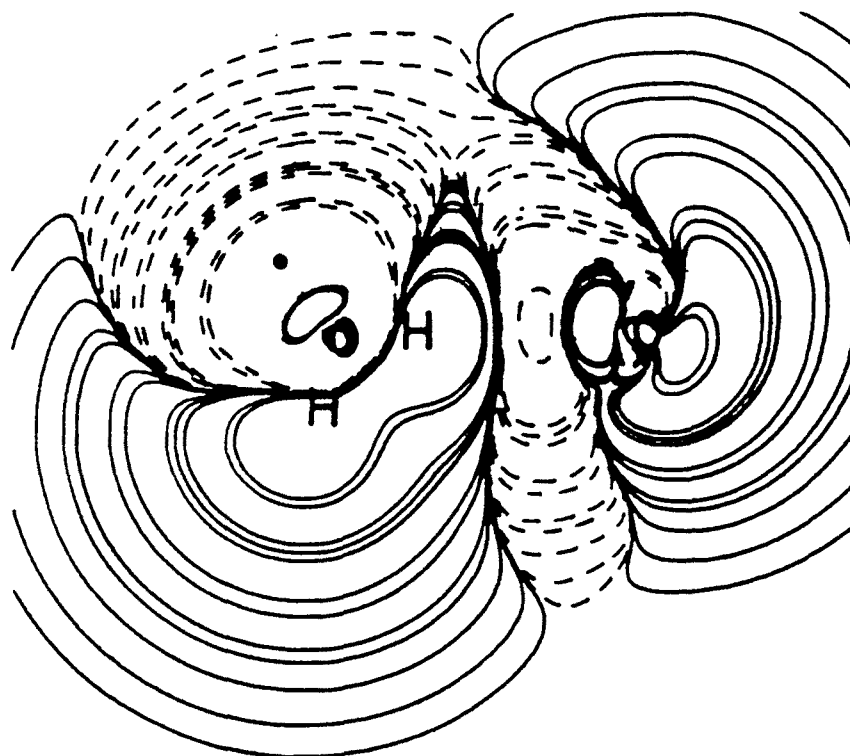
Taula IV: Forces que actuen sobre els dos enllaços O-H, juntament amb els índexs de Mulliken en el complex dímer d'aigua-càrrega dipositiva calculats amb la base 3-21G(d,f). La càrrega s'ha situat a una distància  $d$  de l'oxigen. Les distàncies venen expressades en Å, i les forces i índexs de Mulliken en unitats atòmiques.

$d$	$F(O_1H_1)$	$F(O_2H_1)$	$P(O_1H_1)$	$P(O_2H_1)$
$\infty$	0.0000	0.0000	0.2459	0.0506
1.9	0.0199	-0.0141	0.1999	0.0877
1.6	0.0313	-0.0197	0.1749	0.0967
1.4	0.0437	-0.0249	0.1484	0.1045

pot observar un increment de densitat electrònica al voltant de l' $O_1$  i una disminució en els hidrògens adjacents. La càrrega en el fragment que acabarà essent l'ió hidroxil, ha canviat, per la presència de la càrrega dipositiva, de -0.479 a -0.693. Per tant, com a primera conseqüència de la polarització, la separació entre la càrrega positiva i la negativa es troba més avançada. Com a segona conseqüència, es produeix un afebliment de l'enllaç  $O_1-H_1$  i un enfortiment de l'enllaç d'hidrogen  $O_2-H_1$ , tal com es pot veure a partir de les poblacions de Mulliken de la Taula IV. Els canvis en la força dels enllaços són tan més acusats quan més propera situem la càrrega dipositiva.

Els canvis en els enllaços venen reflectits també en els gradients que actuen sobre les dues distàncies O-H, i que es presenten en la Taula IV.

Per al dímer d'aigua, a la geometria optimitzada, els gradients són zero. En contrast, quan una càrrega dipositiva es situa prop de l'oxigen, apareixen forces que tendeixen a augmentar la distància de l'enllaç  $O_1-H_1$  i a disminuir la de l'enllaç d'hidrogen  $O_2-H_1$ . L'origen d'aquestes forces es pot trobar en l'atracció entre els oxígens que tenen una certa càrrega parcial negativa, i la càrrega dipositiva, així com



\*

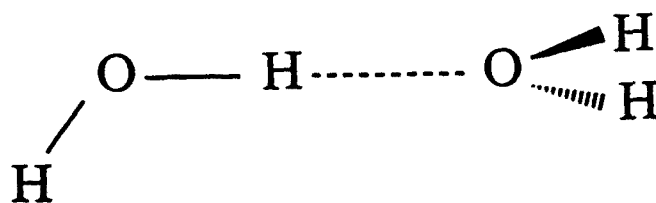


Figura 8: Dibuix de la diferència de densitat electrònica entre el dímer d'aigua optimitzat, i la mateixa estructura quan s'ha situat una càrrega d'positiva a 1.4 Å. Els valors negatius estan representats mitjançant línies ratllades, i els positius amb línies contínues. • indica la situació de la càrrega d'positiva.

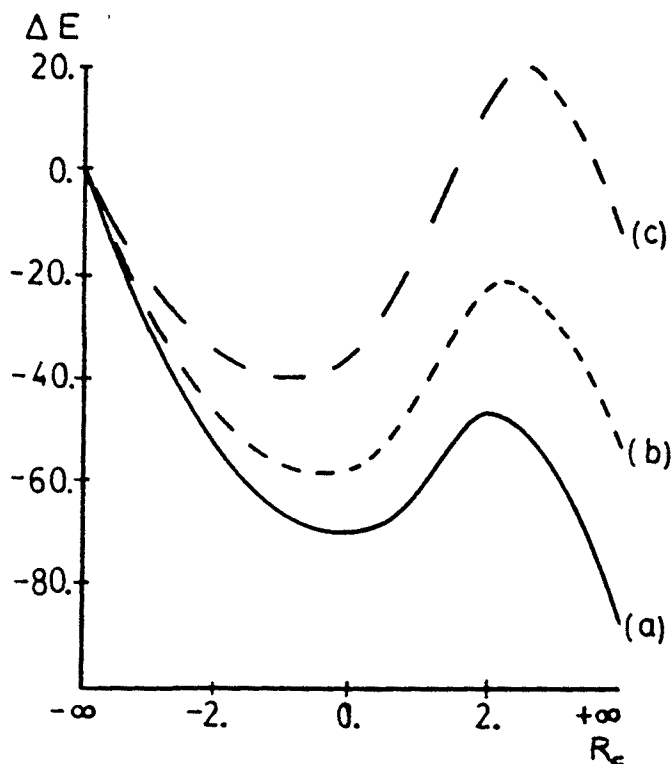


Figura 9: Perfils energètics per a la transferència protònica en els sistemes càrrega dipositiva-(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, obtinguts amb la base 3-21G(d,f) per a diferents distàncies càrrega-oxigen: a) d=1.4 Å; b) d=1.6 Å; i c) d=1.9 Å. R<sub>c</sub> ve donada en Å i ΔE en kcal/mol.

en la repulsió entre la càrrega dipositiva i el protó que es transfereix. Aquestes forces són més grans quan més curta és la distància entre la càrrega dipositiva i l'oxigen, el que obliga al dímer d'aigua a relaxar-se, i per tant en presència de la càrrega dipositiva la geometria optimitzada és una altra.

Els diferents perfils energètics obtinguts per les distàncies càrrega-oxigen de 1.4, 1.6 i 1.9 Å es representen en la figura 9. En la Taula V es donen els paràmetres geomètrics i les energies relatives d'intermedis i estats de transició.

Mirant la figura 9, es pot veure que els perfils energètics són qualitativament semblants als obtinguts per als sistemes en els que intervenen dicacions metàl·lics, si bé els estats de transició per a les càrregues dipositives es troben ara retardats al llarg

Taula V: Energies relatives dels intermedis referides als reactius separats ( $\text{H}_2\text{O} \cdot (+2)$  i  $\text{H}_2\text{O}$ ), dels estats de transició referides als intermedis (barreres energètiques), distàncies dels oxígens al protó que es transfereix, i càrregues sobre el fragment  $\text{H}_3\text{O}$ , quan hem situat càrregues dipositives a diferents distàncies del dímer d'aigua, obtingudes amb la base 3-21G(d,f). Les energies venen expressades en kcal/mol, les distàncies en Å, i la càrrega en unitats atòmiques.

Distància	Espècies	$\Delta E$	$r(\text{O}_1\text{H}_1)$	$r(\text{O}_2\text{H}_1)$	$q(\text{H}_3\text{O})$
1.9	Mínim	-38.9	1.032	1.481	0.677
	TS	56.0	3.743	0.982	1.000
1.6	Mínim	-50.0	1.178	1.230	0.788
	TS	28.3	3.323	0.982	0.998
1.4	Mínim	-68.1	1.473	1.047	0.886
	TS	14.0	3.007	0.982	0.995

de la coordenada de reacció.

Una primera interpretació de la diferència de comportament entre  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Be}^{+2}$ , i  $\text{Mg}^{+2}$ , s'obté d'aquests resultats amb una càrrega dipositiva a distàncies diferents de l'àtom d'oxigen. Si ens fixem en les distàncies metall-oxigen per als intermedis en la Taula II, que són de 1.732 pel  $\text{Zn}^{+2}$ , 1.404 pel  $\text{Be}^{+2}$  i 1.803 Å pel  $\text{Mg}^{+2}$ , veiem que es corresponen amb l'ordenació dels cations segons la barrera energètica per les transferències protòniques. Ara bé, aquesta semblança qualitativa no és tal quan passem al terreny quantitatiu. Per exemple, una càrrega s'ha de situar a 1.4 Å per tal que el perfil sigui similar al del procés catalitzat per  $\text{Mg}^{+2}$ , on la distància Mg-O en el intermedi és aproximadament 0.4 Å més llarga. Aquest fet es pot observar també a partir de les càrregues en el fragment  $\text{H}_3\text{O}$  i de les distàncies  $\text{O}_1\text{-H}_1$  i  $\text{O}_2\text{-H}_1$  en els intermedis i estats de transició. Això demostra clarament que per interpretar la transferència protònica s'ha de tenir en compte no només l'efecte electrostàtic sinó també l'efecte de transferència de càrrega. El metall divalent no actua només com una càrrega dipositiva, sinó que també actua com a àcid de Lewis, acceptant electrons en els seus orbitals *s* i *p* buits. Aquesta transferència electrònica es donarà més fàcilment quan els orbitals *s* i *p* del dicatió metàl·lic estiguin més propers als orbitals donadors del complex  $(\text{H}_2\text{O})_2$ , de tal forma que es facilita la transferència protònica. Així, la diferència observada entre els tres metalls es pot relacionar amb el valor de les energies dels orbitals *s* i *p* del dicatió, que es troben recollides en la Taula VI. Per al  $\text{Zn}^{+2}$  les energies d'aquests orbitals es mouen entre les del  $\text{Be}^{+2}$  i del  $\text{Mg}^{+2}$ , encara que són notablement més properes a les del  $\text{Mg}^{+2}$ . Per tant, el diferent comportament com a àcids de Lewis de cada catió, ajuda també a explicar els diferents resultats obtinguts per cadascun d'ells. El seu comportament prové a la vegada de la component electrostàtica i del caràcter d'àcid de Lewis.

Per tal de tenir una idea més quantitativa de les contribucions electrostàtica i de

Taula VI: Energies dels orbitals de valència *s*, *p*, i *d* per als dications metàl·lics (en eV) computades amb la base 3-21G(d,f).

Ió	Orbital	Energia
$\text{Zn}^{+2}$	4p	-10.63
	4s	-15.74
	3d	-37.19
$\text{Be}^{+2}$	2p	-14.02
	2s	-17.95
$\text{Mg}^{+2}$	3p	-10.40
	3s	-14.61



Taula VII: Descomposició de Morokuma de l'energia en els intermedis  $M^{+2}(H_2O)_2$  calculada amb la base 3-21G(d,f). Els dos fragments considerats són l'ió metàl·lic i el dímer d'aigua. Les energies venen donades en kcal/mol.

	$\Delta E$	$\Delta E_{def}$	$\Delta E_{INT}$	ES	PL	EX	CT	MIX	ES+PL	$\Delta E_{dic}$
Zn <sup>+2</sup>	-160.0	67.1	-227.8	-181.3	-60.2	65.4	-33.3	-17.8	-241.5	-211.8
Be <sup>+2</sup>	-235.1	112.3	-347.4	-249.5	-118.2	58.0	-55.0	17.3	-367.7	-361.3
Mg <sup>+2</sup>	-137.7	55.2	-192.8	-148.3	-44.4	20.4	-28.9	-0.7	-192.7	-186.7

transferència de càrrega, hem dut a terme una descomposició de l'energia d'interacció en els intermedis, mitjançant el mètode de descomposició de Morokuma. [382-387] Els dos fragments considerats han estat el catió i el dímer d'aigua. En la Taula VII es mostren els resultats de la descomposició. El terme d'energia d'estabilització ( $\Delta E$ ) es descomposa en dos termes. El primer correspon a la deformació del dímer d'aigua en els intermedis ( $\Delta E_{def}$ ), i el segon a la interacció entre el fragment distorsionat i el dicatió ( $\Delta E_{INT}$ ). Aquest darrer es descomposa alhora en cinc termes, com són, l'electrostàtic (ES), el de polarització (PL), el de bescanvi (EX), el de transferència de càrrega (CT), i el de barreja (MIX). En la Taula VII també s'hi troba l'energia d'interacció entre una càrrega dipositiva i el dímer d'aigua ( $\Delta E_{dic}$ ) quan en l'intermedi s'ha substituït el dicatió metàl·lic per una càrrega dipositiva.

A la Taula VII es veu que encara que els termes electrostàtic total (ES + PL) i el de transferència de càrrega (CT) situen els dications en el mateix ordre, el terme

ES+PL és molt més important que el terme CT. Tal com s'esperava, el terme EX disminueix quan es passa del  $\text{Be}^{+2}$  al  $\text{Mg}^{+2}$  degut a l'increment en la distància metall-oxigen. Per contra, aquest terme creix remarcablement per al  $\text{Zn}^{+2}$ , encara que les distàncies Mg-O i Zn-O són del mateix ordre. Aquest fet s'ha d'atribuir a la repulsió electrònica creada per la capa  $3d^{10}$  plena del Zn. Un altre comportament especial del  $\text{Zn}^{+2}$  es pot observar quan es comparen els termes ES+PL i  $\Delta E_{\text{dic}}$  per als tres dications estudiats. La diferència entre aquests dos termes ens hauria de donar una primera aproximació de la importància de la polarització provocada per la distribució de càrrega del dímer d'aigua sobre el núvol electrònic del dicatió. Mentre que per al  $\text{Be}^{+2}$  i el  $\text{Mg}^{+2}$  aquesta diferència implica una estabilització d'aproximadament 6 kcal/mol, per al  $\text{Zn}^{+2}$  aquesta diferència és propera a 30 kcal/mol. Es troba doncs un efecte molt més important en el  $\text{Zn}^{+2}$  degut a la polarització més fàcil de la capa *d*. Aquests resultats indiquen que la simulació d'un dicatió per una càrrega dipositiva és acceptable en el cas del  $\text{Be}^{+2}$  i  $\text{Mg}^{+2}$ , on la polarització del dicatió pel dímer d'aigua és negligible, però que és una aproximació força menys acurada en el cas del  $\text{Zn}^{+2}$ .

Els resultats de la Taula VII permeten comparar els tres dications. El  $\text{Be}^{+2}$  és el més diferent de tots, tant des del punt de vista del terme ES com del de CT. Com ja hem assenyalat en la secció anterior, el  $\text{Zn}^{+2}$  i el  $\text{Mg}^{+2}$  tenen un comportament més similar. En qualsevol cas, es pot veure que aquesta similitud prové d'una certa compensació dels termes implicats. De fet, la capa  $3d^{10}$  plena confereix certes particularitats al dicatió zinc. Per una part, situa els orbitals *4s* i *4p* en el nivell adequat per a la catàlisi òptima de la transferència protònica. Per un altre costat, la capa  $3d^{10}$  augmenta el terme EX de forma considerable. Per acabar, cal assenyalat que malgrat que aquesta capa manté fixa la seva ocupació, hi ha un important efecte de polarització d'aquests orbitals que cal tenir en compte.

### 3.1.1.1.5 Consideracions metodològiques

Els resultats que hem presentat fins ara s'han obtingut amb la base 3-21G(d,f). Dins de les bases usades en aquest treball és l'única que incorpora funcions de polarització, les quals s'han mostrat essencials en la descripció quantitativa de processos de transferència protònica similars. [155,365,368-371,374-377]

En aquest apartat compararem els resultats obtinguts amb aquesta base amb els de les altres bases que hem descrit anteriorment. Per tal de fer un primer test de les diferents bases hem estudiat el sistema  $\text{H}(\text{H}_2\text{O})_2^+$ , per al qual es tenen dades experimentals. En la Taula VIII es compara el valor experimental amb els obtinguts amb diferents bases de l'energia d'estabilització del sistema  $\text{H}(\text{H}_2\text{O})_2^+$  referit als reactius  $\text{H}_3\text{O}^+$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Es pot veure que dins de les bases usades en el nostre estudi, la 3-21G(d,f) és la que dona un valor més proper a l'experimental, així que es demostra la seva validesa. A més a més, aquesta és l'única base que reproduïx la geometria piramidal de l' $\text{H}_3\text{O}^+$  confirmada teòricament amb bases més esteses. [388] Com es pot veure en la Taula VIII el millor resultat energètic s'obté al nivell MP2/6-311+G(2d,2p), si bé la realització de càlculs teòrics a aquest nivell és impensable en sistemes relativament grans on hi hagi metalls de transició presents, degut a limitacions de tipus computacional.

A la Taula IX es presenta la geometria dels intermedis, l'energia d'estabilització respecte a les espècies  $\text{MOH}_2^{+2}$  i  $\text{H}_2\text{O}$  i la barrera energètica referida als intermedis per a cada dicatíon metàl·lic obtingudes amb les diferents bases utilitzades. Dels valors de la Taula es pot veure que amb la base 3-21G(d,f) en tots els casos el protó ja està transferit en els intermedis. El mateix s'observa quan s'usen pseudopotencials. Amb la base 3-21G la transferència ja està feta en el cas del  $\text{Zn}^{+2}$  i del  $\text{Be}^{+2}$ , si bé no s'ha acabat del tot en el cas del  $\text{Mg}^{+2}$ . Finalment, la base MINI-3 dona que en tots els

Taula VIII: Energies d'estabilització per al sistema  $H_5O_2^+$  referides a les espècies  $H_3O^+$  i  $H_2O$  en kcal/mol.

Base	$\Delta E$
3-21G(d,f)	40.1
3-21G	52.6
Pseudop.	43.9
MINI-3	51.5
MP2/6-311+G(2p,2d)	34.0 <sup>a</sup>
Exp.	31.6-36. <sup>b</sup>

(a) De la referència [373] (b) De les referències [389-392]

casos el protó encara no està transferit.

Comparant els resultats obtinguts amb pseudopotencials i amb la base 3-21G amb els de la base 3-21G(d,f), es pot constatar com ambdós reproduïen molt bé els perfils energètics 3-21G(d,f), i són qualitativament bons per obtenir les geometries dels intermedis. Les petites diferències que apareixen poden ésser degudes al fet que en els pseudopotencials només els orbitals *d* estan desdoblats, i que en les dues bases no s'hi han inclòs funcions de polarització. En qualsevol cas, les conclusions extretes a partir dels resultats 3-21G(d,f) són les mateixes que les que es poden treure del càlcul amb pseudopotencials o amb la base 3-21G.

Un altre fet remarcable és que la base MINI-3 dóna resultats força diferents dels que s'obtenen amb les altres tres bases. La diferència és especialment remarcable en el cas el  $Be^{+2}$ . La base MINI-3 no té funcions *2p* (Be), *3p* (Mg), o *4p* (Zn), i per tant no pot tenir en compte convenientment el caràcter d'àcid de Lewis dels dications. Per

Taula IX: Energies d'estabilització ( $\Delta E$ ) relatives als reactius separats, barreres energètiques ( $\Delta E^\ddagger$ ) respecte dels intermedis, i distàncies dels oxígens al protó que es transfereix, per als intermedis, obtinguts amb les diferents bases assenyalades. Les energies relatives es donen en kcal/mol i les distàncies en Å.

Ió	Base	$\Delta E$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$\Delta E^\ddagger$
$Zn^{+2}$	3-21G(d,f)	-53.3	1.447	1.060	9.5
	3-21G	-59.4	1.275	1.137	16.6
	Pseudop.	-47.3	1.369	1.037	11.8
	MINI-3	-43.4	1.112	1.329	35.0
$Be^{+2}$	3-21G(d,f)	-82.8	1.942	0.995	0.1
	3-21G	-84.3	1.708	1.006	0.8
	MINI-3	-53.5	1.183	1.232	22.1
$Mg^{+2}$	3-21G(d,f)	-47.1	1.346	1.108	14.0
	3-21G	-51.4	1.151	1.255	21.8
	Pseudop.	-42.8	1.381	1.065	19.6
	MINI-3	-37.9	1.080	1.394	51.4

això falla en la descripció d'aquesta transferència protònica, degut a la importància dels orbitals  $p$  de valència en aquest procés. L'error és més important en el  $\text{Be}^{+2}$  que en el  $\text{Zn}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ , perquè tal com es mostra en la Taula VI, els orbitals  $p$  del  $\text{Be}^{+2}$  són molt baixos en energia, i per tant accepten electrons amb facilitat. Donat que la base MINI-3 no permet la transferència a aquests orbitals  $p$ , els resultats obtinguts amb aquesta base són molt similars als resultats de les càrregues dipositives. Cal aconsellar, per tant, la no utilització de la base MINI-3 en aquest tipus d'estudi. Els pseudopotencials de Hay i Wadt, i la base 3-21G poden ésser usats en sistemes grans, en els que la inclusió de funcions de polarització (base 3-21G(d,f)) suposi un cost computacional massa elevat.

#### 3.1.1.1.6 Discussió

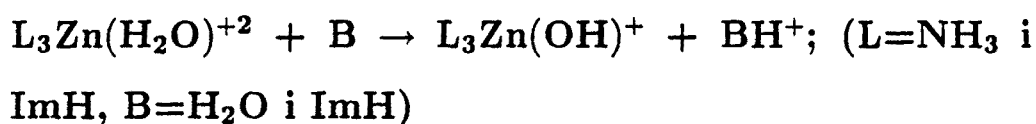
En aquesta secció hem mostrat que els dications poden catalitzar la transferència protònica en el dímer d'aigua, per donar lloc a la formació de les espècies  $\text{MOH}^+$  que són necessàries en molts de processos bioquímics. La presència d'un catió  $\text{M}^{+2}$  ( $\text{M}=\text{Zn}$ ,  $\text{Be}$ , i  $\text{Mg}$ ) canvia el perfil en forma de U de la transferència protònica en l'espècie  $\text{H}(\text{H}_2\text{O})_2^+$ , de manera que acaba apareixent un doble pou asimètric. S'ha mostrat que el procés global és molt exotèrmic. L'efecte catalític dels ions metàl·lics es suma de dos efectes: l'electrostàtic i el de transferència de càrrega. Una anàlisi de Morokuma ens ha mostrat que d'aquests dos efectes l'electrostàtic és el més important. S'ha trobat que la mera presència de càrregues dipositives catalitza el procés, si bé la transferència de càrrega cap el metall és també important, de manera que els dications actuen també com a àcids de Lewis. Així mateix, s'ha determinat que les distàncies metall-oxigen i les diferències energètiques entre els orbitals  $s$  i  $p$  dels tres dications estudiats es correlacionen bé amb l'ordre energètic que segueixen els tres dications

per a les barreres d'aquesta transferència protònica.

S'ha vist com el  $Zn^{+2}$  presenta unes característiques intermitges entre el  $Be^{+2}$  i el  $Mg^{+2}$ , encara que és més semblant a aquest darrer. Els nostres resultats suggereixen que l'eficiència catalítica i l'especificitat del  $Zn^{+2}$  provenen més d'un comportament intermig que no pas d'un comportament extrem. La capa  $d$  plena del  $Zn^{+2}$ , que no participa directament en l'enllaç, situa els orbitals  $4s$  i  $4p$  buits en el nivell adequat per a la catàlisi. Per altra part, s'ha mostrat que els orbitals  $d$  són molt polaritzables i provoquen un important terme EX. Aquests dos factors tenen valors del mateix ordre, de manera que en tractar-se de dues contribucions de signe diferent a l'energia d'interacció, queden aproximadament cancel·lades. De la comparació dels cations se'n dedueix que la modelació del  $Zn^{+2}$  per un altre dicatió semblant com el  $Be^{+2}$  o el  $Mg^{+2}$ , que simplifiquen notablement els càlculs, no és una bona aproximació. Per això, tots els estudis posteriors a aquest preliminar s'han fet amb el catió  $Zn^{+2}$ .

S'ha de comentar que fins ara no hem considerat l'efecte dels lligands ni del solvent en l'esfera de coordinació del metall, encara que és segur que han de tenir-hi una contribució important, [116,117] i que poden modificar de forma significativa els resultats obtinguts per als dications aïllats. Aquests aspectes són els que anem a tractar en la propera secció.

### 3.1.2 ESTUDI DE LA TRANSFERENCIA PROTÓNICA



En aquesta secció ens acostarem un xic més al que és la transferència protònica en

la CA, donat que introduïrem l'efecte que tenen els lligands coordinats al  $Zn^{+2}$  considerant dos models de centre actiu de l'anhidrasa carbònica com són el  $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2}$  i el  $(ImH)_3Zn(H_2O)^{+2}$ . Estudiarem les transferències protòniques entre l'aigua coordinada al  $Zn^{+2}$  i un receptor (B) que serà una altra molècula d'aigua o un grup imidazol. D'aquesta manera pretenem modelar la desprotonació de l'aigua coordinada al  $Zn^{+2}$ , que dóna lloc a l'espècie activa  $EZn^{II}(OH^-)$ . [89,120,124]

Començarem estudiant la transferència en el sistema  $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2} + H_2O$  tant a nivell *ab initio* com semiempíric. A continuació estudiarem la transferència en el sistema  $(ImH)_3Zn(H_2O)^{+2} + H_2O$ , i per acabar presentarem el model més realista que és el que correspon a la reacció de transferència entre el  $(ImH)_3Zn(H_2O)^{+2}$  i l'*ImH*. En aquest darrer cas tant el model de centre actiu com el de receptor són molt propers als que tenim en l'enzim real. En contrapartida, degut a l'elevat nombre d'àtoms que intervenen, en els dos darrers casos s'ha hagut de treballar amb metodologia semiempírica.

### 3.1.2.1 Transferència protònica en el sistema $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2} + H_2O$

Com ja hem comentat en la introducció el  $Zn^{+2}$  no es troba mai com a un dicatió aïllat en els sistemes bioquímics, sinó que es troba coordinat a un conjunt de lligands que en un número variable entre quatre a sis solen estar a l'esfera de coordinació del metall. Això fa que el model de centre actiu que hem considerat en l'apartat anterior sigui poc realista. Molt més proper al que es troba en els sistemes biològics és el model d'enzim  $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2}$ , on referit a la CA, els tres grups  $NH_3$  simulen els tres grups histidínics (His-94, His-96 i His-119) que es coordinen directament al zinc. [78,79]



Anem doncs a estudiar en aquesta secció l'efecte que tenen els lligands en les geometries i perfils energètics dels intermedis i estats de transició per a la transferència protònica en el dímer d'aigua. Presentarem aquí dos tipus de càlculs: *ab initio* i semiempírics.

Les optimitzacions *ab initio* estan fetes amb la base 3-21G per a tots els àtoms excepte per als H dels  $\text{NH}_3$  per als que hem utilitzat la base STO-3G. [297,298] En aquest cas la distància N-H i l'angle  $\widehat{\text{HNH}}$  s'han mantingut fixos a 1.050 Å i 109.407° respectivament. A més s'han fet càlculs d'energia per a les estructures ja optimitzades a nivell 3-21G amb la base 3-21G(d,f), és a dir, a nivell 3-21G(d,f)//3-21G. Per construir la base 3-21G(d,f) s'ha partit de la base 3-21G que ja teníem, a la qual hem afegit funcions *f* per al Zn i *d* per al O i N. Per al Zn i l'O s'han agafat les mateixes funcions de polarització que en l'anterior secció, i per al N s'ha agafat una funció *d* d'exponent 0.800. Els càlculs semiempírics s'han dut a terme amb el programa AMPAC i amb el mètode AM1 ja comentats en el capítol de Mètode de Càlcul. En els càlculs AM1 no s'ha imposat cap restricció de geometria, de manera que les optimitzacions han estat completes. Cal mencionar també que els paràmetres AM1 per al Zn han aparegut recentment [154] i que no incorporen els orbitals *d*, donat que aquests orbitals són considerats com a part del core i no pas de valència.

Altres autors han determinat prèviament el valor de l'afinitat protònica (PA) per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{OH})^+$ . Concretament, usant pseudopotencials Kitchen i Allen han donat el valor de -167 kcal/mol per a la PA d'aquest complex, valor comparable al nostre 3-21G(d,f)//3-21G que és de -176 kcal/mol. Això demostra la similitud dels resultats que es poden obtenir amb les dues bases.

L'intermedi i l'estat de transició trobats en l'estudi de la transferència protònica en el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  es troben dibuixats en la figura 10, mentre que en

Taula X: Paràmetres geomètrics, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i en el fragment  $H_3O$  ( $q_{(H_3O)}$ ), i energies relatives referides als reactius per a les espècies  $(NH_3)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$ , obtingudes amb les bases 3-21G ( $\Delta E$ ) i 3-21G(d,f)//3-21G ( $\Delta E_p$ ). Les distàncies venen donades en Å, les càrregues en unitats atòmiques, i les energies relatives en kcal/mol.

Espècie	$r(ZnO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$	$\Delta E$	$\Delta E_p$
Reactius	1.927	0.949	$\infty$	1.314	-	0.	0.
INT	1.899	1.040	1.431	1.293	0.674	-39.0	-31.8
TS	1.804	3.812	0.980	1.167	0.999	17.6	23.2
Productes	1.751	$\infty$	0.974	1.193	1.000	-15.5	-6.0

la Taula X s'hi han recollit els paràmetres geomètrics més importants, les càrregues sobre l'àtom de zinc i sobre el grup  $H_3O$ , i les energies relatives referides als reactius per a les diferents espècies que intervenen en el procés.

Comparant els valors dels paràmetres geomètrics de les Taules II i X que corresponen als intermedis  $(NH_3)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$  i  $Zn(H_2O)_2^{+2}$ , es pot veure com l'enllaç Zn-O<sub>1</sub> s'ha allargat per efecte de la presència de lligands. Aquest increment en la distància, suposarà d'entrada una disminució de l'efecte electrostàtic, que com hem vist anteriorment depèn fortament de la distància Zn-O<sub>1</sub>. Per un altre costat, els valors en l'intermedi  $(NH_3)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$  de les distàncies O<sub>1</sub>-H<sub>1</sub> i O<sub>2</sub>-H<sub>1</sub>, juntament amb els seus ordres d'enllaç de Pauling ( $B(O_1-H_1)=0.774$  i  $B(O_2-H_1)=0.228$ ) ens permeten veure que el protó H<sub>1</sub> està menys transferit en l'intermedi  $(NH_3)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$  que en

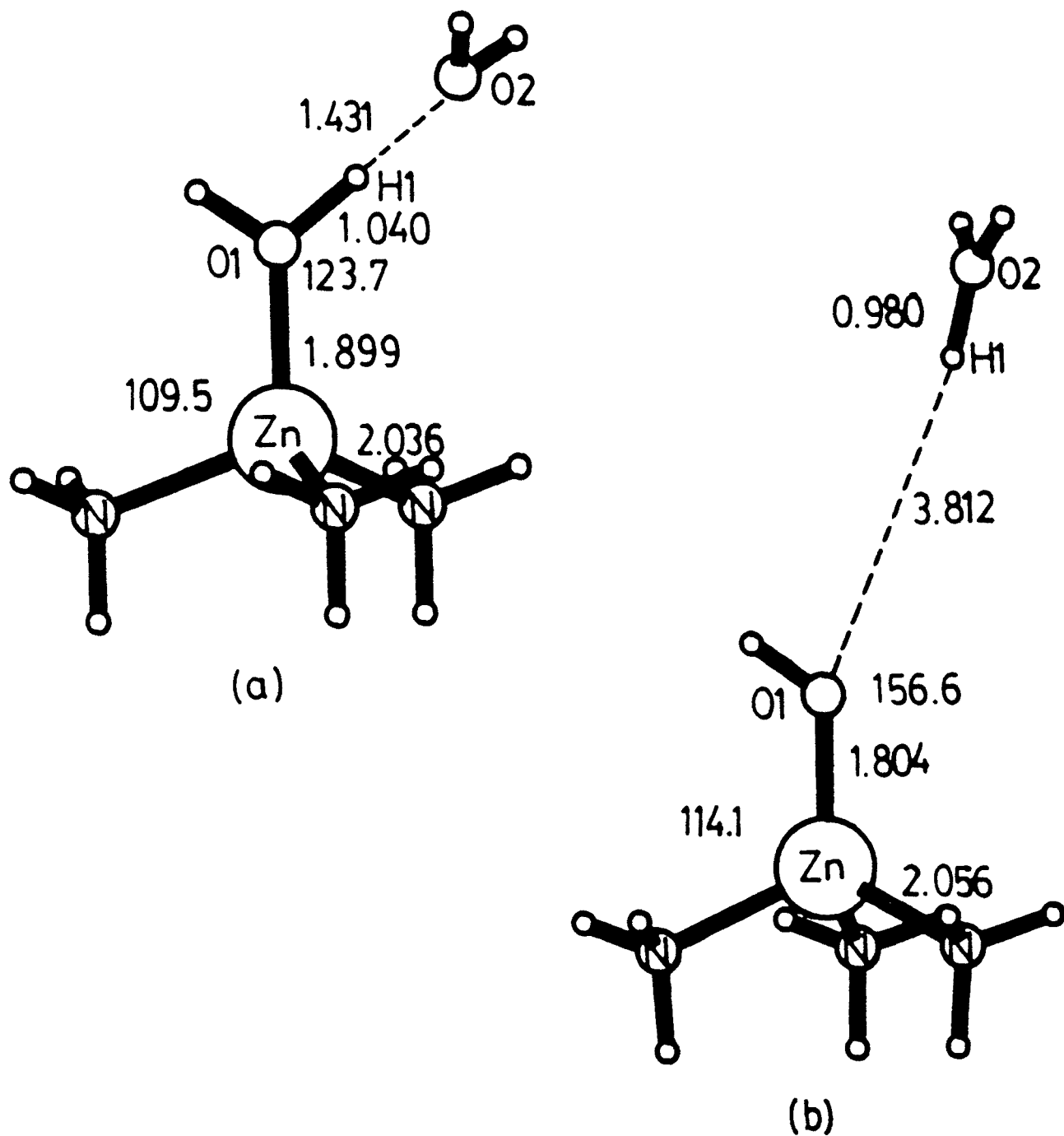


Figura 10: Estructures optimitzades per a l'intermedi i l'estat de transició del sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  obtingudes amb la base 3-21G.

el  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ . Així mateix, l'estat de transició amb lligands es troba ara retardat en la coordenada de reacció ( $R_c=2.832 \text{ \AA}$ ), per bé que en ambdós casos i tal mostra la distància  $\text{O}_2\text{-H}_1$ , el grup  $\text{H}_3\text{O}^+$  es troba ja totalment format en el TS. Per a la reacció amb lligands, el TS correspon també a la separació de les dues espècies amb càrrega +1, i no pas a la transferència protònica.

Per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ , l'intermedi està menys estabilitzat, respecte als reactius, que per al sistema  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ . A més a més, la barrera energètica referida a l'intermedi augmenta substancialment, perquè passa de 9.5 kcal/mol sense lligands a 55.9 kcal/mol al nivell 3-21G(d,f)//3-21G. Per acabar l'aspecte energètic, direm que la reacció es torna menys exotèrmica, el que d'acord amb el principi de Hammond fa que l'intermedi s'adelanti al llarg de la coordenada de reacció, i l'estat de transició es retardi. Tots aquests fets seran explicats considerant la disminució dels efectes electrostàtic i de transferència de càrrega produïts per la presència dels lligands.

De les càrregues de la Taula X es pot observar que els lligands transfereixen una important quantitat de càrrega a l'ió central. Per exemple, en l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$  la transferència de càrrega des dels tres amoníacs al  $\text{Zn}^{+2}$  és de 0.494 electrons amb la base 3-21G. Aquesta transferència de càrrega provinent dels lligands disminueix la càrrega positiva sobre el  $\text{Zn}^{+2}$ , i per tant provoca una reducció dels efectes electrostàtics. A més els orbitals *s* i *p* del metall que reben la transferència de càrrega del dímer d'aigua es troben desestabilitzats per la seva combinació antienllaçant amb els dels lligands. Això provoca una disminució de la transferència de càrrega. Aquest punt es pot comprovar mitjançant una anàlisi de descomposició de l'energia pel mètode de Morokuma [382-387] fet a nivell 3-21G. En aquest cas, considerant en l'intermedi els fragments  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{+2}$  i  $(\text{H}_2\text{O})_2$ , els termes ES+PL i CT són -111.9 i -15.8 kcal/mol, respectivament, en comparació amb els -241.5 i -38.3 kcal/mol que s'han obtingut per a l'intermedi  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  a nivell 3-21G(d,f)//3-21G.

Finalment, cal fer notar la gran semblança, tant des d'un punt de vista geomètric com des d'un punt de vista energètic, entre els resultats del sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  on la distància  $\text{Zn-O}_1$  és aproximadament 1.9 Å, i el cas d'una càrrega dipositiva situada també a una distància de 1.9 Å del dímer d'aigua (veure Taula V). Això té lloc a través d'una compensació dels diferents termes implicats. Aquest resultat indica que podríem modelar el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{+2}$  per una càrrega dipositiva situada al lloc on hi havia l'àtom de zinc i obtenir uns resultats qualitativament acceptables.

Els resultats obtinguts a partir de càlculs semiempírics amb el mètode AM1 per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  es troben en la Taula XI. La relació entre els valors d'aquesta Taula i els de la Taula X ens permetrà tenir una idea dels resultats que dona el mètode AM1 en aquest tipus de processos. Això ens orientarà a l'hora de concedir més o menys crèdit a càlculs que només s'han pogut dur a terme amb el mètode AM1, com seran els que presentarem en posteriors apartats.

Comparant els resultats d'aquesta Taula amb els de la Taula X es pot veure que el mètode AM1 dona unes distàncies  $\text{Zn-O}_1$  més llargues en tots els casos. La disminució de la distància  $\text{Zn-O}_1$  al llarg de la coordenada de reacció és predita correctament pel mètode AM1. També dona un valor de la distància  $\text{O}_2\text{-H}_1$  més llarga en l'intermedi. En general però, dona bons resultats per als paràmetres geomètrics. La barrera energètica referida a l'intermedi és de 46.6 kcal/mol amb el mètode AM1. El mètode AM1 dona uns resultats energètics relativament bons, més propers als valors 3-21G(d,f)//3-21G que no pas als 3-21G. Per acabar, les càrregues AM1 sobre el metall i sobre el grup  $\text{H}_3\text{O}$  són clarament inferiors als valors *ab initio* de la Taula X. En qualsevol cas, hi ha una correlació de la posició en la coordenada de reacció i les energies, geometries i càrregues, entre els resultats *ab initio* i AM1. En definitiva, prenent les precaucions necessàries, els resultats AM1 en aquest tipus de processos són qualitativament comparables als obtinguts a nivell *ab initio*.

Taula XI: Paràmetres geomètrics, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i en el fragment ( $q_{(H_3O)}$ ) i energies relatives referides als reactius per a les espècies  $(NH_3)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$  optimitzades amb el mètode AM1. Les distàncies venen donades en Å, les càrregues en unitats atòmiques, i les energies relatives en kcal/mol.

Espècie	$r(ZnO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$	$\Delta E$
Reactius	2.231	0.969	$\infty$	0.661	-	0.
INT	2.185	0.974	2.039	0.660	0.332	-16.2
TS	1.962	3.502	0.989	0.581	1.000	30.4
Productes	1.940	$\infty$	1.004	0.565	1.000	-9.3

### 3.1.2.2 Transferència protònica en el sistema $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2} + \text{B}$ ( $\text{B} = \text{H}_2\text{O}/\text{ImH}$ )

El model de CA que tractem en aquest apartat és el  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$ . Donada la gran quantitat d'àtoms que incorpora aquest model, només ha estat factible el seu estudi a nivell semiempíric. Més concretament, hem estudiat la transferència protònica d'aquesta espècie a l'aigua i a un grup imidazol ( $\text{ImH}$ ) mitjançant el mètode AM1.

En les Taules XII i XIII es donen els paràmetres geomètrics més importants en la coordenada de reacció, càrregues sobre el metall i sobre el fragment corresponent al grup acceptor protonat, i energies relatives referides a reactius, per a les dues transferències abans esmentades.

Si comparem els valors de les Taules XII i XI ens adonem de les diferències que apareixen quan tenim o bé tres lligands imidazol coordinats al  $\text{Zn}^{+2}$ , o bé tres amoníacs que actuen com a lligands. Es pot observar que en canviar  $\text{NH}_3$  per  $\text{ImH}$  es produeix un petit avançament de l'intermedi, i un lleuger retardament de l'estat de transició. D'acord amb això es produeix una desestabilització de l'intermedi, i un augment de la barrera de la reacció, que passa a ésser ara de 60.5 kcal/mol respecte als intermedis. En qualsevol cas, ni els canvis geomètrics ni els energètics no són molt importants, de manera que si bé recomanable, no sembla absolutament imprescindible la utilització del model  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$  per a l'estudi d'aquest tipus de processos. Es pot tenir una bona idea de com té lloc la transferència usant el model  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$  que presenta l'avantatge d'ésser molt menys car des d'un punt de vista computacional.

Fins ara hem discutit el cas en el que una molècula d'aigua és el grup acceptor. Des d'un punt de vista experimental, sembla ser clar que la transferència protònica

Taula XII: Paràmetres geomètrics, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i en el fragment  $H_3O$  ( $q_{(H_3O)}$ ) i energies relatives referides als reactius per a les espècies  $(ImH)_3Zn(H_2O)_2^{+2}$  optimitzades amb el mètode AM1. Les distàncies venen donades en Å, les càrregues en unitats atòmiques, i les energies relatives en kcal/mol.

Espècie	$r(ZnO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$	$\Delta E$
Reactius	2.271	0.969	$\infty$	0.722	-	0.
INT	2.236	0.971	2.087	0.726	0.289	-12.5
TS	1.975	4.493	1.004	0.646	1.000	48.0
Productes	1.973	$\infty$	1.004	0.643	1.000	18.8



Taula XIII: Paràmetres geomètrics, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i en el fragment  $\text{ImH}_2$  ( $q_{(\text{ImH}_2)}$ ) i energies relatives referides als reactius per a les espècies  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{ImH})^{+2}$  optimitzades amb el mètode AM1. Les distàncies venen donades en Å, les càrregues en unitats atòmiques, i les energies relatives en kcal/mol.

Espècie	$r(\text{ZnO}_1)$	$r(\text{O}_1\text{H}_1)$	$r(\text{NH}_1)$	$q_M$	$q_{(\text{ImH}_2)}$	$\Delta E$
Reactius	2.271	0.969	$\infty$	0.722	-	0.
INT	2.234	0.973	2.457	0.721	0.288	-15.9
TS	1.974	3.755	0.999	0.646	1.000	-9.8
Productes	1.973	$\infty$	0.998	0.643	1.000	-38.3

inicial es fa a una molècula d'aigua present en el centre actiu, però que després el protó es transmet fins al grup His-64. En comparar els valors de les Taules XII i XIII podem tenir una idea del que representa canviar l'aigua per l'imidazol com a grup acceptor. Es evident que aquest segon modela millor el grup His-64 que s'ha postulat com a acceptor protònic intermig en la CA. [89,120,124] En la figura 11 es representa l'intermedi i l'estat de transició AM1 per la reacció  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2} + \text{ImH}$ .

Si ens referim a les geometries i a les càrregues no s'observen variacions massa importants en canviar l'aigua per imidazol com a grup acceptor. Energèticament, en canvi, la diferència és molt remarcable. En ésser el grup ImH més bàsic que l'aigua la transferència protònica es veu facilitada. Concretament ara la reacció és exotèrmica, i la barrera és de només 6.0 kcal/mol, el que suposa que la substitució d'aigua per imidazol com a acceptor protònic rebaixa la barrera energètica en 54.5 kcal/mol. El valor obtingut per a la barrera energètica en aquest cas es troba dins el marge experimental esperat per al valor de la barrera que ha d'estar per sota de les 10 kcal/mol, segons les darreres dades conegudes. [157] Sembla doncs demostrat que per simular bé la transferència protònica en la CA cal considerar l'ImH com a acceptor final, encara que en tractar-se d'una molècula relativament gran no hem pogut fer càlculs a nivell *ab initio* tal com hauria estat desitjable.

Per acabar, recordar que fa pocs mesos ha sortit un article [157] en el que s'estudia amb el mètode AM1, entre altres coses la transferència protònica  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2} + \text{ImH}$  quan hi intervenen tres i quatre molècules d'aigua fent de pont entre l'aigua unida directament al zinc i el grup ImH acceptor. Donat l'elevat nombre de graus de llibertat del sistema els autors no han estat capaços de determinar l'estat de transició, si bé comenten que dels càlculs realitzats es pot deduir que la barrera és propera a 18 kcal/mol. També afirmen que aquesta barrera no canvia massa al variar el número de molècules d'aigua que fan de pont entre els grups donador i acceptor. En el seu

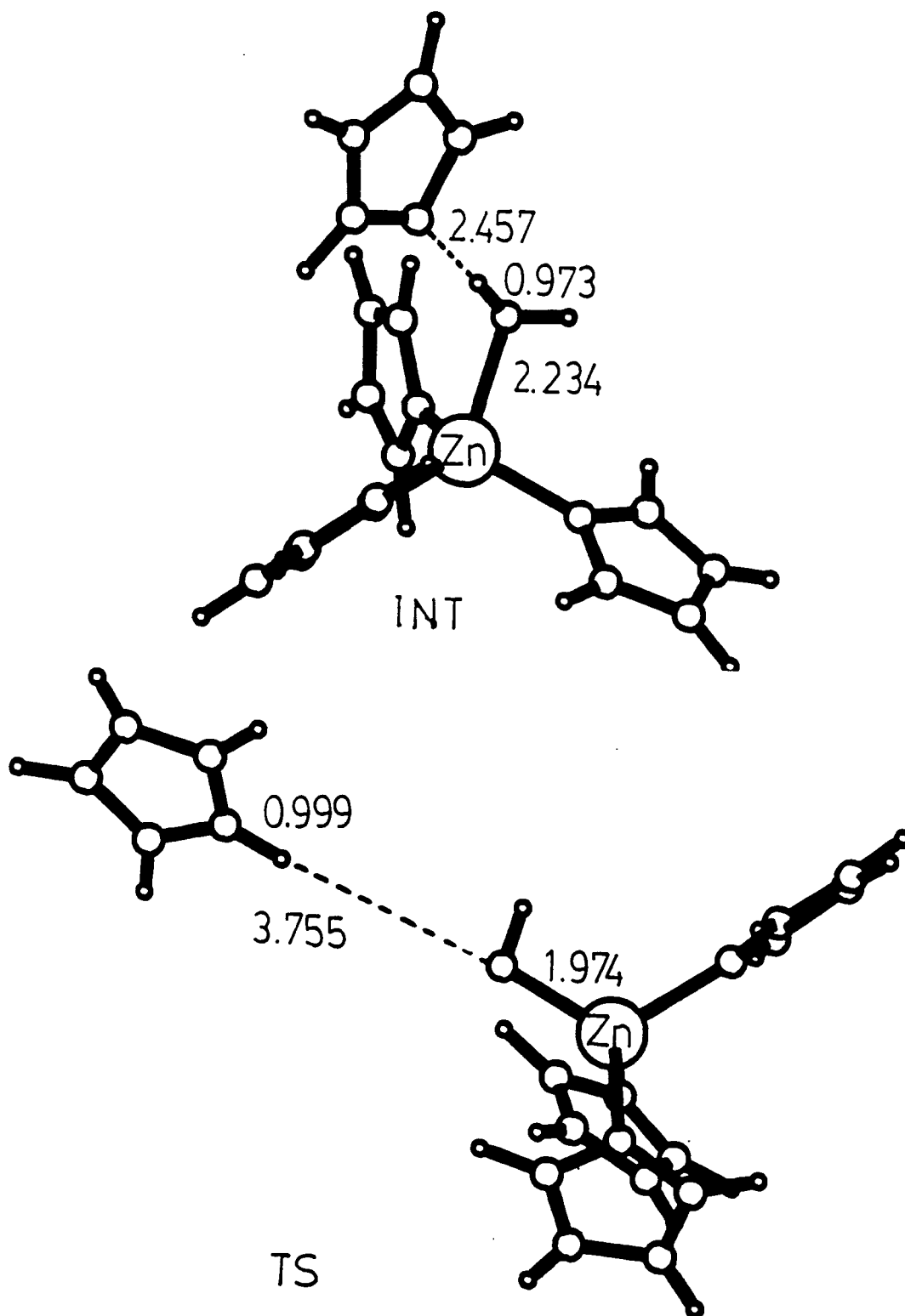


Figura 11: Estructures optimitzades amb el mètode AM1 per a l'intermedi i l'estat de transició del sistema  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{ImH})^{+2}$ .

estudi no fan referència a la reacció sense intervenció de molècules d'aigua, si bé dels seus resultats i dels que hem presentat aquí se'n dedueix que les aigües que actuen de pont incrementen la barrera energètica en unes 10 kcal/mol al nivell AM1.

### 3.1.2.3 Transferència protònica en el sistema $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^+$

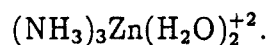
Després d'haver estudiat la transferència protònica en el dímer d'aigua catalitzada pel complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{+2}$ , va sorgir la idea d'estudiar aquesta transferència catalitzada pel catió radical  $\text{Zn}^+$  per veure si els perfils energètics que obteníem eren comparables. L'objectiu era analitzar si en treballs futurs podíem modelar el grup  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{+2}$  per un  $\text{Zn}^+$ , amb el consegüent estalvi de temps de càlcul.

Aquest estudi es va dur a terme amb la base 3-21G i amb el mètode UHF donat que les espècies que intervenen són radicalàries, més concretament doblets. Es van realitzar optimitzacions completes de geometria sense cap tipus de restricció, i es va comprovar que per a les espècies  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^+$ ,  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^+$ , i  $\text{ZnOH}$  el valor mig de  $\langle S^2 \rangle$  era de 0.75, tal com s'espera d'una espècie doblet. Els resultats aconseguits en l'estudi de la transferència  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ZnOH} + \text{H}_3\text{O}^+$  es mostren en la Taula XIV.

El fet més sorprenent és la gran semblança entre els intermedis que s'obtenen al nivell 3-21G per als complexos  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$  (Taula X) i el  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^+$ , des dels punts de vista energètic, de la càrrega sobre el grup  $\text{H}_3\text{O}$ , i de la geometria. Això fa que al principi de la reacció els perfils energètics dels dos processos quasi es superposin. La similitud entre les dues reaccions es trenca a partir de l'intermedi, de manera que per al cas  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^+$  no hem trobat cap estat de transició, i el que s'observa és una pujada d'energia contínua des de l'intermedi fins als productes. La reacció és endotèrmica en 39.9 kcal/mol, a diferència del que passava per al sistema

Taula XIV: Paràmetres geomètrics, càrregues sobre el metall ( $q_M$ ) i sobre el fragment  $H_3O$  ( $q_{(H_3O)}$ ) i energies relatives referides als reactius per a les espècies  $Zn(H_2O)_2^+$  optimitzades amb la base 3-21G. Les distàncies venen donades en Å, les càrregues en unitats atòmiques, i les energies relatives en kcal/mol.

Espècie	$r(ZnO_1)$	$r(O_1H_1)$	$r(O_2H_1)$	$q_M$	$q_{(H_3O)}$	$\Delta E$
Reactius	1.885	0.972	$\infty$	0.815	-	0.
INT	1.841	1.033	1.448	0.756	0.673	-35.8
Productes	1.698	$\infty$	0.974	0.541	1.000	39.9



La conclusió a la que ens porta aquest estudi és que la substitució del grup  $(NH_3)_3Zn^{+2}$  per un  $Zn^+$  és vàlida per a l'estudi de la interacció inicial, però que després porta a greus distorsions del perfil energètic, que acaba per no ésser comparable ni tan sols des d'un punt de vista energètic. Això ens obligarà en els propers apartats a continuar considerant el  $(NH_3)_3Zn(H_2O)^{+2}$  com a model d'enzim més vàlid i alhora asequible per als ordinadors de què disposem.

### 3.1.2.4 Efecte de l'entorn en la transferència protònica en el sistema $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$

Els resultats que hem anat presentant fins ara de la transferència protònica serien comparables als que s'obtidrien si el model de centre actiu considerat actués en fase gasosa, és a dir, sense tenir en compte en cap cas que en el centre actiu es troben residus proteínics i un conjunt de molècules d'aigua, tal i com ha estat demostrat experimentalment amb diferents tècniques. [124,127] Aquestes molècules creen un camp de reacció sobre el centre actiu, que és d'esperar que influenzi considerablement en el procés de transferència. La manera més adequada de tractar el problema seria millorar la descripció del sistema afegint més molècules en el model d'enzim. Avui per avui, aquest tractament és computacionalment inviable a nivell *ab initio*. Per això en aquest treball s'ha elegit una altra estratègia computacional, considerant l'entorn del centre actiu com un medi dielèctric, polaritzable i continu, caracteritzat per un valor donat de la constant dielèctrica  $\epsilon$ . Amb aquest model, el camp de reacció es té en compte mitjançant la polarització del dielèctric per la distribució electrònica del model de centre actiu, i el posterior efecte de retropolarització d'aquesta distribució electrònica deguda al dielèctric polaritzat. Els càlculs es faran mitjançant el mètode de Tomasi, descrit en la secció 2.1.2.2 d'aquesta memòria. Els resultats que obtinguem amb aquest model per a la transferència protònica ens podran servir per analitzar la validesa del mètode de cara a utilitzar-lo en processos posteriors més complexes.

Els càlculs s'han fet a les geometries optimitzades *ab initio* amb la base 3-21G ja descrita en l'apartat 3.1.2.1. Per tal de construir la cavitat on situar l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ , les esferes construïdes al voltant dels àtoms d'O, N, i H, tenen radis que són un 20% més grans que els corresponents radis de van der Waals ( $r_{\text{O}}=1.68$ ,  $r_{\text{H}} = 1.44$ , i  $r_{\text{N}}=1.80$ ). Pel  $\text{Zn}^{+2}$  s'ha pres el seu radi iònic augmentat també en un

Taula XV: Energies lliures de solvatació ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) i energies relatives ( $\Delta E$ ) referides a reactius (kcal/mol) per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  en un medi d' $\epsilon=78.36$  i al nivell 3-21G.

Espècie	$\Delta G_{\text{solv}}$	$\Delta E$
Reactius	-182.0	0.
INT	-161.9	-17.0
TS	-156.7	43.0
Productes	-124.3	41.1

20% ( $r_{\text{Zn}}=0.84$ ). S'ha considerat un entorn definit per una constant dielèctrica igual a la de l'aigua ( $\epsilon = 78.36$ ). La temperatura d'estudi ha estat de 298 K. Calen altres valors de característiques físiques per a la descripció del medi (diàmetre del solvent, densitat i coeficient d'expansió tèrmica). Nosaltres hem agafat els mateixos que en anteriors estudis. [393] En la Taula XV donem els resultats de les energies lliures de solvatació i de les energies lliures relatives referides als reactius per a les diferents espècies que intervenen.

L'energia lliure de solvatació disminueix uniformement al passar de reactius a productes. Això és degut a la successiva deslocalització de la càrrega dipositiva que inicialment es troba concentrada en l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{+2}$  i que en els productes es troba repartida entre el  $\text{H}_3\text{O}^+$  i el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{OH})^+$ .

Hi ha tres punts importants a comentar de l'aspecte energètic, comparant-lo al que obteníem en fase gas (Taula X). El primer punt és la desestabilització dels intermedis respecte als reactius per efecte del  $\Delta G_{\text{solv}}$ . El segon punt es tracta de l'augment de la barrera que passa a ésser de 60.0 kcal/mol. Per acabar, a diferència del que passava en el sistema aïllat, la reacció ara és endotèrmica. Aquest resultat millora

notablement la descripció del procés, ja que experimentalment s'ha determinat que el  $pK_a$  de l'aigua coordinada al centre actiu de la CA és proper a 7, [109-112] el que implica forçosament un procés endotèrmic.

Els canvis energètics es poden explicar tenint en compte que l'efecte del medi és similar al de la introducció de nous lligands en l'esfera de coordinació del metall. Bàsicament es produeix un augment de la càrrega negativa sobre el zinc, i per tant es dificulta la transferència protònica per disminució dels efectes electrostàtics i de transferència de càrrega. El mètode de Tomasi no permet l'optimització de geometries, i en tot cas si es pretén això cal recórrer a camins alternatius. [394] Ben segur que si fos possible aquesta optimització observariem un avançament de l'intermedi en la coordenada de reacció i un retardament de l'estat de transició.

Alguns autors consideren que les reaccions en els enzims s'han d'estudiar teòricament en fase gasosa. [395] Aquesta idea potser és un xic extrema, donat que en l'enzim el camp de reacció mai no és nul, encara que tampoc és tan gran com el creat per una solució aquosa. Per això és d'esperar que un camp de reacció mig entre ambdós extrems sigui el més adequat per estudiar les reaccions que tenen lloc en l'enzim. De fet Allen *et al.* [137] consideren que una constant dielèctrica de 4 és la més adequada per a l'introducció de l'efecte del medi en les reaccions enzimàtiques. Nosaltres hem fet càlculs amb el mètode de Tomasi per a una constant dielèctrica un xic més petita, considerant un entorn definit per una constant dielèctrica igual a la del *n*-hexà ( $\epsilon=1.88$ ). Els resultats obtinguts es mostren en la Taula XVI.

Les energies lliures de solvatació són ara més petites que les de la Taula XVI, com era d'esperar al tractar-se d'un medi de constant dielèctrica més petita, si bé continua observant-s'hi el mateix ordre. La  $\Delta G_{solv}$  és màxima per als reactius i mínima per als productes. Per altre banda, les energies referides als reactius es troben entre les de la Taula XV que són les que hem obtingut en un medi d' $\epsilon=78.36$  i les de la Taula X



Taula XVI: Energies lliures de solvatació i energies relatives referides a reactius (kcal/mol) per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  en un medi d' $\epsilon=1.88$  i al nivell 3-21G.

Espècie	$\Delta G_{\text{solv}}$	$\Delta E$
Reactius	-81.1	0.
INT	-73.6	-29.3
TS	-71.6	28.5
Productes	-54.8	10.7

obtingudes en fase gasosa. La barrera ara és de 57.8 kcal/mol, i la reacció continua essent endotèrmica, tal com havíem trobat en solució aquosa.

D'aquest estudi de l'efecte del medi en la transferència protònica se'n dedueix la importància de la consideració dels efectes de l'entorn en les reaccions que tenen lloc en la CA. Hem vist que tant per a un medi amb  $\epsilon=1.88$  com per a un altre molt més polaritzable amb  $\epsilon=78.36$ , els perfils energètics que s'obtenen canvien dràsticament respecte al sistema aïllat i donen descripcions molt més realistes del procés.

### 3.1.2.5 Discussió

En la figura 12 es representen els perfils energètics de les transferències protòniques en els sistemes  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  amb la base 3-21G i  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  amb les bases 3-21G, 3-21G(d,f)//3-21G i 3-21G, quan s'hi ha introduït l'efecte del medi pel mètode de Tomasi. D'aquesta manera podem tenir una visió clara del que passa al perfil quan considerem els lligands, quan tenim en compte les funcions de polarització, o bé quan

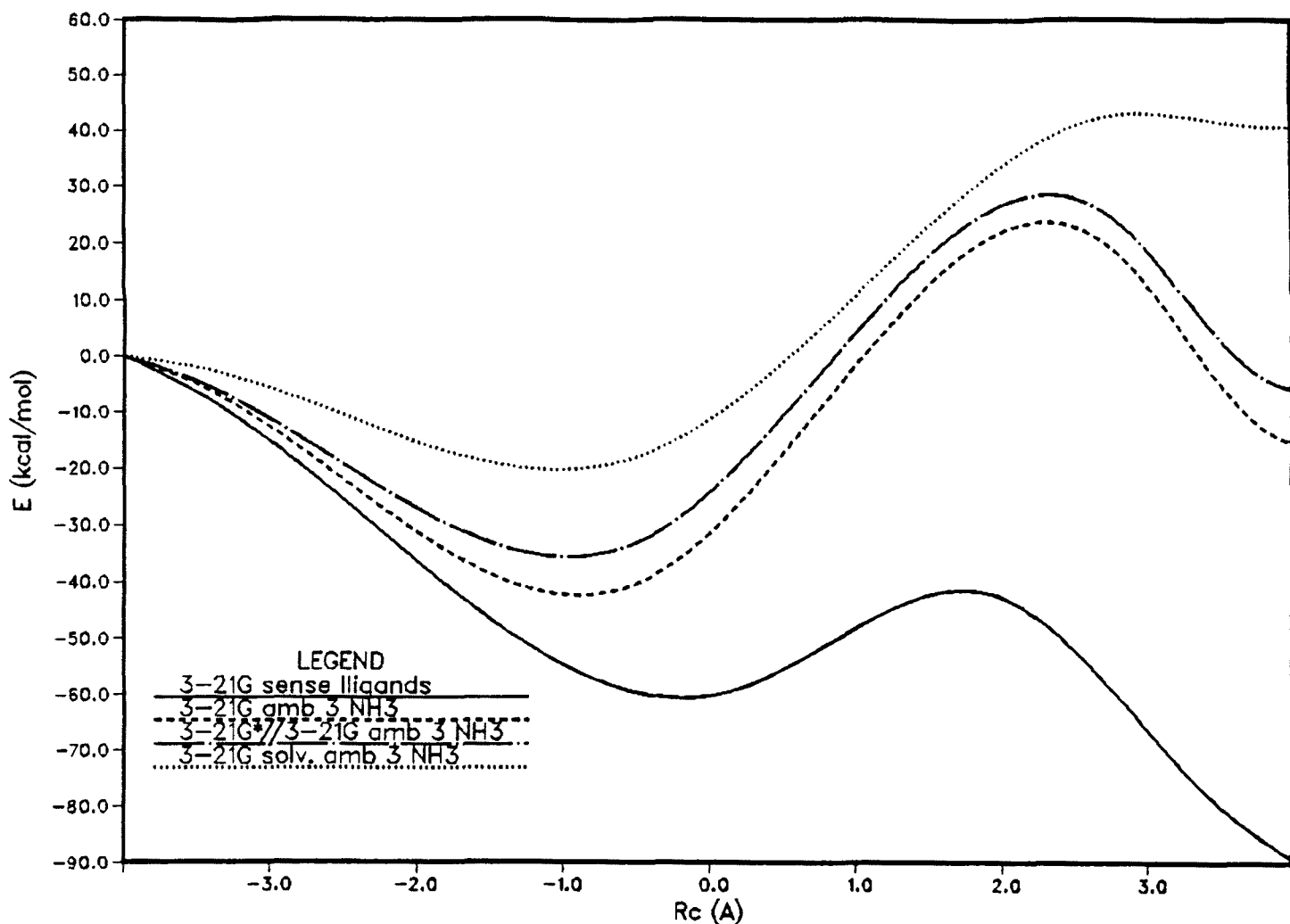


Figura 12: Perfils energètics per a l'espècie  $\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  amb la base 3-21G i per al complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  amb les bases 3-21G, 3-21G(d,f)//3-21G i 3-21G en un medi d' $\epsilon=78.36$ .

introduïm l'efecte de l'entorn.

Comparant la línia contínua i la de ratlles observem com en situar tres  $\text{NH}_3$  en l'esfera de coordinació del  $\text{Zn}^{+2}$  es produeix una desestabilització important de l'intermedi, i un augment de la barrera energètica, juntament amb una disminució considerable de l'exotermicitat de la reacció. Això va acompanyat de l'avançament de l'intermedi en la coordenada de reacció i del retardament de l'estat de transició.

Comparant la línia de ratlles i la de punts-i-ratlles veiem que l'efecte d'afegir funcions de polarització és únicament d'aixecar tots els punts del perfil energètic unes

2-4 kcal/mol. Recordem, però, que en aquest perfil no s'ha optimitzat la geometria quan s'han afegit funcions de polarització i que el que s'ha fet és només un nou càlcul SCF amb la base 3-21G(d,f) a la geometria ja optimitzada 3-21G. La inclusió de funcions de polarització suposa només una petita millora, computacionalment molt cara, en la descripció quantitativa del procés.

De la diferència entre la línia de ratlles i la de punts en podem extreure conclusions sobre l'efecte de l'entorn en la transferència protònica. Bàsicament es tracta d'un efecte similar al d'introduir lligands en l'esfera de coordinació del zinc, és a dir, es desestabilitza l'intermedi, augmenta la barrera energètica (en aquest cas 4.4 kcal/mol), i disminueix l'exotermicitat de la reacció, fins al punt que al considerar juntament els efectes dels lligands i del medi la reacció es fa endotèrmica. Aquí el canvi és qualitatiu.

En la figura 13 es troben dibuixats els perfils energètics AM1 per a la transferència protònica en els sistemes  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  (línia de ratlles),  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  (línia de punts-i-ratlles), i  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{ImH})^{+2}$  (línia de punts). Per poder establir comparacions, també s'hi ha afegit el perfil 3-21G per a la transferència en l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  (línia contínua).

La diferència entre la línia contínua i la de ratlles ens dóna una idea del comportament del mètode AM1 davant els càlculs *ab initio* a nivell 3-21G. Aquesta comparació ja ha estat feta per a altres sistemes. [151,396] Els perfils són força diferents al principi, el que fa pensar que el mètode AM1 no representa bé l'intermedi inicial, però s'assemblen més a mesura que la coordenada de reacció avança.

La comparació entre la línia de ratlles i la de punts-i-ratlles permet entendre l'efecte que té substituir els lligands  $\text{NH}_3$  per ImH. Al tractar-se el grup ImH d'una espècie més bàsica, es produeix l'esperada desestabilització de l'intermedi, juntament

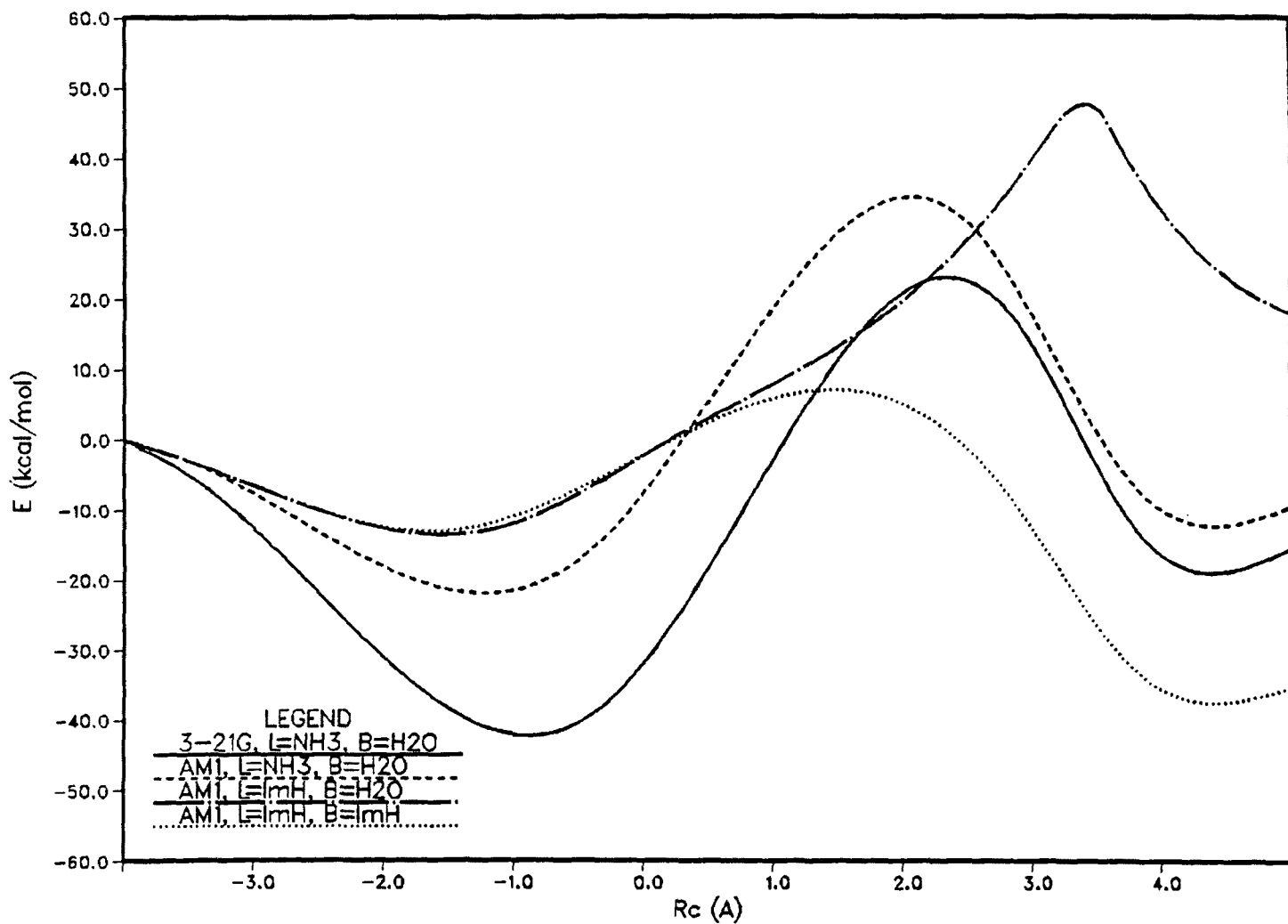


Figura 13: Perfils energètics al nivell AM1 per a les espècies  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ ,  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ , i  $(\text{ImH})_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{ImH})^{+2}$ . També s'hi inclou el perfil 3-21G per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$ .

amb l'augment de la barrera energètica i de l'endotermicitat de la reacció. Això va acompanyat de l'avançament de l'intermedi en la coordenada de reacció i del retardament de l'estat de transició, tal com s'observa en la figura 13.

Al comparar la línia de punts-i-ratlles amb la de punts es veu l'efecte de substituir l'aigua per un grup imidazol com a acceptor del protó transferit. A l'ésser l'imidazol més bàsic que l'aigua, la transferència protònica es veu ara molt facilitada. Des dels reactius fins a l'intermedi els dos perfils són similars, però al voltant de  $R_c=0.5 \text{ \AA}$  es produeix un canvi sobtat. L'estat de transició s'avança i la barrera energètica disminueix fins a valer 6.1 kcal/mol, el que suposa trobar-se dins el marge esperat segons els resultats experimentals. [157] La reacció acaba essent molt exotèrmica. No ens ha estat possible introduir l'efecte del medi en aquest darrer cas, si bé a partir dels resultats que hem obtingut quan l'hem afegit per al sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2^{+2}$  a nivell *ab initio*, es pot deduir que la seva consideració desestabilitzaria l'intermedi, creixeria un xic la barrera (que molt probablement continuaria per sota de 10 kcal/mol) i augmentaria considerablement l'endotermicitat de la reacció, de manera que donaria lloc a un perfil que permetria explicar molt bé els resultats experimentals coneguts.

L'estudi de l'etapa elemental que correspon a la transferència protònica que genera l'espècie catalíticament activa ens ha servit per provar diferents models i nivells de càlcul. Els resultats ens han servit per a elegir la modelació del centre actiu i el mètode que hem utilitzat en els apartats posteriors d'aquesta Tesi. Com a punts més remarcables que hem deduït d'aquest estudi preliminar en destaquem els següents:

- El  $\text{Zn}^{+2}$  no és substituïble per altres dications similars.
- La consideració dels lligands coordinats al  $\text{Zn}^{+2}$  és indispensable. Aquests actuen reduint tant l'efecte electrostàtic com el de transferència de càrrega.
- És bàsic considerar l'efecte del medi per assolir descripcions més realistes dels

processos.

- Dels tres punts anteriors es segueix que, donat que hem elegit un mètode de càlcul *ab initio* molt més fiable que no pas un de semiempíric, la descripció del centre actiu s'ha de fer amb un sistema com el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ . Caldrà afegir-hi, a més, l'efecte de l'entorn. D'aquesta manera serà com es tractarà el centre actiu en els propers apartats.
- Tant la base 3-21G com els pseudopotencials de Hay i Wadt donen resultats molt vàlids. Tots dos han estat utilitzats en els resultats que segueixen. L'elecció entre l'un o l'altre s'ha fet en funció del software i hardware disponible a cada moment. Per tal de poder comparar les diferents etapes elementals, l'estudi complet de tot el procés catalític de la CA s'ha dut a terme amb la base 3-21G.

## 3.2 ESTUDI DE LA REACCIO D'HIDRATACIO DEL CO<sub>2</sub>

La reacció d'hidratació reversible del CO<sub>2</sub> té una gran importància biològica donat que és la que regula el pH de la sang. En aquesta segona part del capítol de resultats estudiarem aquesta reacció catalitzada per la CA. Considerarem successivament la interacció del CO<sub>2</sub> amb el centre actiu de l'enzim, l'atac nucleofílic de l'EZn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) al CO<sub>2</sub>, i la formació del bicarbonat, etapes corresponents als passos 1,2, i 3 de la figura 2 d'aquesta memòria. La conseqüència final d'aquests tres passos és la hidratació del CO<sub>2</sub> per donar bicarbonat.

Abans de posar-nos a considerar la reacció d'hidratació en l'anhidrasa carbònica, farem un estudi previ de la reacció  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ , per veure com canvia el perfil energètic de la reacció en presència de Zn<sup>+2</sup> o de camps elèctrics. L'objectiu inicial que pretenem assolir és entendre quins són els aspectes fonamentals de la catàlisi d'aquesta reacció per un catió metàl·lic. En una segona part d'aquesta secció presentarem la reacció d'hidratació que té lloc en la CA, tot i prenent com a model de centre actiu de l'enzim el complex (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(H<sub>2</sub>O). En aquesta darrera part, estudiarem també com afecta el medi a la reacció, i modelarem els efectes deguts a tots els altres residus presents en el centre actiu per un medi continu polaritzable.

En els següents apartats d'aquesta secció l'estudi s'ha portat a terme amb dues

bases diferents, amb l'objectiu de comparar la fiabilitat de la base que anomenem 3-21G, amb la que s'ha treballat en el conjunt d'apartats d'aquesta Tesi. La primera base consta, per a l'àtom de Zn, de què les capes internes es representen mitjançant pseudopotencials de Hay i Wadt, [326,327] i la capa de valència amb la base [3s,2p,5d/1s,1p,2d], que és mínima per als orbitals *s* i *p* de valència, i doble- $\zeta$  per als *d*. Per a tots els altres àtoms, excepte els H dels NH<sub>3</sub>, la base és la copiada de la 4-31G. [299] Per als H dels NH<sub>3</sub> s'ha canviat en canvi la base STO-3G. [297,298] Anomenarem a aquesta primera base com a base pseudo. En la segona base, anomenada 3-21G, es pren la base 3-21G [304,308] per a tots els àtoms, menys per als H dels NH<sub>3</sub>, que es representen amb la base STO-3G. En aquest cas, s'expliciten totes les funcions de base de l'àtom metàl·lic (càlculs "all electron") i els orbitals atòmics de valència *s*, *p*, i *d*, es representen amb una base doble- $\zeta$ . Els càlculs en els que s'incorpora l'efecte del medi han estat fets precisament amb aquesta base, donat que el programa MONSTERGAUSS en el que està incorporat el mètode de Tomasi, només permet càlculs *ab initio* amb bases que considerin tots els electrons de valència. La base 3-21G és la que ens ha permès homogeneitzar els diferents apartats de la Tesi, i extreure conclusions finals relatives al procés global de catàlisi.

### 3.2.1 ESTUDI DE LA HIDRATAció DEL CO<sub>2</sub> AïLLAT

Abans d'iniciar l'estudi de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, farem un estudi previ de la reactivitat del CO<sub>2</sub> enfront de l'aigua i de com aquesta molècula es veu activada per efecte de pertorbacions externes, com camps elèctrics uniformes. L'interès de fer aquest estudi previ es deu a què un dels efectes d'un catió, si el considerem com una càrrega positiva, és crear un camp elèctric no uniforme al seu voltant. Aquest camp creat pel catió pot simular-se, com a primera aproximació, per



un camp elèctric uniforme. Això ens permetrà tenir una primera idea de quins són els efectes més importants a tenir en compte en la catàlisi de la reacció d'hidratació del  $\text{CO}_2$  per cations metàl·lics.

Dividirem aquesta secció en dues subseccions. En una primera part, parlarem de la molècula de  $\text{CO}_2$  aïllada, mentre que en la segona, estudiarem la reacció d'hidratació del  $\text{CO}_2$  per una única molècula d'aigua, catalitzada pel  $\text{Zn}^{+2}$  i per camps elèctrics uniformes. Això també ens donarà una idea de fins a quin punt es pot simular un catio metàl·lic per un camp elèctric uniforme.

### 3.2.1.1 Influència de pertorbacions externes en la molècula de $\text{CO}_2$

El  $\text{CO}_2$  és una molècula molt estable que s'obté com a producte final de molts processos d'oxidació. Degut a la seva gran estabilitat és poc reactiva, el que unit a la gran quantitat que se'n forma per les moltes reaccions en què és producte final, fa que s'acumuli en l'atmosfera. Aquest augment de la seva concentració en l'aire és el màxim responsable de l'anomenat efecte hivernacle observat en aquests darrers anys. La problemàtica que s'ha plantejat ha despertat darrerament un gran interès en l'estudi de la seva activació per complexos organometàl·lics. Aquests, a través d'interaccions de tipus electrostàtic, actuen preparant el  $\text{CO}_2$  per ésser atacat per diferents agents químics. En aquesta secció volem estudiar l'efecte de camps elèctrics, usats per simular els cations metàl·lics, sobre la molècula de  $\text{CO}_2$ .

Com ja hem mencionat en la secció 2, el mètode de l'enllaç de valència permet obtenir funcions d'ona de les molècules com a combinació lineal d'estructures ressonants. Aquestes estructures permeten descripcions més químiques de l'estructura molecular, i de l'efecte que hi tenen pertorbacions externes. [260] Per això anem a utilitzar

l'aproximació de l'enllaç de valència per analitzar l'efecte de pertorbacions externes sobre la funció d'ona del CO<sub>2</sub>.

Utilitzant el programa BELLVB (exposat en l'apèndix A), hem generat totes les possibles estructures ressonants covalents i monoioniques per al sistema  $\pi$  (4 electrons) del CO<sub>2</sub>. Posteriorment, hem calculat la funció d'ona del CO<sub>2</sub> al nivell STO-3G amb l'aproximació dels orbitals moleculars, i l'hem projectada sobre un conjunt de funcions VB segons el formalisme de Hiberty i Leforestier, comentat en la secció 2.1.1.3.3. Això ens ha permès obtenir els pesos de les diferents estructures ressonants i estudiar la seva variació en presència de camps elèctrics. La Taula XVII recull els pesos de l'estructura covalent i monoionica més importants per al CO<sub>2</sub> aïllat i en presència de camps elèctrics de diferent intensitat. En el cas que l'activació sigui produïda per un metall, no és possible utilitzar el mètode de projecció d'una funció MO a VB, degut a la gran complexitat del sistema a estudiar. Per això aquí s'ha modelat el catió metàl·lic mitjançant camps elèctrics uniformes de diferent intensitat. En el càlcul dels pesos de les diferents estructures ressonants per al CO<sub>2</sub> hem considerat totes les estructures ressonants covalents i monoioniques que s'originen a partir dels orbitals i electrons de valència del CO<sub>2</sub>. En total en són cent cinquanta, el que fa que els pesos de les diferents estructures un cop s'han normalitzat siguin molt petits. Nosaltres ens hem fixat en la variació del pes de les estructures  $O = C - O |$  i  $O = C^+ - O^-$ . Com era previsible es produeix una disminució del pes de l'estructura covalent i un augment de la monoionica, en incrementar-se la intensitat del camp aplicat. L'augment de la contribució d'aquesta darrera estructura afavoreix la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub>, al deixar un C més positiu sobre el que podria atacar l'oxigen de l'aigua, i un oxigen més negatiu sobre el que es podria transferir un protó provinent de l'aigua. En la Taula XVII s'observa un augment del pes de l'estructura monoionica quan s'introdueix un camp elèctric, el que justificaria des d'un punt de vista de l'aproximació VB la catàlisi

Taula XVII: Pesos de les estructures  $O = C - O$  | i  $O=C^+ - O^-$  obtinguts amb la base STO-3G, per al  $CO_2$  sota diferents pertorbacions.

Pertorbació	pes $O = C - O$	pes $O=C^+ - O^-$
-	0.0397	0.0583
E.F. 0.01 au	0.0385	0.0594
E.F. 0.02 au	0.0379	0.0608
E.F. 0.03 au	0.0367	0.0618
E.F. 0.04 au	0.0363	0.0640

d'aquesta reacció en presència d'un camp elèctric.

### 3.2.1.2 Estudi de la reacció CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Com ja hem apuntat en la secció 1.3.4 de la introducció, la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> ja ha estat estudiada per diferents autors. [155,159-162,397-399] S'ha trobat que la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> per OH<sup>-</sup> en fase gas es dona sense barrera. Per a la mateixa reacció en solució aquosa, sí que es presenta una barrera considerable, que és deguda a la desolvatació de l'anió. La reacció del CO<sub>2</sub> amb H<sub>2</sub>O presenta una barrera elevada en fase gasosa, que disminueix en solució aquosa. Per això hem elegit aquesta reacció, i no la del CO<sub>2</sub> i el OH<sup>-</sup>, per a l'estudi de la influència de pertorbacions externes sobre la barrera d'activació. En aquest sentit, un dels estudis més interessants és el de Nguyen i Ha, [162] on es mesura l'efecte catalític que té una segona molècula d'aigua en la reacció CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O → H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Aquesta segona molècula d'aigua actua com a catalitzador bifuncional, de tal forma que es passa per un estat de transició cíclic de sis membres que disminueix la barrera de 49.2 kcal/mol a 15.5 kcal/mol. Molt recentment ha aparegut un article de Merz molt complet sobre el tema [399] on s'estudia la reacció CO<sub>2</sub> + nH<sub>2</sub>O, i on s'obté a un nivell de càlcul més alt, resultats similars als de Nguyen i Ha. Amb anterioritat Jean i Volatron [161] van estudiar la influència catalítica de cations positius, més concretament el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub>. La catàlisi d'aquesta reacció pel grup NH<sub>4</sub><sup>+</sup> s'explica pel fet que la interacció entre el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> i un oxigen del CO<sub>2</sub> fa el carboni més positiu i per tant més fàcilment atacable per l'aigua.

A partir d'aquests estudis sembla clara la possibilitat que el dicatió Zn<sup>+2</sup> actui catalitzant aquesta reacció d'hidròlisi. Així, en aquest apartat volem estudiar la reacció entre el CO<sub>2</sub> i l'H<sub>2</sub>O catalitzada pel dicatió Zn<sup>+2</sup> i per camps elèctrics de

diferent intensitat, per tal de veure quin és l'efecte del metall i dels camps elèctrics uniformes sobre aquesta reacció. Estudis semblants s'han ja realitzat en altres reaccions en anteriors treballs duts a terme pel nostre grup. [400]

L'intermedi i l'estat de transició per a la reacció  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  catalitzada per  $\text{Zn}^{+2}$  es troben representats en la figura 14. En la Taula XVIII es donen els valors de l'energia d'estabilització de l'intermedi, les barreres de reacció per a la reacció directa i inversa, i distància entre el C del  $\text{CO}_2$  i l'oxigen de l'aigua en l'intermedi, per a la reacció  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  sota diferents pertorbacions. Quan s'ha col·locat un camp elèctric (E.F.) les optimitzacions de geometria s'han fet tenint en compte aquesta pertorbació a l'hora de calcular els gradients. En aquest cas s'ha utilitzat el programa GAUSSIAN 86 i l'opció FIELD per introduir el camp elèctric. La molècula s'ha orientat respecte al camp elèctric de manera que l'energia global del sistema ha estat mínima, és a dir, en tots els casos hem deixat optimitzar totes les variables geomètriques del sistema.

En la Taula XVIII es pot observar que la barrera per a la reacció sense catalitzar és força elevada (53.4 kcal/mol per a la reacció directa). El valor obtingut és molt semblant al de donat per Merz al nivell MP4/6-31\*\*//6-31\*\* (54.5 kcal/mol). [399] Per a la mateixa reacció en presència de camps elèctrics de diferent intensitat o del  $\text{Zn}^{+2}$  s'observa una baixada de la barrera d'activació, i per tant aquests dos tipus de pertorbacions catalitzen la hidratació del  $\text{CO}_2$ . El  $\text{Zn}^{+2}$  té un efecte similar al d'un camp elèctric d'intensitat superior a 0.04 au, tant per l'estabilització de l'intermedi, com per la disminució de la barrera energètica i de la distància C-O en l'intermedi. Ara bé, té un efecte diferent al d'un camp elèctric si es mira la columna de la diferència energètica entre l'estat de transició i els productes. Així, els camps elèctrics catalitzen també la reacció inversa donat que desestabilitzen respecte de l'estat de transició, l'àcid carbònic que es forma. Per la seva part, el  $\text{Zn}^{+2}$

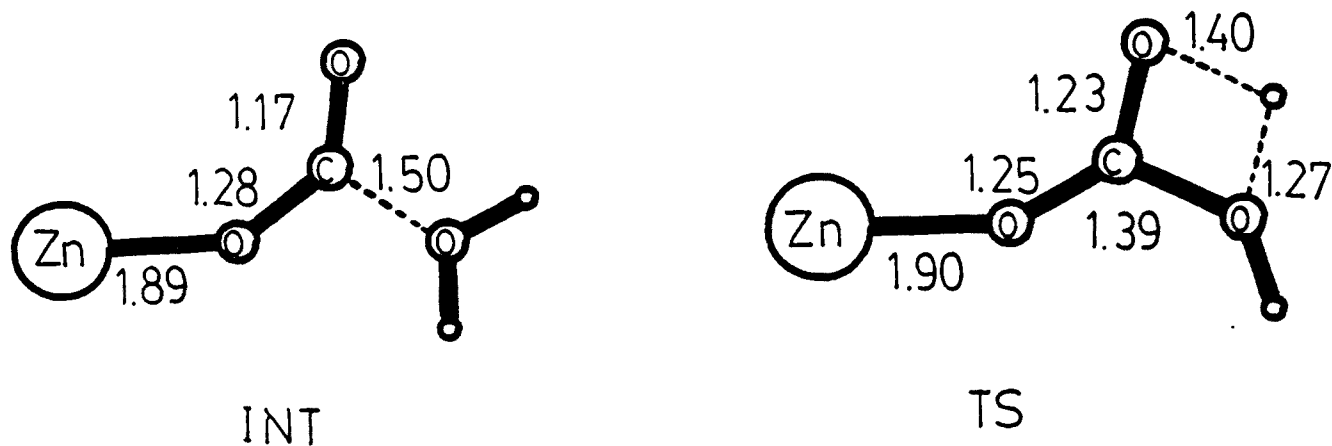


Figura 14: Geometries optimitzades de l'intermedi i estat de transició de la reacció  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  catalitzada per  $\text{Zn}^{+2}$ .

només catalitza la reacció directa, degut a la gran estabilització dels productes per la presència del  $\text{Zn}^{+2}$ . Concretament, l'energia d'interacció del  $\text{H}_2\text{CO}_3$  amb el  $\text{Zn}^{+2}$  per formar el complex  $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{CO}_3)$  és de 116.7 kcal/mol, mentre que la del  $\text{CO}_2$  per donar  $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{CO}_2)$  és de només 71.6 kcal/mol. Això és així donat que en el cas del catió, a més de l'efecte electrostàtic, hi ha el d'enllaç químic del lligand. Aquest és molt més fort per al lligand carbonat que per al  $\text{CO}_2$ .

La distància entre el carboni i l'oxigen de l'aigua en l'intermedi es correlaciona bé amb l'energia d'estabilització de l'intermedi i la barrera de la reacció. S'observa la tendència que quant més petita és la distància C-O en l'intermedi, més important és la seva estabilització i més petita és la barrera de la reacció. L'estabilització de l'intermedi es produeix per interaccions de tipus electrostàtic entre el  $\text{CO}_2$  i l'aigua, que són més importants quant més carregat positivament estigui el C del  $\text{CO}_2$ , el

Taula XVIII: Energies d'estabilització de l'intermedi ( $\Delta E_{\text{INT-R}}$ ), barreres de reacció per a la reacció directa ( $\Delta E_{\text{dir}}^\ddagger$ ), i inversa ( $\Delta E_{\text{inv}}^\ddagger$ ), energia relativa del producte respecte als reactius ( $\Delta E_{\text{P-R}}$ ), distància entre el C del  $\text{CO}_2$  i l'O de l'aigua en l'intermedi ( $d_{\text{C-O,INT}}$ ), i càrrega sobre l'àtom de C en l'intermedi ( $q_{\text{C,INT}}$ ) amb la base pseudo, per a la reacció  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$  sota diferents pertorbacions.

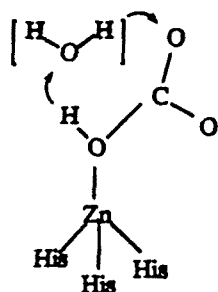
Pertorbació	$\Delta E_{\text{INT-R}}$	$\Delta E_{\text{dir}}^\ddagger$	$\Delta E_{\text{inv}}^\ddagger$	$\Delta E_{\text{P-R}}$	$d_{\text{C-O,INT}}$	$q_{\text{C,INT}}$
-	-5.7	53.4	48.6	-0.9	2.63	0.99
E.F. 0.01 au	-7.3	56.2	48.3	0.6	2.47	1.02
E.F. 0.02 au	-8.0	50.8	35.4	7.4	2.33	1.04
E.F. 0.03 au	-9.3	45.6	21.9	14.4	2.03	1.06
E.F. 0.04 au	-16.5	46.1	8.2	21.4	1.59	1.08
$\text{Zn}^{+2}$	-32.3	43.4	62.8	-51.7	1.50	1.21

que afavoreix l'atac nucleofilic de l'aigua sobre el CO<sub>2</sub>. En la Taula XVIII es pot veure com la càrrega sobre el C en l'intermedi augmenta en augmentar la intensitat del camp elèctric. Aquest augment de càrrega positiva sobre el C és degut a la redistribució de la càrrega en el CO<sub>2</sub> per efecte de la pertorbació externa. Aquesta redistribució de càrrega també es feia evident en els càlculs previs amb la molècula de CO<sub>2</sub> aïllada mitjançant el mètode VB, on s'observava un augment del pes de l'estructura O=C<sup>+</sup> - O<sup>-</sup> en augmentar la intensitat del camp elèctric.

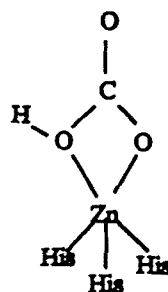
Com a conclusió principal d'aquest estudi inicial és que la redistribució de càrrega en el CO<sub>2</sub> provocada per la presència d'un catió metàl·lic, activa la molècula de CO<sub>2</sub> preparant-la per a un posterior atac nucleofilic.

### 3.2.2 ESTUDI DE LA REACCIO D'HIDRATACIO DEL CO<sub>2</sub> EN L'ANHIDRASA CARBONICA

La controversia més important sobre aquesta reacció és si hi ha una transferència protònica entre dos O en el procés, o es tracta d'un canvi de l'oxigen coordinat al metall. A partir dels resultats experimentals s'han proposat dos mecanismes força diferents, que hem anomenat en la introducció mecanisme de Lipscomb i mecanisme de Lindskog.



Mecanisme  
de Lipscomb



Mecanisme  
de Lindskog



Els estudis teòrics són de gran interès per discutir aquests tipus de problemes de mecanisme. No obstant això, els tres treballs teòrics apareguts fins ara no han resolt la problemàtica.

La hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA ha estat estudiada teòricament per diferents autors. [80,118,145,147,156,157,163,165,166,168,173] Els tres estudis teòrics més complets, han estat duts a terme per Merz, Hoffmann, i Dewar, [157] per Liang i Lipscomb, [80,118,156] i per Jacob, Cardenas, i Tapia. [173] En el primer estudi, s'utilitza el mètode AM1 per realitzar una anàlisi exhaustiu dels passos 1, 2, 3, i 5 de la figura 2. Alguns punts del mecanisme no s'han aclarit del tot degut a les limitacions del mètode AM1. En particular, els autors van ésser incapaçs de determinar l'estat de transició que correspon al mecanisme de Lipscomb que implica un atac nucleofílic de l'oxigen del complex  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  a l'àtom de carboni del  $\text{CO}_2$ , juntament amb una transferència intramolecular, encara que sí que van poder trobar l'estat de transició corresponent al mecanisme de Lindskog en el que es produeix un canvi d'oxigen coordinat al metall. Per altre costat, el de Lipscomb ha estat estudiat a fons per Liang i Lipscomb en el segon dels treballs mencionats. Aquests autors utilitzen el mètode PRDDO, que simula eficientment els resultats de la base STO-3G. A pesar de les importants contribucions fetes per aquest grup, la validesa dels càlculs a aquest nivell és questionable. Per acabar, Jacob, Cardenas, i Tapia obtenen que l'estat de transició per al mecanisme de Lindskog és aproximadament 50 kcal/mol més estable a nivell SCF que el corresponent al mecanisme de Lipscomb, i per tant, proposen que en la interconversió entre el  $\text{CO}_2$  i el  $\text{HCO}_3^-$  no s'hi produeix cap transferència protònica intramolecular. Finalment, assenyalen la gran importància que creuen que han de tenir els efectes de solvatació, si bé no presenten cap resultat en el cas del sistema  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CO}_2)$ . Nosaltres volem realitzar aquí un estudi comparatiu dels mecanismes de Lipscomb i de Lindskog, incorporant per primer cop els efectes del

medi, i així aclarir quin és el més probable que es doni en la CA. Pretenem veure si els dos mecanismes proposats són possibles. A nivell teòric, això significa buscar els estats de transició per als dos mecanismes i comparar les seves barreres.

Desdoblaurem els resultats obtinguts en dos apartats, que correspondran a cadascun dels dos mecanismes estudiats.

### 3.2.2.1 Mecanisme de Lipscomb

Volem estudiar en aquesta secció el mecanisme de Lipscomb que suposa l'existència d'una transferència protònica intramolecular en la formació de l'espècie  $EZn^{II}(HCO_3^-)$ . [118,401]

Dividirem aquest treball en tres parts. En la primera d'elles, estudiarem aquest mecanisme quan el centre actiu activat es modela amb l'espècie tetracoordinada  $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$ . En la segona, incorporarem una molècula d'aigua addicional a la descripció del centre actiu. Com hem comentat en la introducció, en el centre actiu de l'enzim hi són presents varies molècules d'aigua (veure figura 1), que podrien tenir una participació important en el mecanisme. Per acabar, en la darrera part, mostrarem quin és l'efecte en el perfil energètic de considerar, amb un model continu, els efectes electrostàtics del conjunt de residus de l'enzim.

#### 3.2.2.1.1 Modelació del centre actiu de l'enzim amb $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$

Hem vist en la secció 3.1 la validesa del model  $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)$  per estudiar la transferència protònica que dona lloc a l'espècie  $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$ . Un cop formada, el proper pas del mecanisme de catàlisi és la interacció inicial d'aquesta espècie amb

el  $\text{CO}_2$ . Aquesta interacció serà estudiada en un proper apartat d'aquesta secció. En el següent apartat, presentarem els resultats que tenim per a la formació de l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ . Aquests dos primers apartats s'han dut a terme utilitzant la base pseudo. En un darrer apartat, mostrarem quines són les geometries i energies 3-21G per a les espècies que intervenen en aquest procés, així com quin és l'efecte d'incloure, amb aquesta base, l'energia de correlació amb el mètode MP2. Com ja hem dit la reoptimització a nivell 3-21G ens permet homogeneitzar els resultats i introduir l'efecte de l'entorn. Pel que fa al model geomètric, s'han dut a terme optimitzacions completes de geometria, amb l'única restricció de mantenir fixa l'estructura interna dels grups  $\text{NH}_3$  (distàncies N-H: 1.05 Å, angles  $\widehat{\text{NHN}}$ :109.4°). Els estats de transició han estat caracteritzats amb la seva matriu de derivades segones.

#### 3.2.2.1.1.1 Enllaç del $\text{CO}_2$ al centre actiu

La interacció inicial entre el  $\text{CO}_2$  i l'enzim no està ben aclarida. [79,133] No es coneix si es forma l'intermedi, i en el cas que existeixi, no es sap si el número de coordinació del  $\text{Zn}^{+2}$  s'expandeix a cinc, o si es manté la geometria tetraèdrica. [79,97,99] Els resultats obtinguts amb el mètode PRDDO, [80,118,156] amb l'AM1, [157] amb un mètode *ab initio* sense gradients, [163,165] i amb un mètode *ab initio* amb gradients (encara que amb quatre restriccions geomètriques importants [173]) arriben a conclusions diferents, de manera que qualsevol contribució a la resolució del problema és benvinguda.

La figura 15 ens mostra la geometria del mínim obtingut per optimització de l'intermedi inicial  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ . Els valors dels paràmetres geomètrics es donen en la Taula XIX. Dels valors de la Taula es pot veure que els canvis geomètrics que sofreixen els reactius inicials  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  i  $\text{CO}_2$  són molt petits. Els canvis

més remarcables són la pèrdua de la simetria  $D_{\infty h}$  per part del CO<sub>2</sub>, i la disminució de l'angle  $Zn\widehat{O_1}H_1$  que inicialment era de 180°. De fet, l'energia de deformació necessària per modificar la geometria inicial dels reactius CO<sub>2</sub> i del (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) és només de 1.5 i 1.3 kcal/mol, respectivament. En l'intermedi la distància entre el Zn i l'O<sub>3</sub> és de 2.75 Å. Jacob *et al.* en el seu treball [173] donen un valor de 2.3 Å per a la mateixa distància. Per conèixer si s'ha format un enllaç químic entre el Zn i l'O<sub>3</sub> en l'intermedi, s'ha dibuixat el mapa de densitat electrònica de la figura 16. D'aquest mapa s'observa que no hi ha cap punt crític de la densitat electrònica, que seria indicatiu d'enllaç, [402] entre el Zn i l'O<sub>3</sub>. Per contra, sí que es veu la formació d'un punt crític d'enllaç entre l'àtom de C i O<sub>1</sub>, encara que el petit valor de la densitat electrònica en aquest punt indica un enllaç C-O<sub>1</sub> molt feble. Aquest punt ve reforçat pel treball experimental de Riepe i Wang, [93] que varen observar un canvi de només 2.5 cm<sup>-1</sup> en la freqüència que correspon a la tensió asimètrica del CO<sub>2</sub>, entre aquest CO<sub>2</sub> lliure i CO<sub>2</sub> en presència de l'anhidrasa carbònica. Aquest fet els va portar a concloure que el CO<sub>2</sub> no s'uneix directament al zinc. El treball de Lindskog [403] amb el que determina l'existència d'un intercanvi molt ràpid de CO<sub>2</sub> en el centre actiu també suggereix un enllaç del CO<sub>2</sub> amb el centre actiu de la CA molt feble. Altres estudis experimentals [77] basats en mesures de Raigs-X donen valors per a la distància Zn-O<sub>3</sub> similars als que hem presentat aquí.

Si bé no hem observat la formació directa d'un enllaç químic entre el Zn i l'O<sub>3</sub>, des d'un punt de vista geomètric el CO<sub>2</sub> ha d'ésser considerat com un cinquè lligand distant, en una geometria que recordaria força la d'una piràmide de base quadrada, i en bon acord amb els resultats obtinguts per Lipscomb, [118] Pullman, [163,165] i Jacob. [173] En contrast, el mètode AM1 dona un intermedi amb una distància Zn-O<sub>3</sub> massa llarga (4.5 Å). A pesar de les similituds entre les distàncies Zn-O<sub>3</sub> determinades per Lipscomb i per nosaltres amb dos mètodes diferents, hi ha una gran diferència en la distància C-O<sub>1</sub> de l'intermedi PRDDO i del que hem optimitzat en aquest

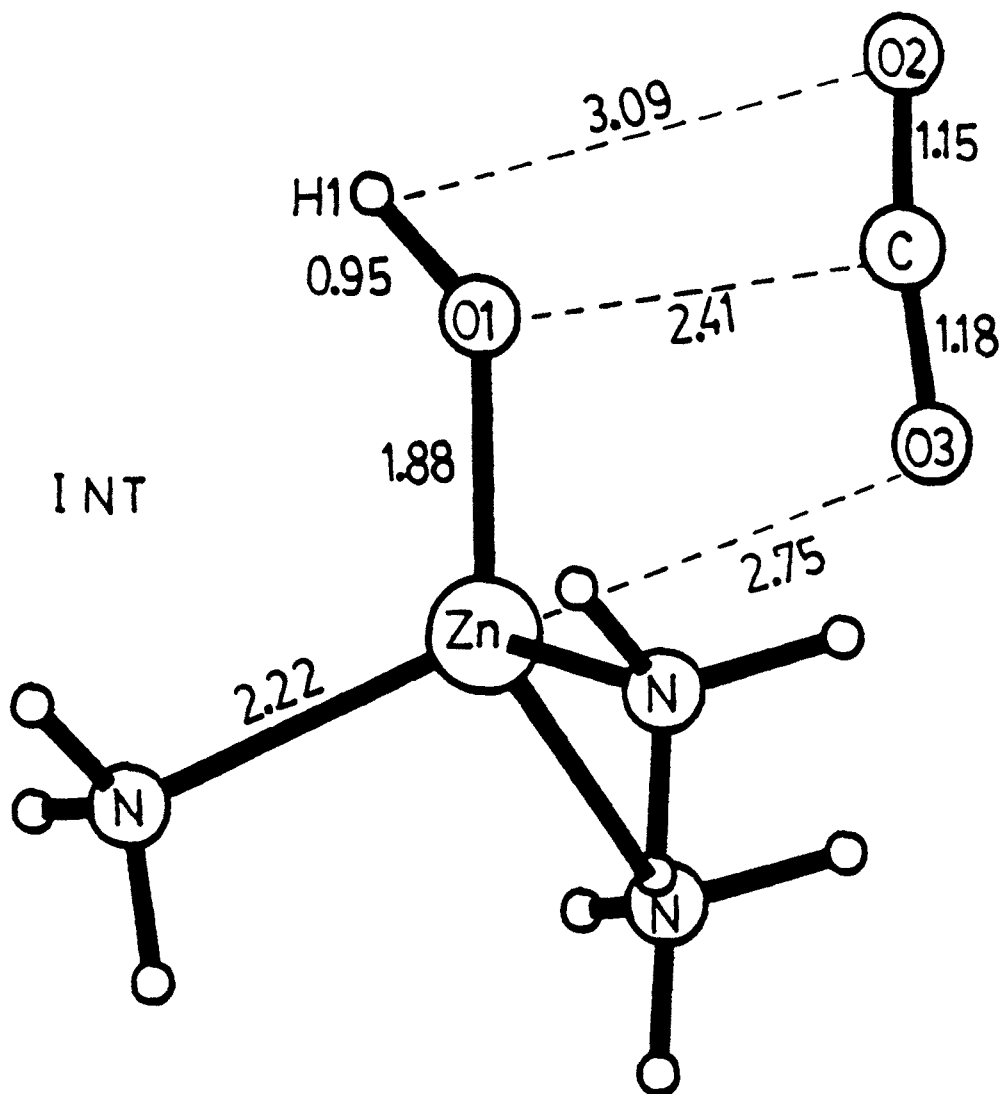


Figura 15: Geometria optimitzada de l'intermedi resultant de la interacció inicial entre el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  i el  $\text{CO}_2$ , obtinguda amb la base pseudo.

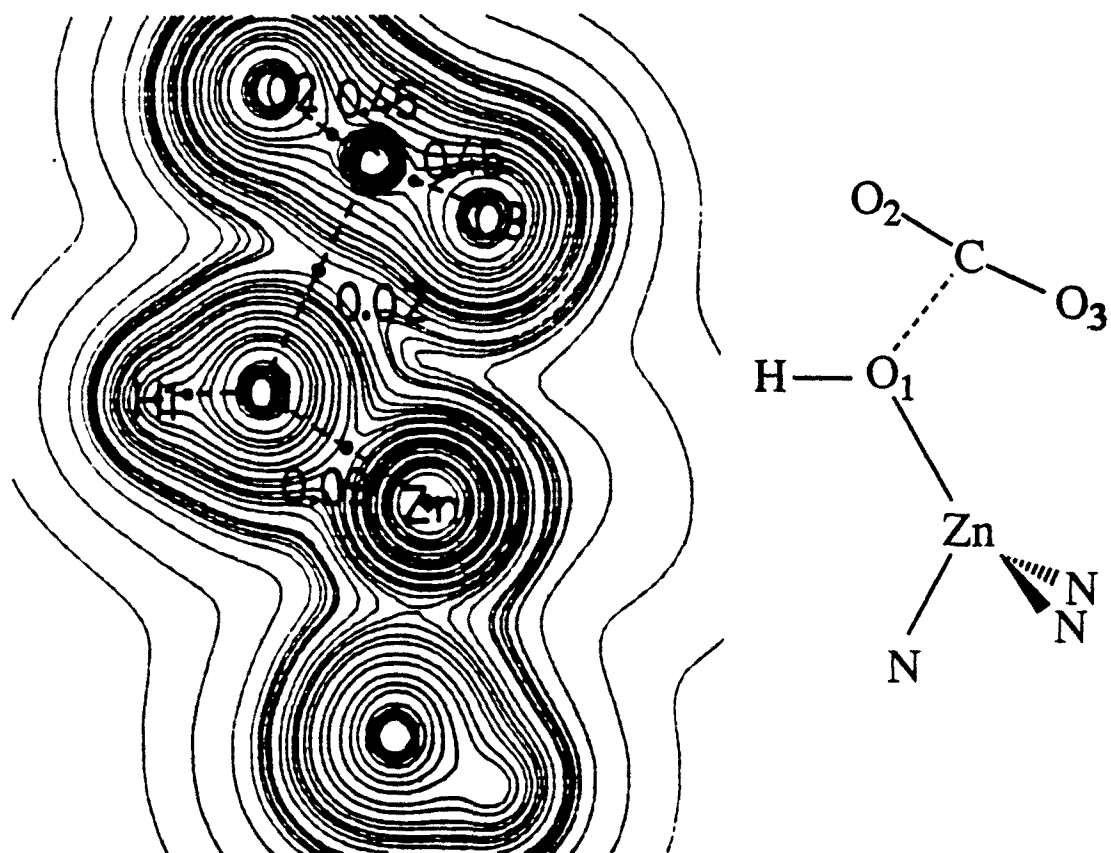


Figura 16: Mapa de densitat electrònica de l'intermedi en el pla format pel grup hidroxil i el CO<sub>2</sub>. • indica un punt crític d'enllaç.

Taula XIX: Paràmetres geomètrics més importants dels diferents punts estacionaris en el procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$ , segons el mecanisme de Lipscomb. INT, TS, cis-, i trans- són abreviacions d'intermedi, estat de transició, producte cis-, i producte trans-, respectivament. Resultats obtinguts mitjançant la base pseudo.

	$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$	$\text{CO}_2$	INT	TS	cis-	trans-
$d_{\text{Zn}-\text{N}}$	2.219	-	2.219	2.193	2.198	2.194
$d_{\text{Zn}-\text{O}_1}$	1.830	-	1.883	1.961	1.947	1.933
$d_{\text{O}_1-\text{H}_1}$	0.938	-	0.945	1.224	2.309	3.041
$d_{\text{O}_1-\text{C}}$	-	-	2.405	1.446	1.311	1.292
$d_{\text{O}_2-\text{C}}$	-	1.158	1.148	1.277	1.332	1.333
$d_{\text{O}_3-\text{C}}$	-	1.158	1.175	1.207	1.220	1.232
$d_{\text{O}_3-\text{Zn}}$	-	-	2.748	3.107	2.994	3.089
$d_{\text{O}_2-\text{H}_1}$	-	-	3.090	1.334	0.953	0.954
$\text{O}_1\widehat{\text{CO}}_2$	-	-	81.9	98.9	115.2	114.2
$\text{Zn}\widehat{\text{O}}_1\text{C}$	-	-	98.9	119.2	118.7	123.0
$\text{Zn}\widehat{\text{O}}_1\text{H}_1$	179.4	-	141.2	165.6	182.5	200.6
$\text{Zn}\widehat{\text{O}}_1\text{N}$	114.8	-	116.1	110.3	111.8	110.3
$\text{O}_2\widehat{\text{CO}}_3$	-	180.0	171.9	139.6	121.5	122.0

treball. Lipscomb dóna una distància C-O<sub>1</sub> de 1.50 Å, davant els 2.41 Å del nostre intermedi. Del valor d'aquesta distància Lipscomb ha inferit que l'atac nucleofílic del (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) al CO<sub>2</sub> ja ha tingut lloc en l'intermedi inicial, mentre que del nostre estudi es pot concloure que en aquest punt encara no s'ha produït l'atac nucleofílic. A aquesta mateixa conclusió arriben Jacob *et al.* en el seu treball, [173] (probablement per manca d'una anàlisi de la càrrega transferida) malgrat que la distància C-O<sub>1</sub> que obtenen en el seus càlculs per a aquest intermedi és de 1.46 Å.

L'energia d'interacció del CO<sub>2</sub> amb el complex (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) és de -12.9 kcal/mol. Pullman *et al.*, [163] utilitzant un mètode electrostàtic simplificat varen presentar un valor de -8.6 kcal/mol per a aquesta interacció, el qual és molt similar al nostre. Aquesta semblança no és del tot sorprenent donat que en aquesta etapa inicial de la interacció del CO<sub>2</sub> a l'enzim, la part més gran de l'energia d'estabilització ve donada per les interaccions de tipus electrostàtic. De fet, la càrrega transferida del (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) al CO<sub>2</sub> és de només 0.01 electrons, la qual cosa indica que l'atac nucleofílic de l'O<sub>1</sub> del (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) al C pràcticament no s'ha iniciat. Jacob *et al.*, [173] per la seva banda han trobat -35.1 kcal/mol per a la mateixa interacció.

El fet més relevant en aquest primer estadi de la interacció que porta a la formació de l'intermedi és la redistribució de càrrega en el fragment CO<sub>2</sub>, tal com hem vist en l'anterior secció, si bé ara induïda pel complex (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>). La redistribució es pot veure dels valors de les càrregues en els àtoms més importants recollits en la Taula XX. Degut a la presència de l'espècie (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>), els àtoms de C i O<sub>3</sub> del CO<sub>2</sub> experimenten canvis importants en el valor de les seves càrregues. D'aquesta manera l'enllaç C-O<sub>3</sub> es polaritza. L'àtom O<sub>3</sub> augmenta la seva càrrega negativa en 0.15 electrons. Quan es calcula el CO<sub>2</sub> aïllat i distorsionat a la geometria que té en l'intermedi s'obté un increment en la càrrega de l'àtom d'O<sub>3</sub> de només 0.02 electrons. Això ens permet concloure que el gran canvi de càrrega és degut exclusivament a l'efecte



Taula XX: Càrregues (unitats atòmiques) sobre els àtoms dels diferents punts estacionaris del procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$  segons el mecanisme de Lipscomb, calculades amb la base pseudo. La numeració dels àtoms és la mateixa que la de la figura 15.

	$q_{\text{Zn}}$	$q_{\text{O}_1}$	$q_{\text{H}_1}$	$q_{\text{C}}$	$q_{\text{O}_2}$	$q_{\text{O}_3}$	$q_{\text{N}}$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$	1.452	-1.069	0.408	-	-	-	-0.759
$\text{CO}_2$	-	-	-	0.963	-0.482	-0.482	-
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$	1.472	-1.063	0.405	1.064	-0.445	-0.630	-0.763
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ TS	1.524	-1.038	0.561	1.099	-0.739	-0.671	-0.770
cis- $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	1.510	-0.939	0.445	1.110	-0.703	-0.672	-0.768
trans- $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	1.512	-0.909	0.448	1.101	-0.702	-0.699	-0.768

de la polarització del  $\text{CO}_2$  pel fragment  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ . L'augment de la càrrega negativa en l' $\text{O}_3$  ens permet explicar la important interacció electrostàtica entre el Zn i l' $\text{O}_3$ . A més, l'augment de la càrrega positiva en l'àtom de C afavoreix el posterior atac nucleofílic de l'àtom d'oxigen del fragment  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  sobre aquest àtom de C.

### 3.2.2.1.1.2 Formació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$

Tal com s'ha dit en la introducció d'aquesta memòria, el mecanisme de Lipscomb implica dos processos diferents; un atac nucleofílic i una transferència protònica. Com ja hem comentat, en el mecanisme proposat per Lipscomb aquests dos processos es troben separats. Tanmateix, hem vist que en l'intermedi que hem presentat en la secció anterior, encara no ha tingut lloc ni l'atac nucleofílic, ni la transferència

protònica. En aquesta secció volem aclarir el grau de sincronia d'aquests dos processos.

En la figura 17 s'ha dibuixat l'estat de transició que correspon al mecanisme de Lipscomb per a la reacció:



En la Taula XIX es donen els valors dels paràmetres geomètrics per a aquest estat de transició. Els quatre àtoms que es troben més implicats en el procés (O<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, i C) formen un anell de quatre membres. Les distàncies són similars a les donades per Liang i Lipscomb usant el mètode PRDDO. [118] Les diferències més remarcables apareixen en les distàncies O<sub>1</sub>-H<sub>1</sub> i O<sub>2</sub>-H<sub>1</sub>, que mostren que la transferència protònica es troba més avançada del que prediria el mètode PRDDO. La distància C-O<sub>1</sub> indica que l'atac nucleofílic es troba també un xic més avançat. La distància entre el Zn i l'O<sub>3</sub> augmenta en l'estat de transició, i per tant la coordinació continua essent tetraèdrica en aquest punt estacionari. Això també es pot veure a partir de la densitat electrònica de l'estat de transició dibuixada en la figura 18, a on s'hi observa que no apareix cap punt crític d'enllaç entre el Zn i l'O<sub>3</sub>. Un altre fet remarcable en el mapa és la presència d'un punt crític d'anell, el qual mostra la formació d'un anell entre els àtoms H<sub>1</sub>, O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, i C. En l'intermedi la densitat electrònica en el punt crític d'enllaç entre el Zn i l'O<sub>1</sub> té un valor de 0.09 unitats atòmiques, mentre que en l'estat de transició té un valor de 0.07. Això ens indica que l'enllaç Zn-O<sub>1</sub> és més feble en l'estat de transició que en l'intermedi. L'energia relativa de l'estat de transició respecte als reactius és de 37.7 kcal/mol.

Les barreres energètiques per a la reacció d'hydratació directa i inversa són 50.6 i 57.0 kcal/mol, respectivament. La barrera de la reacció inversa és molt similar al valor obtingut per Liang i Lipscomb, [118] que és de 56.6 kcal/mol. Per a la reacció directa, en canvi, les barreres són considerablement diferents (37.5 .vs. 50.6 kcal/mol).

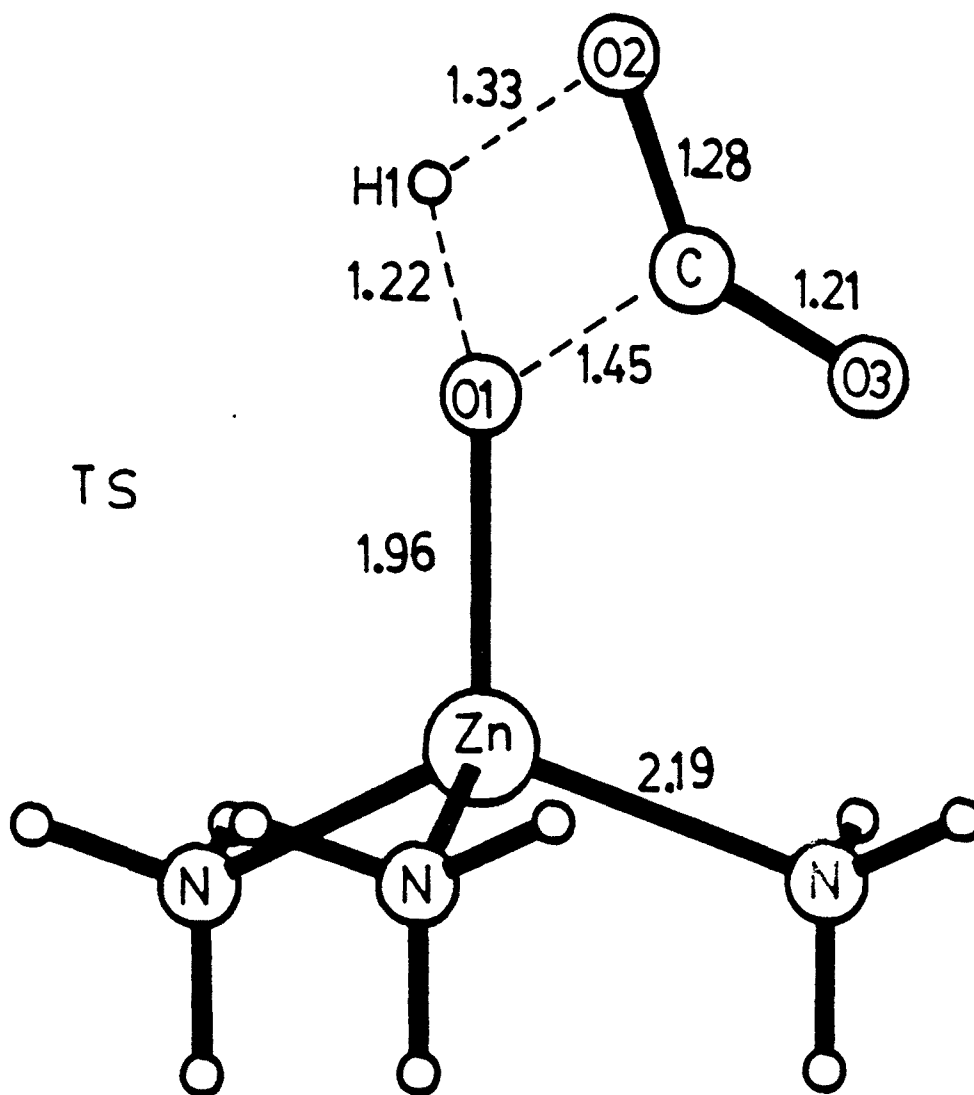


Figura 17: Geometria optimitzada de l'estat de transició de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA segons el mecanisme de Lipscomb, obtinguda amb la base pseudo.

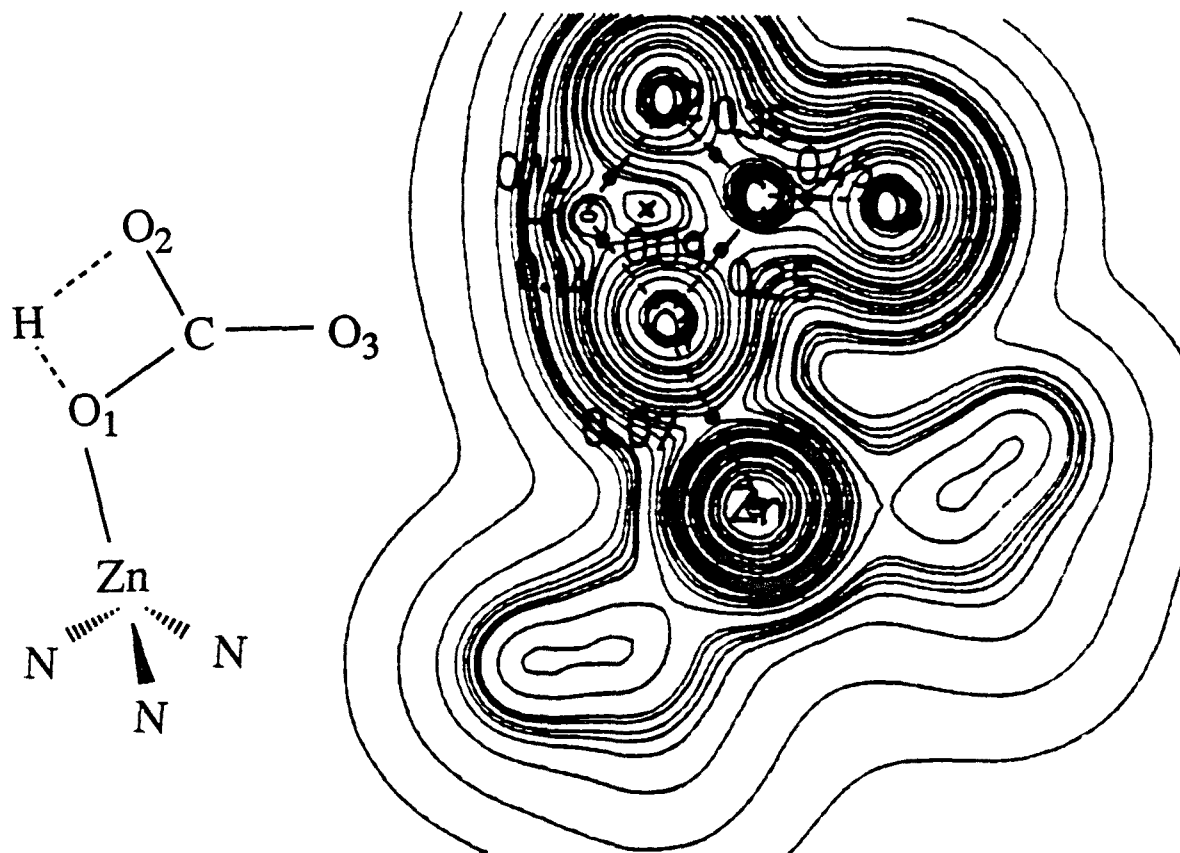


Figura 18: Mapa de densitat electrònica de l'estat de transició segons el mecanisme de Lipscomb en el pla format pel grup hidroxil i el CO<sub>2</sub>. • indica un punt crític d'enllaç. x indica un punt crític d'anell.

Aquest resultat es pot entendre a partir de les diferències en la geometria trobades per als dos intermedis. Com ja hem explicat en la secció anterior, l'intermedi PRDDO es troba més aviat al llarg de la coordenada de reacció, i per tant la barrera de la reacció directa disminueix, d'acord amb el principi de Hammond. La conclusió més remarcable d'aquests valors obtinguts de barreres és que el procés no és catalíticament viable, amb aquest mecanisme.

Per tenir una idea més aprofundida del mecanisme de reacció, les principals components del vector de transició (en coordenades internes) es troben representades en la figura 19. Es pot veure que l'atac nucleofílic i la transferència protònica són processos concertats. Les components més importants del vector de transició corresponen a la transferència protònica, encara que l'atac nucleofílic presenta un valor gens menyspreable. Els ordres d'enllaç de Pauling indiquen que en l'estat de transició l'enllaç C-O<sub>1</sub> es troba un 64% format, l'O<sub>1</sub>-H<sub>1</sub> un 61% trencat, i l'O<sub>2</sub>-H<sub>1</sub> un 28% format. Donat que l'enllaç O<sub>1</sub>-H<sub>1</sub> es troba bastant trencat i l'O<sub>2</sub>-H<sub>1</sub> tot just ha començat a formar-se, la transferència protònica de l'H<sub>1</sub> de l'O<sub>1</sub> a l'O<sub>2</sub> suposarà la contribució més gran a la barrera energètica.

Arribats a aquest punt, podríem discutir si l'atac nucleofílic presenta barrera o pel contrari es dona sense barrera. Com ja hem assenyalat la reacció entre el CO<sub>2</sub> i l'OH<sup>-</sup> no presenta barrera en fase gas. [159] Per contra; en solució es troba una barrera de 13.2 kcal/mol, [404] la qual cosa ha estat comprovada teòricament per diferents grups. [405,406] Aquesta barrera s'origina degut a que la transferència de càrrega de l'OH<sup>-</sup> al CO<sub>2</sub> va acompanyada per una important desolvatació de l'anió hidroxil. Podem considerar que el grup (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup> juga un paper similar al de les molècules de solvent. Com ja hem dit abans, en l'estat de transició la distància Zn-O<sub>1</sub> augmenta, de manera similar a com les molècules de solvent es separen del substracte en un procés de desolvatació. La qüestió de si aquest efecte és prou important per originar una

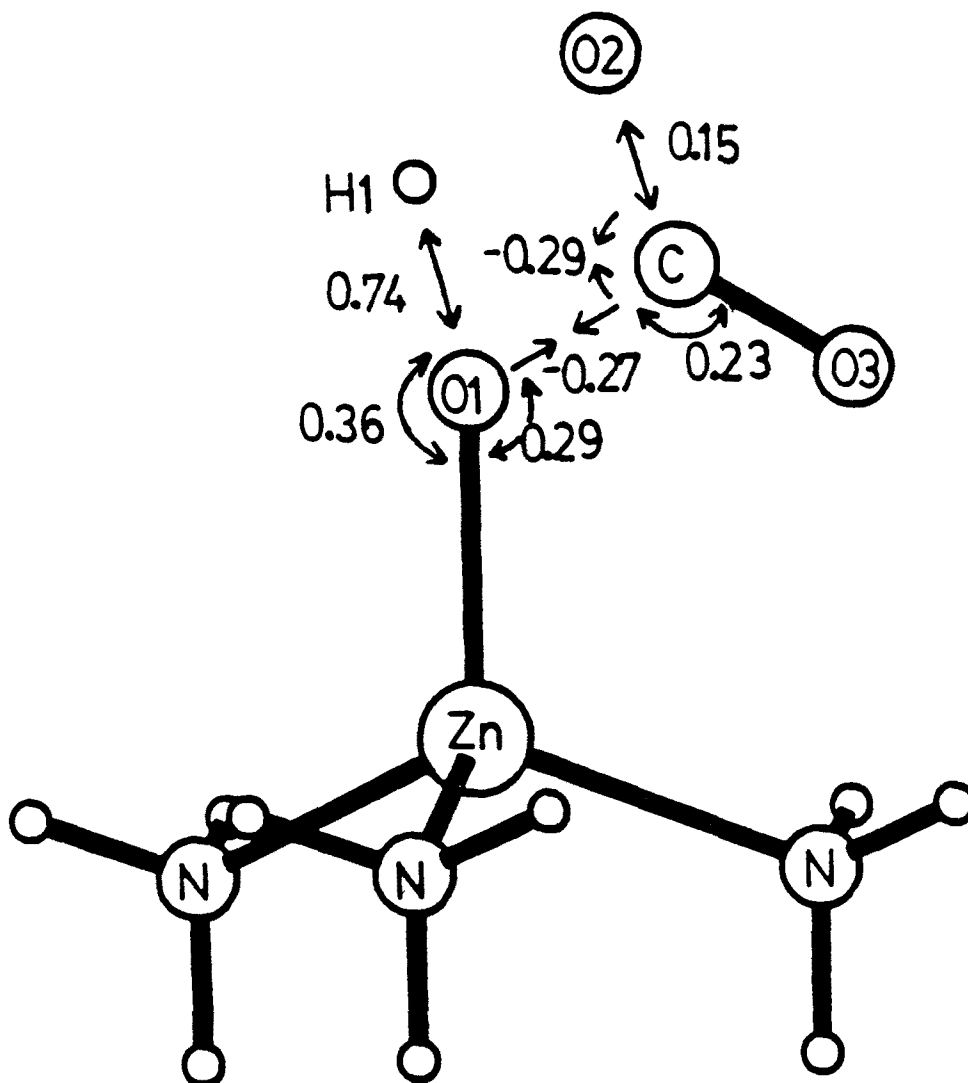


Figura 19: Principals components, en coordenades internes, del vector de transició de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, obtingudes amb la base pseudo.

barrera de reacció per si mateix, no es pot deduir dels nostres resultats, degut a què la transferència protònica i l'atac nucleofílic són processos concertats. En qualsevol cas, en l'estat de transició aquests dos processos no es troben igual d'avançats. Mentre que l'atac nucleofílic quasi ha acabat en l'estat de transició, la transferència protònica es troba només a mig camí. Per acabar, cal assenyalar que l'atac nucleofílic incrementa la càrrega en l'O<sub>2</sub> (veure Taula XX), i facilita així la transferència protònica.

El producte final de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA es mostra en la figura 20. Aquest producte és 6.4 kcal/mol més estable que l'intermedi inicial. En aquesta estructura que hem anomenat -cis l'H<sub>1</sub> es troba més proper a l'O<sub>1</sub> que a l'O<sub>3</sub>. S'ha determinat un altre isòmer que hem anomenat trans-, en el que l'H<sub>1</sub> està més pròxim a l'O<sub>3</sub> que a l'O<sub>1</sub>, i que és més estable que el -cis en 2.1 kcal/mol. En qualsevol cas, donades les petites diferències geomètriques i d'energia que existeixen entre les dues estructures, és d'esperar que s'interconverteixin ràpidament.

### 3.2.2.1.1.3 Resultats 3-21G

Els resultats que hem discutit fins ara de la hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA han estat calculats amb la base que hem anomenat pseudo. Presentarem ara els obtinguts amb la base 3-21G que és la que dóna una descripció unificada del conjunt del treball. La comparació amb els anteriors servirà per establir la seva validesa. A més, treballar amb la base 3-21G ens ha permès una important millora dels nostres resultats: la consideració dels efectes del medi mitjançant un model continu. Els resultats 3-21G que presentem han estat obtinguts amb la reoptimització de les diferents espècies que intervenen en la reacció d'hidratació. Les geometries optimitzades amb la base 3-21G es presenten en la Taula XXI.

Les diferències més notables entre els valors geomètrics de la Taula XXI i de la

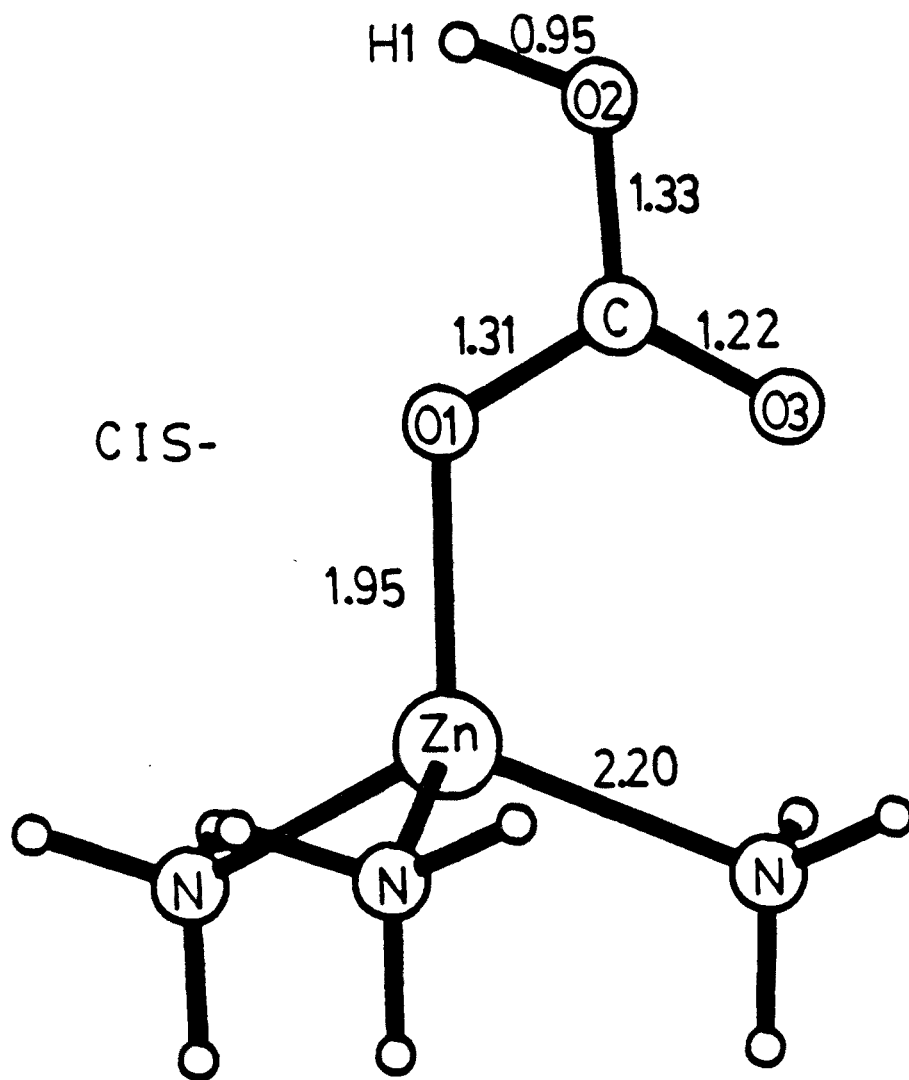


Figura 20: Geometria optimitzada del producte de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, obtinguda amb la base pseudo.



Taula XXI: Paràmetres geomètrics més importants (en Å i graus) dels diferents punts estacionaris en el procés d'hidratació del CO<sub>2</sub>, segons el mecanisme de Lipscomb, calculats amb la base 3-21G.

	(NH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Zn <sup>II</sup> (OH <sup>-</sup> )	CO <sub>2</sub>	INT	TS	trans-
d <sub>Zn-N</sub>	2.056	-	2.047	2.037	2.036
d <sub>Zn-O<sub>1</sub></sub>	1.751	-	1.892	1.853	1.838
d <sub>O<sub>1</sub>-H<sub>1</sub></sub>	0.949	-	0.964	1.208	3.048
d <sub>O<sub>1</sub>-C</sub>	-	-	1.594	1.465	1.297
d <sub>O<sub>2</sub>-C</sub>	-	1.156	1.185	1.276	1.342
d <sub>O<sub>3</sub>-C</sub>	-	1.156	1.236	1.202	1.225
d <sub>O<sub>3</sub>-Zn</sub>	-	-	2.376	3.074	3.054
d <sub>O<sub>2</sub>-H<sub>1</sub></sub>	-	-	2.439	1.326	0.967
O <sub>1</sub> ∠CO <sub>2</sub>	-	-	113.3	98.3	113.6
Zn∠O <sub>1</sub> C	-	-	102.4	120.0	123.8
Zn∠O <sub>1</sub> H <sub>1</sub>	179.4	-	145.2	165.7	213.2
Zn∠O <sub>1</sub> N	113.3	-	112.8	110.6	110.2
O <sub>2</sub> ∠CO <sub>3</sub>	-	180.0	143.2	140.3	122.1

XIX corresponen a la distància Zn-N, que és gairebé 0.2 Å més petita per a totes les espècies estudiades amb la base 3-21G, i a la geometria de l'intermedi, que és considerablement diferent. Així, la base 3-21G ens dona un intermedi en el que l'atac nucleofílic es troba molt més avançat ( $d_{O_1-C}=1.59$  enfront de 2.41 Å amb la base pseudo). Aquest valor per a la distància  $d_{O_1-C}$  és molt similar al obtingut per Lipscomb amb el mètode PRDDO (1.50 Å) [118] i Jacob *et al.* a nivell *ab initio* [173] que han donat un valor de 1.46 Å per a aquesta mateixa distància. Que l'atac nucleofílic es troba molt avançat en aquest intermedi 3-21G també es pot veure dels valors de les càrregues en el fragment CO<sub>2</sub>. Concretament, el C té una càrrega de 1.133 electrons i la transferència de càrrega del (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) al CO<sub>2</sub> ha estat força important, de 0.345 electrons. De fet, es podria afirmar que aquesta espècie es tracta d'un bicarbonat coordinat per l'oxigen que es troba enllaçat al protó. Aquest fet ens indica que l'atac nucleofílic es fa sense barrera energètica, o que, en tot cas, aquesta és molt petita. Pel que fa a la distància Zn-O<sub>3</sub> hem de comentar que també és més curta a nivell 3-21G ( $d_{Zn-O_3}=2.38$  Å) que amb la base pseudo ( $d_{Zn-O_3}=2.75$  Å), encara que el mapa de densitat electrònica a nivell 3-21G és molt similar al de la figura 16 i no s'observa la formació d'un enllaç covalent entre el Zn i l'O<sub>3</sub>. Per la seva part, la geometria de reactius, estat de transició i producte trans-, és molt similar a tots dos nivells. En conjunt, pot dir-se que les geometries obtingudes amb les dues bases són bastant comparables. En especial, la concordança és molt bona per a l'estat de transició, punt clau del mecanisme. Amb les dues bases hem trobat un estat de transició que correspon al mecanisme de Lipscomb.

Les energies relatives de les diferents espècies, a nivell 3-21G, es troben a la Taula XXII. Es pot veure com, respecte al que teniem amb la base pseudo, l'intermedi inicial i, sobre tot, el producte, es troben més estabilitzats (-20.3 kcal/mol enfront de -12.9 kcal/mol i -31.6 kcal/mol enfront de -19.3 kcal/mol). L'estat de transició està ara

Taula XXII: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$  segons el mecanisme de Lipscomb, i barreres per a la reacció directa i inversa, computades amb la base 3-21G, a nivell SCF i a nivell MP2.

	SCF	MP2
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) + \text{CO}_2$	0.	0.
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ INT	-20.3	-12.4
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ TS	22.3	24.0
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	-31.6	-15.1
Barrera reacció directa	42.6	36.4
Barrera reacció inversa	53.9	39.1

més baix respecte dels reactius que abans (22.3 enfront de 37.7 kcal/mol). Aquests valors porten a barreres de reacció comparables amb els dos mètodes, tot i que són una mica més petites a nivell 3-21G (42.6 i 53.9 kcal/mol per les reaccions directa i inversa, enfront de 50.6 i 57.4 kcal/mol amb la base pseudo).

Per veure si és important l'efecte de la correlació electrònica en les barreres de reacció, hem introduït energia de correlació, a nivell MP2, a les estructures optimitzades 3-21G. Les energies relatives MP2 es presenten també a la Taula XXII.

Pot veure's a la Taula com l'efecte d'incloure energia de correlació és desestabilitzar, respecte dels reactius, l'intermedi inicial, i sobre tot el producte, i deixar pràcticament inalterat l'estat de transició. Aquests resultats fan disminuir les barreres de reacció a 36.4 kcal/mol per a la reacció directa, i 39.1 kcal/mol per a la inversa. Tot i la disminució en 6.2 kcal/mol de la barrera, es desprèn d'aquests resultats que el mecanisme de Lipscomb, tal i com s'ha plantejat fins ara, no és viable en el cicle catalític. Experimentalment s'ha determinat que la barrera per aquesta etapa no pot superar les 10 kcal/mol. [157]

### 3.2.2.1.2 Incorporació d'una molècula d'aigua addicional a la descripció del centre actiu

El mecanisme que hem estudiat presenta una barrera superior a la determinada per Merz *et al.*, [157] Liang i Lipscomb, [118] i Jacob *et al.* [173] per al mecanisme de Lindskog. Sembla, doncs, que el mecanisme de Lindskog o d'esfera interna sense transferència protònica sigui el més probable. Arribats a aquest punt, cal recordar que en el centre actiu de l'enzim es troben un conjunt de molècules d'aigua no directament unides al metall (veure figura 1). La barrera del procés que hem estudiat fins ara es deu, en gran mesura, a la transferència protònica entre els dos oxígens. Es sap que les transferències protòniques com l'estudiada aquí es veuen facilitades per la presència de molècules d'aigua que en el procés actuen com a catalitzadors bifuncionals, és a dir, acceptant un protó per un costat, i alliberant-ne un per l'altre. A la vegada, l'entrada d'aquestes molècules d'aigua redueixen la tensió de l'anell [118,162,407,408] per formació d'un cicle menys tensionat en l'estat de transició. Es d'esperar que l'estat de transició que tenim, amb un anell de quatre membres, s'estabilitzi molt si són sis o més membres els que intervenen en la seva formació. Al respecte, cal assenyalar

que càlculs previs de Lipscomb [80,118,156] usant el mètode PRDDO han mostrat que la barrera de 35.6 kcal/mol per a la transferència protònica intramolecular en el  $\text{HCO}_3^-$  aïllat es redueix a 3.5 kcal/mol quan intervé una molècula d'aigua en el procés de transferència, i a 1.4 kcal/mol si són dues les molècules que intervenen en el procés. Es per això, que els efectes de solvatació es preveuen molt importants en el mecanisme de Lipscomb. [118,173] Això ens fa pensar que el mecanisme de Lipscomb o d'esfera externa podria ésser el més indicat per a la interconversió del  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  en la CA, si s'inclou una molècula d'aigua addicional prenent part en la transferència protònica.

Per tal de comprovar aquesta hipòtesi hem afegit una molècula d'aigua a la descripció del centre actiu. Hem separat aquesta secció en dues parts que corresponen a l'enllaç del  $\text{CO}_2$  al centre actiu de l'enzim, i a la formació de l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-) \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

### 3.2.2.1.2.1 Enllaç del $\text{CO}_2$ al centre actiu

La figura 21 ens mostra la geometria de l'intermedi quan s'ha introduït una molècula d'aigua addicional al centre actiu.

Aquesta molècula d'aigua forma dos enllaços d'hidrogen, un per interacció d'un dels hidrògens amb l'àtom d'oxigen  $\text{O}_2$  del  $\text{CO}_2$ , i l'altre per interacció de l' $\text{O}_4$  de l'aigua amb l'H unit a l' $\text{O}_1$ . Aquest segon és l'enllaç més fort, tal com es desprèn dels valors de les distàncies  $\text{O}_2\text{-H}$  i  $\text{O}_4\text{-H}$ , així com dels ordres d'enllaç de Mayer [409] per a aquests enllaços, que són de 0.081 i 0.176, respectivament. Cal assenyalar que els ordres d'enllaç de Mayer entre dos àtoms A i B en sistemes a capa tancada venen

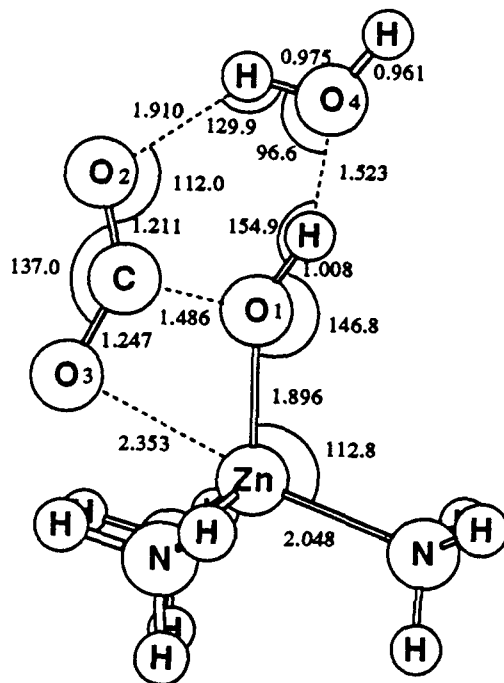


Figura 21: Geometria optimitzada de l'intermedi inicial de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, obtinguda amb la base 3-21G, per al model de centre actiu que incorpora una molècula d'aigua addicional.

donats per:

$$B_{AB} = \sum_{\mu \in A} \sum_{\nu \in B} (PS)_{\mu\nu} (PS)_{\nu\mu} \quad (84)$$

on P i S són les matrius densitat i de solapament, respectivament, i  $\mu$  i  $\nu$  són orbitals atòmics.

Respecte al fragment de  $\text{CO}_2$  hem de comentar dues coses. La primera és que aquesta molècula està ara molt més deformada que en absència d'aigua. La segona està molt connectada amb la primera, i és que ara l'atac nucleofílic es troba més avançat. La distància C-O<sub>1</sub> ha passat de 1.594 a 1.480 Å quan s'ha afegit la molècula d'aigua, i el seu ordre d'enllaç és ara 0.610, el que indica un enllaç quasi format. La transferència electrònica cap al  $\text{CO}_2$  ha estat de 0.350 electrons en aquest estadi inicial de la interacció. Tot això ens demostra que en presència d'una molècula d'aigua addicional, l'atac nucleofílic del  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{H}_2\text{O}$  al  $\text{CO}_2$  es troba força avançat, molt més del que s'observava en absència d'aigua. L'efecte d'aquesta molècula d'aigua ha estat augmentar la càrrega positiva sobre el C i la negativa sobre l'O<sub>1</sub> a través de la formació dels dos enllaços d'hidrogen. Això ha facilitat molt l'atac nucleofílic inicial. Per la seva part, la distància Zn-O<sub>3</sub> continua essent semblant, el que ens porta a concloure que el  $\text{CO}_2$  no s'uneix directament al  $\text{Zn}^{+2}$ .

L'energia d'interacció de l'aigua amb el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$  és de 27.6 kcal/mol, que correspon bàsicament a la formació dels dos enllaços d'hidrogen.

### 3.2.2.1.2.2 Formació de l'espècie $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$

Com ja hem comentat, ara l'atac nucleofílic es troba quasi acabat en l'intermedi inicial, de manera que és d'esperar que l'estat de transició que porta a la formació de l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-) \cdot \text{H}_2\text{O}$  tingui, com a component principal del vector de

transició, la que correspon a la transferència protònica.

En la figura 22 es troba representat l'estat de transició per a la reacció de formació del bicarbonat. És bonic observar com ara s'ha format l'esperat anell de sis membres (O<sub>1</sub>, C, O<sub>2</sub>, H, O<sub>4</sub>, H) que estabilitza notablement el producte. En passar de l'intermedi a l'estat de transició, la distància C-O<sub>1</sub> ha canviat només de 1.486 a 1.437 Å, de manera semblant al que passava sense la molècula d'aigua, en que el canvi era de 1.594 a 1.465 Å. La component del vector de transició (dibuixat en la figura 23) que correspon a aquesta distància s'ha fet més petita i ha passat a ésser ara de -0.18. Això ens mostra un cop més que en aquest estat de transició pràcticament ja no hi ha atac nucleofílic. De fet es pot veure que les components més importants són les relacionades amb la transferència protònica. Bàsicament, aquest vector de transició ens mostra que en l'estat de transició, el moviment més important és el dels dos H que es transfereixen simultàniament. La molècula d'aigua no és un espectador de la reacció, sinó que intervé activament en el procés. Aquest fet ja havia estat observat per altres autors en diferents reaccions en les que el solvent és part activa de la coordenada de reacció. [162,394,407,408,410,411] Finalment, es pot veure que la distància Zn-O<sub>3</sub> s'ha fet més gran en passar de l'intermedi a l'estat de transició.

Es interessant observar com les distàncies O-H són força similars, el que dóna lloc a la formació d'un anell de sis membres bastant regular. Encara que hi ha quatre enllaços O-H mig formats i mig trencats, la barrera energètica referida a l'intermedi és només de 19.0 kcal/mol. Es a dir, la introducció d'una molècula d'aigua en el centre actiu suposa una disminució de 21.6 kcal/mol de la barrera energètica per al mecanisme de Lipscomb. La introducció de més molècules d'aigua afectaria poc el valor de la barrera segons s'espera del resultat obtingut per Lipscomb *et al.*, [80,118,156] el qual ha demostrat que la barrera per la transferència protònica intramolecular en el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> només varia de 3.5 a 1.4 kcal/mol quan intervenen dues molècules d'aigua



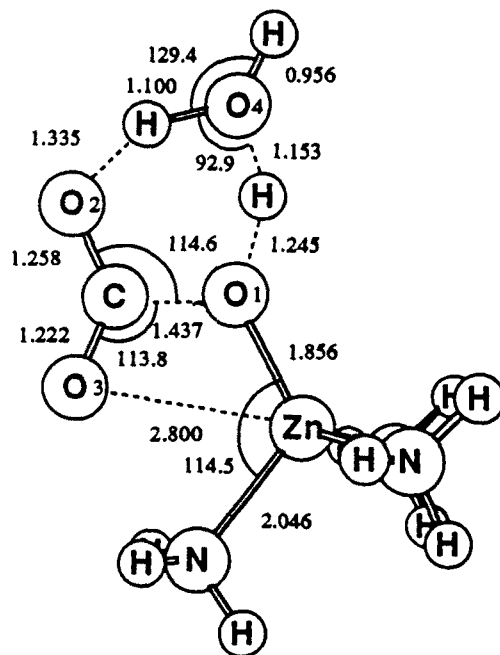


Figura 22: Geometria optimitzada de l'estat de transició de la reacció d'hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA, obtinguda amb la base 3-21G, segons el mecanisme de Lipscomb amb el model de centre actiu que incorpora una molècula d'aigua addicional.

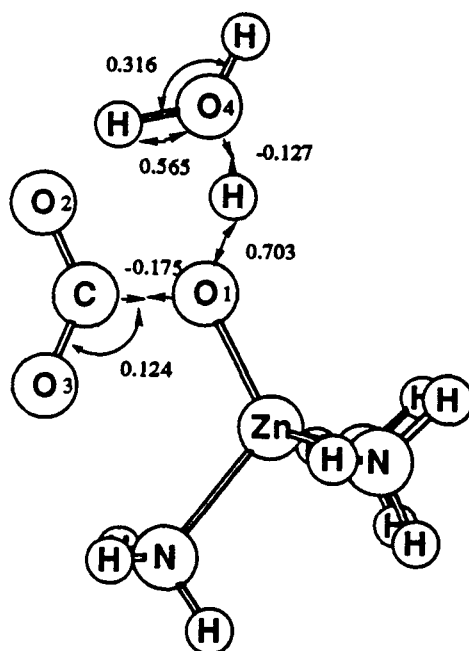


Figura 23: Vector de transició en coordenades internes de l'estat de transició de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, obtingut amb la base 3-21G, segons el mecanisme de Lipscomb amb el model de centre actiu que incorpora una molècula d'aigua addicional.

enlloc d'una. La barrera energètica de 19.0 kcal/mol correspon pràcticament tota a la transferència protònica, donat que com hem mostrat l'atac nucleofílic ja s'ha produït en l'intermedi. La consideració d'una molècula d'aigua addicional en el mecanisme de Lipscomb provoca una notable disminució de la barrera. Això és degut a dos efectes: per una banda, la molècula d'aigua fa que l'atac nucleofílic estigui quasi totalment fet ja a l'intermedi, i per l'altra redueix molt la tensió de l'anell que es forma en l'estat de transició.

El producte final de la reacció d'hydratació del  $\text{CO}_2$  s'ha dibuixat en la figura 24. Aquest producte és 6.4 kcal/mol més estable que l'intermedi inicial. En aquest, l'aigua també hi forma dos enllaços d'hidrogen de diferent intensitat. L'estructura inicial  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$  s'estabilitza 22.7 kcal/mol per la presència d'aquesta molècula d'aigua. La barrera per a la reacció inversa també disminueix sensiblement passant a valer 25.5 kcal/mol. De totes maneres, les barreres són encara massa altes per pensar en la viabilitat d'aquest mecanisme.

### 3.2.2.1.3 Incorporació de l'efecte del camp creat per l'entorn

Fins ara hem considerat un model molt limitat de centre actiu. Els resultats que hem obtingut serien comparables als que obtindríem en fase gasosa, és a dir, en un sistema aïllat. Ara bé, propers al centre actiu de l'enzim es troben una sèrie de residus (veure figura 1) que, tot i que no participen directament la reacció, creen un camp de reacció que pot modificar notablement la reacció respecte al que seria en fase gasosa. Per això en aquest apartat introduïrem l'efecte del medi, considerant-lo com un continu polaritzable, en el mecanisme de Lipscomb. Això ho hem fet amb el model de la cavitat de Tomasi ja comentat. Per tal de poder aplicar aquest mètode a les diferents espècies que intervenen en el procés, hem treballat amb la base 3-21G

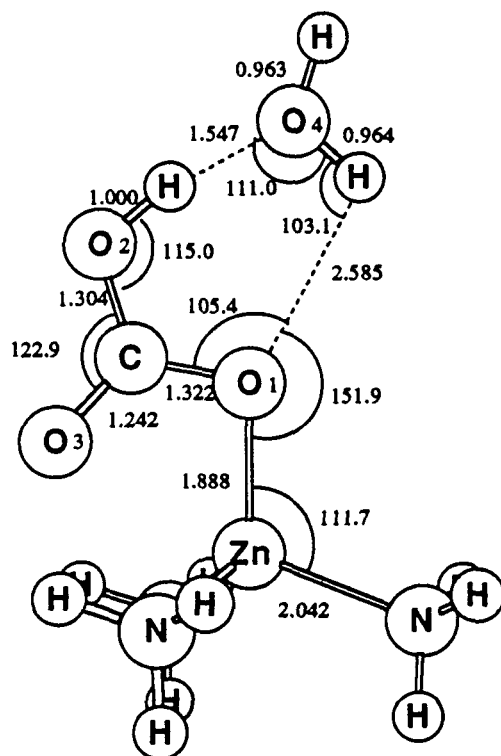


Figura 24: Geometria optimitzada del producte de la reacció d'hydratació del CO<sub>2</sub> en la CA, obtinguda amb la base 3-21G segons el mecanisme de Lipscomb amb el model de centre actiu que incorpora una molècula d'aigua addicional.

i amb les geometries optimitzades amb aquesta mateixa base. Els radis de les esferes construïdes sobre els diferents àtoms pel model de Tomasi han estat els mateixos que en la secció 3.1.2.4 per a l'O, N, i H, mentre que per al C s'ha agafat  $r_C = 1.94 \text{ \AA}$ .

S'ha dividit aquest apartat en dos subapartats. En el primer, s'introdueix l'efecte del camp de reacció a les espècies que hem localitzat quan el model de centre actiu era el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ . En el segon, es fa el mateix quan en el model utilitzat per a la descripció del centre actiu s'hi ha incorporat una molècula d'aigua addicional. En els dos casos, s'han considerat dos entorns diferents amb dos valors diferents de la constant dielèctrica. Els valors de les constants dielèctriques que hem emprat corresponen a la d'un medi com el n-hexà ( $\epsilon=1.88$ ) i a un com l'aigua ( $\epsilon=78.36$ ). La comparació d'aquests amb el de fase gasosa ( $\epsilon=1.00$ ) ens donarà idea de l'efecte del camp de reacció en el procés.

#### 3.2.2.1.3.1 Modelació del centre actiu amb $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$

En la Taula XXIII es recullen els valors de les energies lliures per a les contribucions electrostàtica ( $\Delta G_{el}$ ) i de cavitació ( $G_{cav}$ ) a l'energia lliure de solvatació ( $\Delta G_{solv}$ ), per a tots els punts estacionaris de la reacció d'hydratació del  $\text{CO}_2$  catalitzada pel  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ .

El fet més remarcable és la més gran estabilització de l'estat de transició respecte a les altres espècies que intervenen en el procés, que ha de portar a una reducció considerable de la barrera energètica. La diferent estabilització de l'intermedi i el producte enfront de l'estat de transició, es fa més gran en augmentar la constant dielèctrica del medi. La raó d'aquest comportament es troba en la més gran separació de càrrega que hi ha en l'estat de transició. Així per exemple, les càrregues sobre els

Taula XXIII: Energies lliures de solvatació i les seves components electrostàtica i de cavitació (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del CO<sub>2</sub> segons el mecanisme de Lipscomb, en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.88$			$\epsilon=78.36$		
	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) + CO_2$	-31.7	14.4	-17.3	-69.0	23.2	-45.8
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) \cdot CO_2$ INT	-33.5	11.0	-22.5	-74.7	18.2	-56.5
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) \cdot CO_2$ TS	-36.2	11.1	-25.1	-80.9	18.5	-62.5
$(NH_3)_3Zn^{II}(HCO_3^-)$	-33.1	11.3	-21.8	-73.4	18.8	-54.6

àtoms O<sub>3</sub> i H<sub>1</sub> passen de -0.759 i 0.447 a -0.904 i 0.499 au, al passar de l'intermedi a l'estat de transició, respectivament, en un medi d' $\epsilon=1.00$ . L'intermedi inicial i el producte s'estabilitzen de manera molt similar.

En la Taula XXIV es donen els valors de les energies relatives de les diferents espècies i de la barrera de reacció directa i inversa per a la hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, en fase gas, en un medi de constant dielèctrica  $\epsilon=1.88$  i en un de constant dielèctrica  $\epsilon=78.36$ .

Dels resultats de la Taula XXIV s'observa que l'augment de la constant dielèctrica del medi de reacció es tradueix en tres efectes importants: el primer, és l'estabilització

Taula XXIV: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$ , i barreres per a la reacció directa i inversa, segons el mecanisme de Lipscomb, en medis d' $\epsilon=1.00$ ,  $1.88$  i  $78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.00$	$\epsilon=1.88$	$\epsilon=78.36$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) + \text{CO}_2$	0.	0.	0.
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ INT	-20.3	-22.1	-25.9
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ TS	22.3	17.8	4
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	-31.6	-33.0	-36.0
Barrera reacció directa	42.6	39.9	36.3
Barrera reacció inversa	53.9	50.8	46.4

de l'intermedi inicial; el segon, l'augment de l'exotermicitat de la reacció; i el tercer, la disminució de la barrera per a la reacció en els dos sentits.

Així doncs, la reacció d'hidratació es veu molt afavorida per la presència de medis d'elevada constant dielèctrica. Tot i això, els valors de la barrera fins i tot quan  $\epsilon=78.36$ , fan que el mecanisme que estem considerant no sigui viable.

### 3.2.2.1.3.2 Incorporació d'una aigua addicional a la descripció del centre actiu

Com ja hem mostrat en la secció 3.2.2.1.2, la incorporació d'una nova molècula d'aigua rebaixa la barrera energètica per al mecanisme de Lipscomb fins a 19.0 kcal/mol. Aquesta molècula d'aigua addicional actua com catalitzador bifuncional donant lloc a la formació d'un anell de sis àtoms.

En la Taula XXV es donen els valors de les energies lliures electrostàtica, de cavitació i de solvatació, per a tots els punts estacionaris de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> quan s'ha afegit una molècula d'aigua a la descripció del centre actiu. Com en la Taula XXIII, el fet més interessant és la important estabilització de l'estat de transició respecte a les altres espècies que intervenen en el procés. Aquesta estabilització ve provocada, igual que abans, per l'augment de la separació de càrrega.

En la Taula XXVI es donen els valors de les energies relatives de les diferents espècies i de la barrera de reacció directa i inversa, per a la hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, en fase gasosa, en un medi de constant dielèctrica  $\epsilon=1.88$  i en un de constant dielèctrica  $\epsilon=78.36$ .

Els resultats de la Taula XXVI mostren com l'augment de la constant dielèctrica del medi de reacció suposa una desestabilització de l'intermedi inicial entre el complex



Taula XXV: Energies lliures de solvatació i les seves components electrostàtica i de cavitació (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$ , quan s'ha afegit una molècula d'aigua addicional a la descripció del centre actiu, en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.88$			$\epsilon=78.36$		
	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-35.5	14.7	-21.8	-82.2	23.7	-58.5
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O INT}$	-32.4	12.1	-20.3	-72.5	20.2	-52.3
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O TS}$	-35.1	12.1	-23.0	-78.8	20.2	-58.7
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-) \cdot \text{H}_2\text{O}$	-29.6	12.6	-17.0	-65.5	21.0	-44.5

Taula XXVI: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hydratació del CO<sub>2</sub> quan s'ha considerat una aigua addicional en el model de centre actiu, i barreres per a la reacció directa, en fase gas i en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $\epsilon=78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.00$	$\epsilon=1.88$	$\epsilon=78.36$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	0.	0.	0.
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O INT}$	-27.5	-23.5	-17.8
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O TS}$	-8.5	-7.2	-5.1
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-) \cdot \text{H}_2\text{O}$	-34.0	-27.1	-17.3
<b>Barrera reacció directa</b>	19.0	16.3	12.7
<b>Barrera reacció inversa</b>	25.5	20.1	12.2

$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$  i l'aigua, una disminució de la barrera, i per acabar, una disminució de l'exotermicitat de la reacció. Aquests efectes són els mateixos que els que provocava la consideració del medi en la reacció de desprotonació de l'aigua estudiada en la secció 3.1.

Es important assenyalar que la disminució de la barrera es fa pràcticament per igual en els dos sentits de la reacció, la qual cosa és clau en un procés catalític reversible com el que estem tractant. Les disminucions de les barreres per efecte del medi són del mateix ordre que en el cas del model sense aigua addicional (d'unes 6 kcal/mol). Ara bé, donat que en el procés estudiat amb el model que incorpora una aigua addicional, es parteix de barreres en fase gasosa que són ja bastant baixes, s'obtenen resultats de barreres molt propers al valor màxim permès des d'un punt de vista experimental que és de 10 kcal/mol. [157]

Hem de dir que degut a problemes de software no hem pogut introduir correccions de correlació a nivell MP2 per al model que incorpora una molècula addicional, però que donada la natura equivalent dels dos processos, es pot pensar que la correcció de correlació a la barrera energètica serà bastant semblant, i per tant d'aproximadament 6.2 kcal/mol. Si suposem ara que els efectes de solvatació i de correlació electrònica són addicionables, el valor de 19.0 kcal/mol per a la barrera de la reacció, disminuirà en 12.5 kcal/mol (6.3 de solvatació + 6.2 de correlació). D'aquesta manera la barrera per a la reacció directa passaria a ésser de només 6.5 kcal/mol. Aquest valor es troba ja dins el marge de valors possible des d'un punt de vista experimental. Això suposa que el mecanisme de Lipscomb quan es considera que la transferència protònica es fa a través d'una molècula d'aigua, és un possible mecanisme per explicar la hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA. En un proper apartat anem a discutir la validesa del mecanisme de Lindskog en el model de centre actiu  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ .

### 3.2.2.2 Mecanisme de Lindskog

S'han publicat darrerament dos treballs teòrics molt interessants sobre el mecanisme de Lindskog. En el primer, de Merz *et al.*, [157] determinen que la barrera energètica per a aquest procés és de 13.1 kcal/mol, i que la consideració d'una molècula d'aigua addicional en el centre actiu augmenta 2 kcal/mol aquesta barrera. En el segon, de Jacob *et al.* [173] es determina que la barrera energètica per al mecanisme de Lindskog és de només 2.7 kcal/mol. Aquest segon treball ha estat fet a nivell *ab initio* amb una base estesa.

Aquests dos treballs donen barreres molt properes al que hem obtingut per al mecanisme de Lipscomb quan hem incorporat una molècula d'aigua al centre actiu, i hem tingut en compte els efectes de solvatació i de correlació electrònica. Això ens fa pensar que el mecanisme de Lindskog pot ésser també un bon candidat per explicar la reacció d'hydratació del CO<sub>2</sub> en la CA.

Del treball AM1 de Merz *et al.* [157] se'n dedueix que l'efecte d'una molècula d'aigua addicional no és massa important. De fet es produeix un augment de la barrera en aquest cas de només 2 kcal/mol. Aquesta molècula d'aigua no intervé directament en el procés, a diferència del que passava en el mecanisme de Lipscomb, i només actua formant un enllaç d'hidrogen amb l'oxigen directament unit al Zn<sup>+2</sup>. Per això, en el nostre estudi del mecanisme de Lindskog només hem considerat el model de centre actiu (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>), sense estudiar què passa quan s'hi incorpora una molècula d'aigua a la seva descripció.

Els càlculs que hem dut a terme en aquesta secció s'han fet amb la base 3-21G. Cal assenyalar que l'estudi de l'enllaç inicial del CO<sub>2</sub> al centre actiu de l'enzim, i el producte final del procés són els mateixos que els de la secció 3.2.2.1.1.3, de manera

que no seran estudiats altre cop en aquesta secció.

Així doncs, el que presentarem en els dos apartats següents serà únicament l'estat de transició i els efectes de l'entorn sobre aquest mecanisme.

### 3.2.2.2.1 Formació de l'espècie $EZn^{II}(HCO_3^-)$

Ja hem comentat que en l'intermedi  $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) \cdot CO_2$  a nivell 3-21G el grup  $(OH^-) \cdot CO_2$  es pot considerar com una molècula de bicarbonat que es troba coordinada al  $Zn^{+2}$  per l'oxigen  $O_1$  que està enllaçat també a un àtom d'H. Així doncs, l'estat de transició per el mecanisme de Lindskog ha de correspondre, bàsicament, a un canvi d'oxigen coordinat directament al metall, donat que en el producte final l'oxigen que es troba coordinat és l' $O_3$ .

En la figura 25 s'ha dibuixat l'estat de transició per a la reacció (83) segons el mecanisme de Lindskog. El seu vector de transició, en coordenades internes, es troba dibuixat en la figura 26. Donat que està definit en coordenades internes, aquests valors depenen de la definició que haguem pres de la Z-Matrix. No obstant això, ens donen una idea molt clara del que passa en l'estat de transició. S'observa que en aquest estat de transició l'H és tan sols un espectador del procés, i no intervé directament en la reacció. Les components principals del vector de transició són les que corresponen als enllaços  $Zn-O_1$  (0.887) i  $Zn-O_3$  (-0.243). Aquests valors indiquen que en l'estat de transició bàsicament tot el moviment correspon als àtoms  $O_1$  i  $O_3$ , que es mouen de manera que la distància  $Zn-O_1$  es fa més gran i la  $Zn-O_3$  s'escurça.

Per conèixer si aquest estat de transició és penta- o tetracoordinat, és a dir, si els dos oxígens estan coordinats al  $Zn^{+2}$  o no, hem dibuixat el mapa de densitat electrònica en la figura 27, on s'hi observa un enllaç fort entre el Zn i l' $O_3$  mentre que

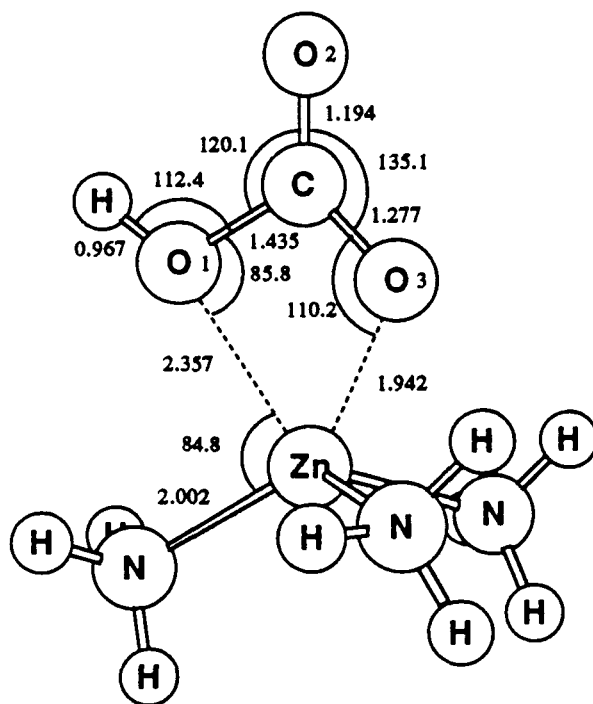


Figura 25: Geometria optimitzada de l'estat de transició de la reacció d'hydratació del CO<sub>2</sub> en la CA segons el mecanisme de Lindskog, obtinguda amb la base 3-21G.

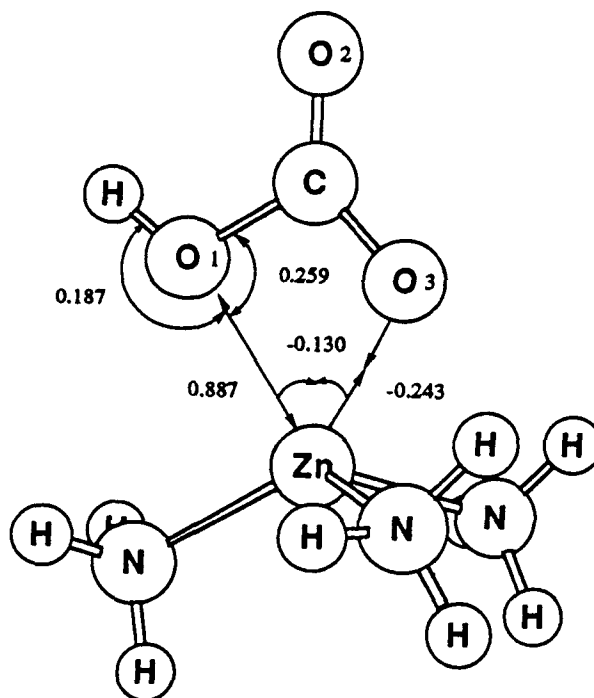


Figura 26: Vector de transició per a l'estat de transició de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA segons el mecanisme de Lindskog, obtingut amb la base 3-21G.

entre el Zn i l'àtom O<sub>1</sub> només hi ha una forta interacció de tipus electrostàtic, però no pas enllaç químic amb compartició d'electrons.

En aquest estat de transició la distància Zn-O<sub>1</sub> està bastant trencada i la Zn-O<sub>3</sub> està ja força formada. Concretament, els índexs de Mayer d'aquests dos enllaços són de 0.190 i 0.473, respectivament. Es tracta doncs, d'un estat de transició dels anomenats "product-like". A nivell AM1, Merz *et al.* [157] han trobat un estat de transició d'unes característiques similars, encara que en aquest la distància Zn-O<sub>1</sub> és més curta que la Zn-O<sub>3</sub>, el que indica un estat de transició de tipus "reactant-like".

Les energies relatives de les diferents espècies, a nivell 3-21G i MP2/3-21G//3-21G, es troben en la Taula XXVII. Es pot veure que a nivell SCF aquest estat de transició es troba ara 18.1 kcal/mol per sota dels reactius ((NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>) + CO<sub>2</sub>), el que ens dóna una idea de la seva gran estabilitat. La barrera energètica calculada com a diferència d'energies entre l'estat de transició i l'intermedi és de 2.2 kcal/mol per a la reacció directa, i 13.5 kcal/mol per a la reacció inversa. Quan s'inclou la correcció de correlació electrònica a nivell MP2, la barrera per a la reacció directa augmenta en 5.8 kcal/mol, per acabar essent de 8.0 kcal/mol, mentre que per a la reacció inversa baixa fins a 10.7 kcal/mol. A l'afegir correlació electrònica, les barreres per a la reacció en els dos sentits tendeixen a igualar-se. Per altre costat, la correcció de correlació disminueix també la diferència entre les barreres calculades per al mecanisme de Lipscomb i de Lindskog. Aquest fet ja ha estat observat per Jacob *et al.* [173] en un treball recent.

#### 3.2.2.2.2 Incorporació de l'efecte del camp creat per l'entorn

A l'igual que hem fet en la secció 3.2.2.1.3 anem a introduir l'efecte de l'entorn sobre el perfil energètic del mecanisme de Lindskog, mitjançant el mètode de Tomasi.



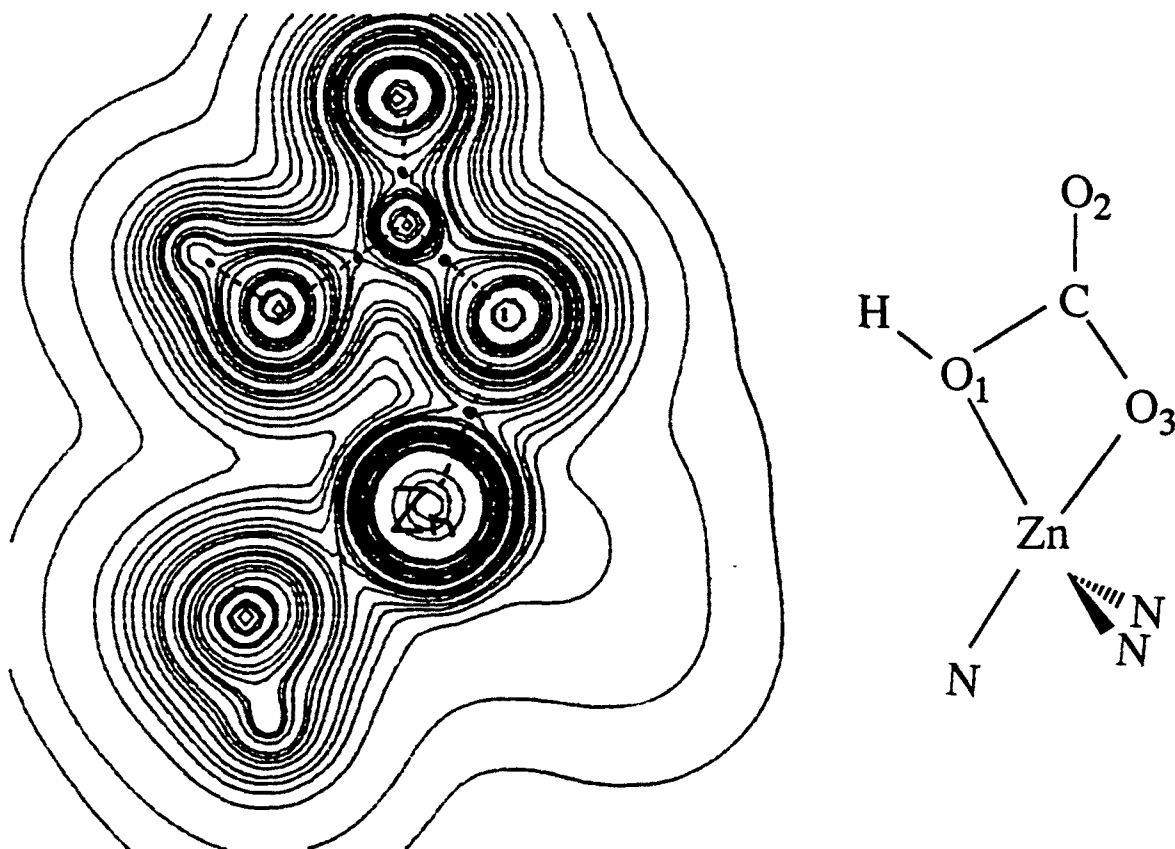


Figura 27: Mapa de densitat electrònica de l'estat de transició segons el mecanisme de Lindskog en el pla format pel grup hidroxil i el CO<sub>2</sub>. • indica un punt crític d'enllaç.

Taula XXVII: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del CO<sub>2</sub> segons el mecanisme de Lindskog, i barreres per a la reacció directa i inversa, calculades amb la base 3-21G, al nivell SCF i al nivell MP2.

	SCF	MP2
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) + \text{CO}_2$	0.	0.
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ INT	-20.3	-12.4
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ TS	-18.1	-4.4
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	-31.6	-15.1
Barrera reacció directa	2.2	8.0
Barrera reacció inversa	13.5	10.7

Taula XXVIII: Energies lliures de solvatació i les seves components electrostàtica i de cavitació (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del CO<sub>2</sub> segons el mecanisme de Lindskog, en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.88$			$\epsilon=78.36$		
	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) + CO_2$	-31.7	14.4	-17.3	-69.0	23.2	-45.8
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) \cdot CO_2$ INT	-33.5	11.0	-22.5	-74.7	18.2	-56.5
$(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-) \cdot CO_2$ TS	-34.6	11.2	-23.4	-77.2	18.7	-58.5
$(NH_3)_3Zn^{II}(HCO_3^-)$	-33.1	11.3	-21.8	-73.4	18.8	-54.6

En la Taula XXVIII es recullen els valors de les energies lliures per a les contribucions electrostàtica ( $\Delta G_{el}$ ) i de cavitació ( $G_{cav}$ ) a l'energia lliure de solvatació ( $\Delta G_{solv}$ ), per a tots els punts estacionaris de la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> catalitzada per  $(NH_3)_3Zn^{II}(OH^-)$ , segons el mecanisme de Lindskog.

Per a la geometria optimitzada de l'estat de transició a nivell 3-21G, s'obté que l'energia lliure de solvatació és de -23.4 kcal/mol en un medi d' $\epsilon=1.88$ , i de -58.5 kcal/mol en un d' $\epsilon=78.36$ . Comparant aquests valors amb els de la Taula XXIII, hi observem dues coses. La primera, és que l'estat de transició de Lindskog s'estabilitza

1.7 i 4.0 kcal/mol menys que el de Lipscomb en medis d' $\epsilon=1.88$  i 78.36, respectivament. L'efecte del medi, per tant, és més important en el mecanisme de Lipscomb que en el de Lindskog. La segona és que, tot i així, l'estat de transició de Lindskog s'estabilitza més que els altres punts estacionaris, degut a la concentració de càrrega negativa que té lloc sobre els dos oxígens que intervenen més en el procés (O<sub>1</sub> i O<sub>3</sub>). Concretament, en fase gasosa les càrregues de l'O<sub>1</sub> i l'O<sub>3</sub> són de -0.790 i -0.823 au, respectivament.

En la Taula XXIX es donen els valors de les energies relatives de les diferents espècies i de les barreres per a la reacció directa i inversa, per a la hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, en fase gasosa, en un medi d' $\epsilon=1.88$  i en un d' $\epsilon=78.36$ , segons el mecanisme de Lindskog. Com en el mecanisme de Lipscomb, l'augment de la constant dielèctrica suposa l'estabilització de l'intermedi inicial, l'augment de l'exotermicitat de la reacció i la disminució de la barrera per a la reacció en els dos sentits. Respecte al què passa en fase gasosa, la barrera energètica del mecanisme de Lindskog en un medi d' $\epsilon=78.36$  passa de 2.2 kcal/mol a no existir barrera per a la reacció directa, i de 13.5 a 9.8 kcal/mol per a la reacció inversa. En un medi de constant dielèctrica  $\epsilon=1.88$ , les barreres són de 1.1 i 12.0 kcal/mol per a les reaccions directa i inversa respectivament. Així doncs, l'efecte de l'entorn facilita tant la reacció directa com la inversa. Aquest resultat que hem obtingut és diferent al que varen presentar Merz *et al.* [157] amb el mètode AM1 amb la introducció d'una nova molècula d'aigua en la descripció del centre actiu. Com ja hem comentat, aquesta molècula d'aigua forma un enllaç d'hidrogen amb l'O<sub>1</sub>, el que acaba per suposar un augment de la barrera energètica en 2.0 kcal/mol. El mecanisme de Lindskog no està catalitzat per la intervenció específica d'una molècula d'aigua en el procés, però sí que ho està pels efectes electrostàtics del medi.

Si considerem com abans que els efectes de correlació i de l'entorn són additius, la barrera per a la reacció directa acaba essent de 5.5 kcal/mol (2.2 + 5.8 - 2.5), i per a la

Taula XXIX: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés d'hidratació del  $\text{CO}_2$ , i barreres per a la reacció directa i inversa, segons el mecanisme de Lindskog, en medis d' $\epsilon=1.00$ , 1.88 i 78.36, calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.00$	$\epsilon=1.88$	$\epsilon=78.36$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) + \text{CO}_2$	0.	0.	0.
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ INT	-20.3	-22.1	-25.9
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-) \cdot \text{CO}_2$ TS	-18 .	-21.0	-26.2
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	-31.6	-33.0	-36.0
Barrera reacció directa	2.2	1.1	-0.3
Barrera reacció inversa	13.5	12.0	9.8

reacció inversa de 6.0 kcal/mol (13.5 - 2.8 - 3.7) en un medi d' $\epsilon=78.36$ . Aquests valors de barreres també es troben dins de l'interval esperat per a la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA, i per tant, el mecanisme de Lindskog tampoc és descartable a partir de l'estudi que hem portat a terme.

### 3.2.2.3 Discussió

En aquesta secció hem estudiat la reacció d'hidratació del CO<sub>2</sub> en la CA. Hem estudiat a fons els dos únics mecanismes que s'han proposat fins ara per explicar la formació de l'espècie  $EZn^{II}(HCO_3^-)$ : el mecanisme de Lipscomb i el mecanisme de Lindskog.

A nivell SCF i amb la base 3-21G, per al model de centre actiu amb lligands més senzill assajat, és a dir, el  $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)$  s'ha obtingut que el mecanisme de Lindskog és el més probable, donat que la seva barrera és de només 2.2 kcal/mol, enfront de les 42.6 kcal/mol que s'obtenen per al mecanisme de Lipscomb. Quan s'introdueix energia de correlació a nivell MP2, la diferència energètica entre els dos mecanismes s'escurça i passa a ésser de 27.5 kcal/mol. A aquest nivell de càlcul el mecanisme de Lindskog continua essent el més factible.

La introducció de l'efecte de l'entorn rebaixa la barrera dels dos mecanismes. El seu efecte, però, és més important per al mecanisme de Lipscomb, el que suposa una reducció de la diferència entre ambdós tipus de processos.

Quan el mecanisme de Lipscomb s'estudia amb una molècula d'aigua addicional, i es sumen els efectes de correlació electrònica i de l'entorn per als dos mecanismes, s'obté una barrera per a la reacció directa de 6.8 kcal/mol. Per la seva part, amb correlació i considerant els efectes de l'entorn la barrera surt de 5.5 kcal/mol per al

mecanisme de Lindskog. Això implica que per al model de centre actiu considerat, al nivell de càlcul emprat, el mecanisme de Lindskog es troba lleugerament afavorit. Aquests resultats, però, no ens permeten assegurar quin dels dos mecanismes és el més probable en la CA. Per altre costat, experimentalment s'han donat proves a favor dels dos mecanismes. [103,119,401,412,413] Tot això ens fa pensar en la possibilitat que voldríem llençar en aquesta Tesi de què els dos mecanismes coexisteixin en la CA, i que segons les fluctuacions de les molècules del medi i en especial de la molècula d'aigua que ajuda a la transferència protònica en el mecanisme de Lipscomb, la reacció es desenvolupi segons una via o segons una altra.

### 3.3 MODELACIO DE LA INHIBICIO ANIONICA EN LA CA

En l'apartat anterior s'han presentat els resultats de la reacció d'hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA, que dóna lloc a la formació d'un  $\text{HCO}_3^-$  coordinat al  $\text{Zn}^{+2}$ . Ens falta per tractar l'etapa que suposa l'intercanvi d'aquest bicarbonat per una molècula d'aigua. Sembla molt probable que durant aquest procés tingui lloc la formació d'una espècie pentacoordinada. Per això abans d'abordar aquesta temàtica en la CA, hem fet un estudi previ de la pentacoordinació en el  $\text{Zn}^{+2}$ . Els resultats que poguem extraure en aquesta secció ens orientaran en l'estudi de l'intercanvi del  $\text{HCO}_3^-$  per l'aigua en la CA.

L'estudi que presentem en aquest apartat té també entitat pròpia dins de la problemàtica de la CA. Es ben coneguda la inhibició de l'activitat de la CA per la presència d'anions que es coordinen com a cinquè lligand. Així, l'estudi de la pentacoordinació d'anions en el  $\text{Zn}^{+2}$ , ens pot aportar dades útils per analitzar el mecanisme d'inhibició aniónica de la CA.

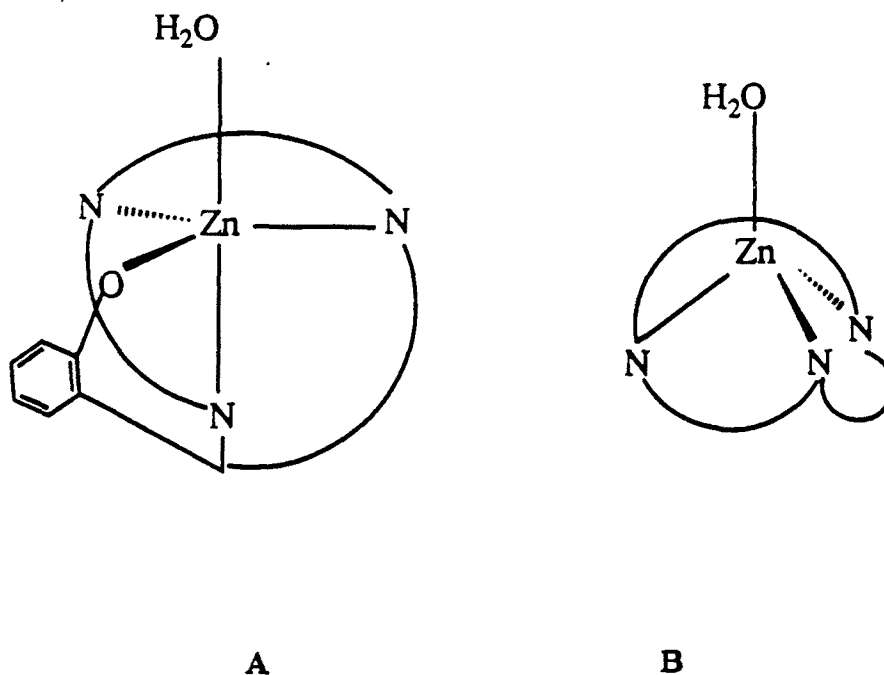
#### 3.3.1 ENLLAÇ D'ANIONS I PENTACOORDINACIO EN ELS COMPLEXOS DE $\text{Zn}^{+2}$

La gran variabilitat i flexibilitat de coordinació del zinc és un fet ben conegut,



[11,414-417] i d'importància vital per entendre l'especificitat del zinc com a catalitzador en molts processos enzimàtics. [83,131,418,419] Si bé la geometria tetraèdrica és la més usual per als complexos de zinc, la coordinació de cinc lligans en una bipiràmide trigonal (tbp) o en una piràmide de base quadrada (sp) és també molt comuna. [83,117,417,420-422] Encara que la estructura sp no és massa important en els processos catalítics, els complexos pentacoordinats d'estructura en forma de tbp semblen ésser essencials en els processos enzimàtics on intervé el zinc. S'ha suggerit que en els enzims, com la mateixa anhidrasa carbònica, [71,84,85] la carboxipeptidasa, [29,423-425] la termolisina [65,66] o l'alcohol deshidrogenasa, [17,23,426-428] es formen complexos pentacoordinats com intermedis en els diferents processos de catàlisi. Per al cas de la CA, que és el que tractem en aquesta Tesi, i com ja hem comentat, es creu que en el procés d'intercanvi del  $\text{CO}_2$  per una  $\text{H}_2\text{O}$  es forma un complex pentacoordinat. [84,85,131] A més, la inhibició aniònica de l'activitat de la CA, degut a la presència de  $\text{NCS}^-$ ,  $\text{Au}(\text{CN})_2^-$ ,  $\text{HSO}_3^-$ ,  $\text{I}^-$ , acetat, oxalat i altres anions, sembla que té lloc quan s'enllaça l'anió com a cinquè lligand al  $\text{Zn}^{+2}$ . Això ha estat demostrat experimentalment per diferents autors, [74,86,107,130,131,174,429] els quan han subratllat el fet que en la major part dels casos la inhibició és deguda a la disminució del caràcter acídic de l'espècie  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ . L'augment del  $\text{pK}_a$  d'aquesta espècie suposa una disminució de la concentració de l'espècie catalíticament activa  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ .

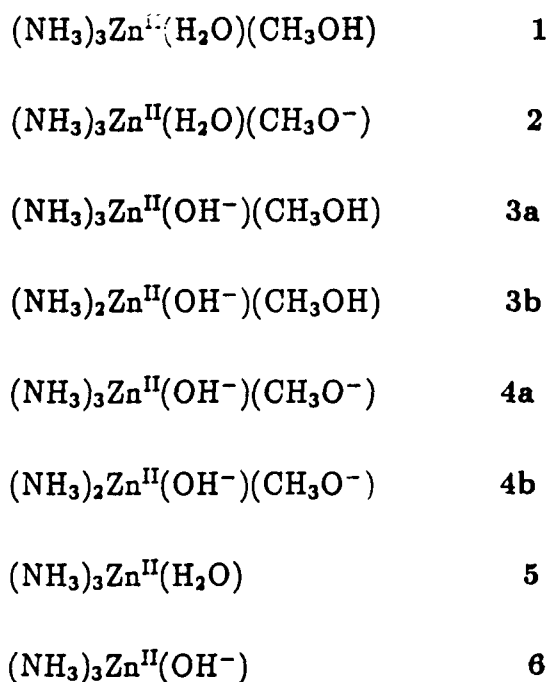
Recentment, s'ha sintetitzat el complex de zinc A que té com a lligands un macrocicle de tres triamines i un fenolat, a més d'una molècula d'aigua que ocupa una posició axial en l'estructura de tbp que es forma. S'ha determinat, mitjançant Raig-X la seva estructura. [117]



Aquest estudi ofereix el primer model experimental per estudiar l'associació aniònica en la CA. Els autors d'aquest estudi han trobat que el  $pK_a$  assignat a l'aigua unida al zinc, que és de 7.5 en el complex B, augmenta fins a 10.7 quan un lligand aniònic addicional, en aquest cas un grup fenolat, s'uneix en una cinquena coordinació al catió  $Zn^{+2}$  (complex A). La disminució del caràcter acídric del protó de l'aigua coordinada deguda a la presència de l'anió, ha quedat doncs clarament demostrada.

A pesar de la seva gran importància, l'estudi de complexos pentacoordinats de zinc és relativament recent. De fet, el primer cristall per al qual es va determinar una coordinació de *tbp* al voltant de l'àtom de zinc mitjançant Raigs-X va ésser caracteritzat l'any 1976. [430] Més endavant han anat apareixen una sèrie d'estudis en els quals el zinc es troba pentacoordinat. [117,415,416,419,420,431-435] Des d'un punt de vista teòric només han aparegut fins ara quatre articles publicats al respecte: en el primer s'estudia el complex  $Zn^{II}(H_2O)_5$  mitjançant el mètode semiempíric MNDO; [67] en el segon es fa un estudi *ab initio* de l'enllaç de sulfonamides i acetamides en el centre actiu de la CA (encara que en aquest treball es substitueix el  $Zn^{+2}$  per

un  $\text{Be}^{+2}$  en el model de CA que s'empra); [170] en el tercer es fa una simulació de l'entrada del  $\text{CO}_2$  en el centre actiu de l'enzim mitjançant dinàmica browniana; [175] i en el quart [172] s'estudia el canvi de  $\text{pK}_a$  de l'aigua en complexos de  $\text{Zn}^{+2}$  quan aquests passen de geometria tetraèdrica a piràmide de base quadrada o a geometria octaèdrica. En aquest darrer article s'ha treballat amb geometries experimentals sense realitzar cap optimització. A més, nosaltres ens hem proposat comprendre els canvis estructurals, energètics i electrònics que tenen lloc en els complexos de zinc quan passem d'una disposició tetraèdrica a una de bipiràmide trigonal amb cinc lligands en l'esfera de coordinació. Per tal d'entendre la natura d'aquests canvis i com funciona el mecanisme de l'anhibició aniònica, s'han realitzat càlculs *ab initio* en alguns complexos tetra- i pentacoordinats que intenten modelar el complex A i alguns dels seus derivats. El macrocicle de tres triamines i un grup fenolat ha estat modelat amb un metanol i tres amoníacs. La següent seqüència de complexos ha estat estudiada:



Donat que els valors experimentals del  $pK_a$  s'han obtingut en solució aquosa, l'efecte del solvent també s'ha inclòs en els nostres càlculs a través d'un model continu, per tal d'aconseguir una descripció més realista de les propietats dels complexos estudiats.

La metodologia emprada en aquesta secció ha estat la mateixa que en seccions anteriors. Així la base utilitzada ha estat la que anomenem 3-21G, en la que tots els àtoms s'han representat amb la base 3-21G, excepte els H del grup  $NH_3$  i del  $CH_3$  en el lligand  $CH_3OH$  que s'han representat amb la base STO-3G. Les geometries internes d'aquests dos grups s'han mantingut fixes. Concretament, els valors que s'han prèss per al  $NH_3$  i el  $CH_3$  han estat els següents:  $d_{N-H} = 1.026 \text{ \AA}$ ,  $\widehat{HNH} = 109.5^\circ$ ,  $d_{C-H} = 1.098 \text{ \AA}$  i  $\widehat{HCH} = 109.7^\circ$ . Aquests valors són els optimitzats per a les molècules d'amoniac i metanol amb aquesta base. Així mateix el tractament de la solvatació s'ha fet amb el mateix mètode que en la resta d'aquesta memòria. Els paràmetres que demana el programa han estat els mateixos que els que hem emprat en la secció 3.2.2.1.3.

Anem a dividir aquesta secció en dues ben diferenciades. En la primera presentarem els resultats que hem obtingut en l'estudi del sistema aïllat, i en la segona comentarem els resultats de l'aplicació d'un model continu de dissolvent a les geometries optimitzades per al sistema aïllat.

### 3.3.2 RESULTATS PER ALS SISTEMES AÏLLATS

Aquesta secció està estructurada de la següent manera: en primer lloc, presentem les geometries optimitzades dels complexos 1-6; en segon lloc, comentarem les energies d'enllaç dels diferents lligands en els complexos estudiats, i per a alguns

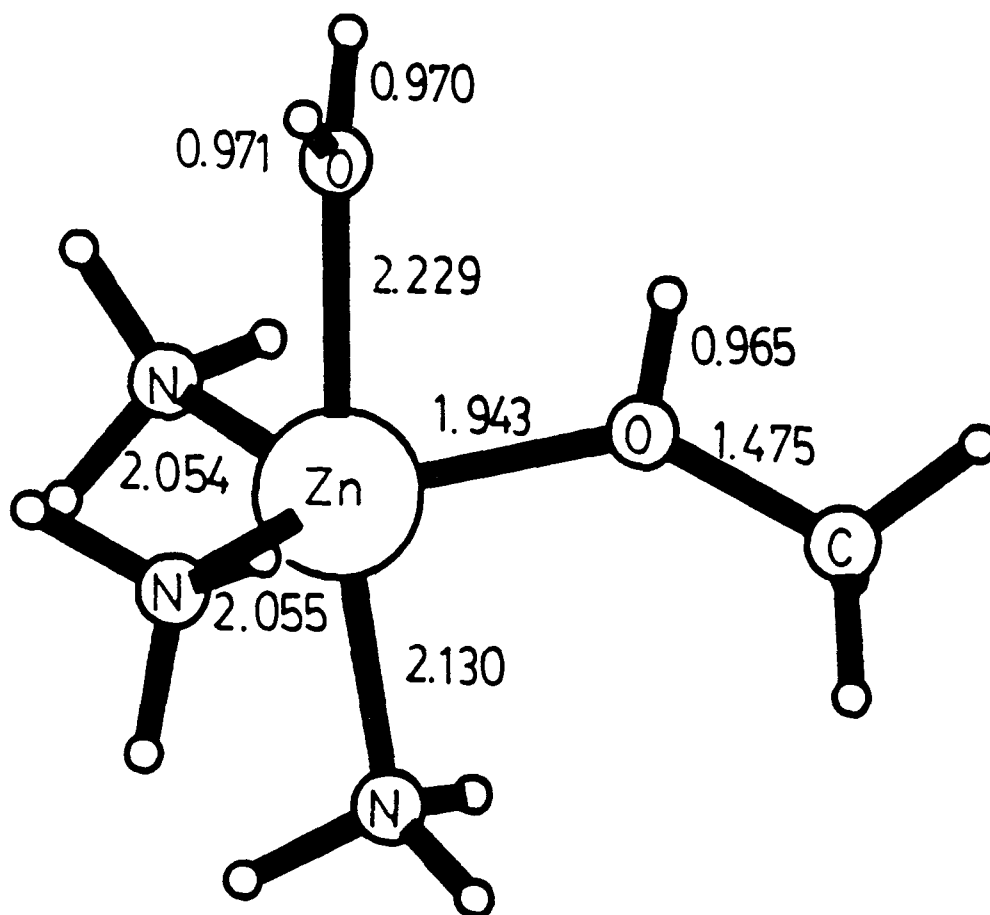


Figura 28: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{OH})$  (1) optimitzada amb la base 3-21G

d'aquests lligands donarem les energies de desprotonació; en darrer lloc, es discutiran les càrregues sobre alguns dels fragments.

### 3.3.2.1 Geometries optimitzades

Les figures 28 fins a 35 mostren els paràmetres geomètrics més importants obtinguts en l'optimització dels complexos 1-6. En el complex 1 (figura 28), l'aigua es troba en una posició axial i el metanol en una equatorial, donant lloc a una estructura de t<sub>bp</sub>

quasi regular. Això es confirma pels valors de l'angle axial  $N_{ax}\widehat{Zn}O_w$ , que és quasi lineal ( $171.9^\circ$ ), i per la suma dels angles equatorials ( $118.8^\circ$  per al  $N_{eq1}\widehat{Zn}N_{eq2}$ ,  $120.8^\circ$  per al  $N_{eq2}\widehat{Zn}O_m$  i  $118.8^\circ$  per al  $O_m\widehat{Zn}N_{eq1}$ ), que és de quasi  $360.0^\circ$  ( $358.4^\circ$ ). Tal com varen predir teòricament Rossi i Hoffmann [436] i tal com es va confirmar en posteriors experiments amb complexos de  $Zn^{+2}$  pentacoordinats, [83,117,131,415,416,418-420,431-435] els enllaços axials són més llargs que els equatorials en els complexos  $d^{10}$  tbp, com és el cas del complex 1.

En la Taula XXX s'han recollit els paràmetres geomètrics més destacables del complex A, sintetitzat per Kimura *et al.*, [117] i els optimitzats del complex 2, el qual hem agafat en el nostre estudi com a model per al complex A. Examinant els valors de les longituds d'enllaç que es donen en la Taula XXX, es pot veure que la diferència entre els valors experimentals i teòrics és petita i mai no és superior a un 5%. Els angles no s'ajusten tan bé, encara que la diferència observada és deguda en gran part a la diferent natura dels lligands que contenen els àtoms de N. Mentre que el complex experimental té els tres N que s'uneixen al  $Zn^{+2}$  connectats entre si per metilens que formen un anell, el model teòric aquí utilitzat per representar aquest complex té els tres N en tres amoníacs aïllats, i per tant presenta menys constrenyiments geomètrics. En qualsevol cas, a partir dels valors de la Taula XXX s'ha de concloure que la base de càlcul i el model molecular utilitzat en el present treball prediu correctament les propietats geomètriques del complex experimental A.

L'estructura del complex  $(NH_3)_3Zn^{II}(H_2O)(CH_3O^-)$  (2) mostrada en la figura 29, és la d'una tbp lleugerament distorsionada, amb una aigua que ocupa una posició axial de la tbp, i el  $CH_3O^-$  que n'ocupa una d'equatorial. Aquesta estructura compleix la predicció de Rossi i Hoffmann [436] segons la que els lligands  $\sigma$  donadors forts prefereixen les posicions equatorials d'una tbp en els complexos  $d^{10} ML_5$ . A l'igual que en el complex 1, els enllaços axials són més llargs que els equatorials. Cal fer notar

Taula XXX: Paràmetres geomètrics experimentals per al complex A i paràmetres geomètrics optimitzats per al complex 2. Les distàncies es donen en Å i els angles en graus.

Paràmetre	Exp.	Calc.
$d_{Zn-O_w}$	2.219	2.120
$d_{Zn-N_a}$	2.139	2.172
$d_{Zn-O_m}$	1.930	1.847
$d_{Zn-N_{eq1}}$	2.029	2.052
$d_{Zn-N_{eq2}}$	2.050	2.052
$N_a \widehat{Zn} N_{eq1}$	90.3	96.0
$N_a \widehat{Zn} O_m$	91.4	98.8
$N_a \widehat{Zn} N_{eq2}$	87.4	94.4
$N_a \widehat{Zn} O_w$	174.4	170.5
$N_{eq1} \widehat{Zn} N_{eq2}$	108.3	117.2
$N_{eq1} \widehat{Zn} O_m$	113.0	118.8
$N_{eq2} \widehat{Zn} O_m$	138.7	120.4

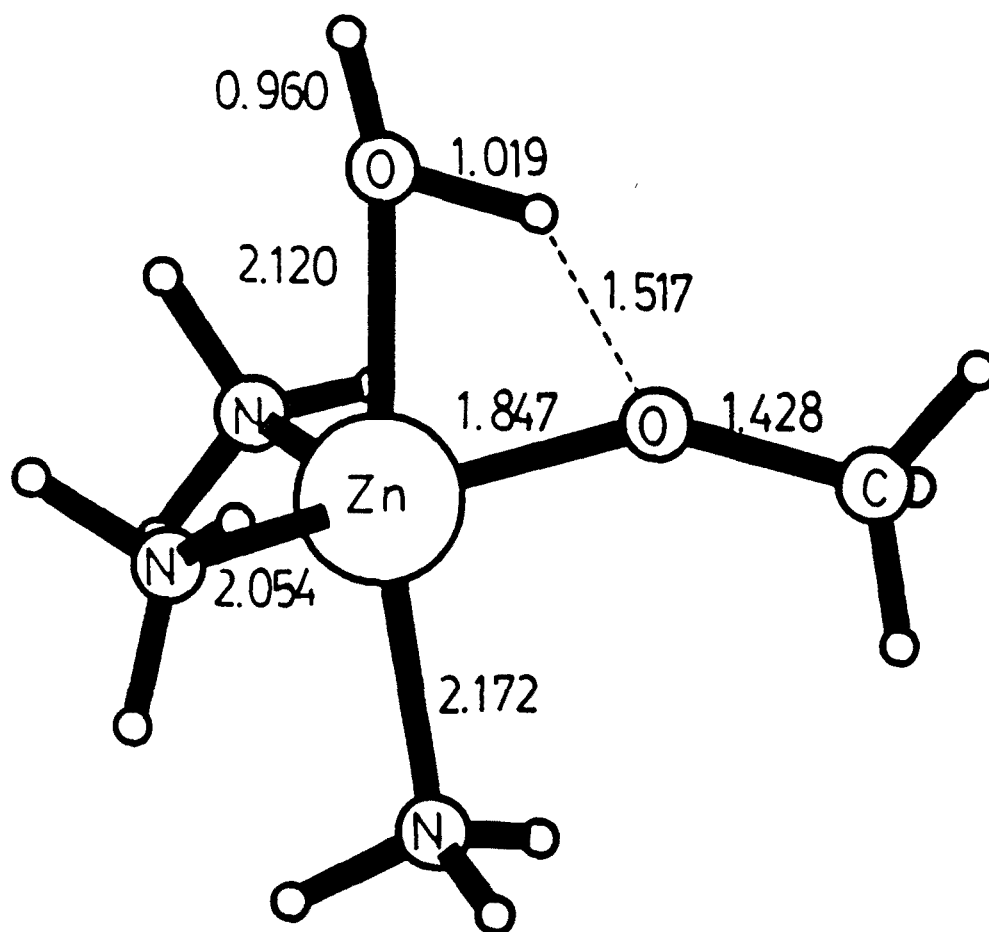


Figura 29: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{O}^-)$  (2) optimitzada amb la base 3-21G.

l'existència d'un enllaç d'hidrogen entre l'oxigen del grup  $\text{CH}_3\text{O}^-$  i un dels hidrògens de l'aigua, enllaç que provoca en part la distorsió de la tbp.

El complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)_{\text{eq}}(\text{CH}_3\text{OH})_{\text{eq}}$  amb l'hidroxil i el metanol com a lligands equatorials (complex 3a en la figura 30), és un mínim real en la hipersuperfície d'energia potencial. Aquest complex té una disposició de tbp quasi regular, amb un angle axial  $\text{N}_{\text{ax1}}\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{ax2}}$  de  $173.5^\circ$ , i uns angles equatorials de  $125.1^\circ$  ( $\text{O}_{\text{w}}\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq}}$ ),  $116.6^\circ$  ( $\text{N}_{\text{eq}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_{\text{m}}$ ) i  $118.3^\circ$  ( $\text{O}_{\text{m}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_{\text{w}}$ ), els quals sumen exactament  $360.0^\circ$ . Per contra, quan es comença l'optimització del mateix complex, però ara amb el grup hidroxil



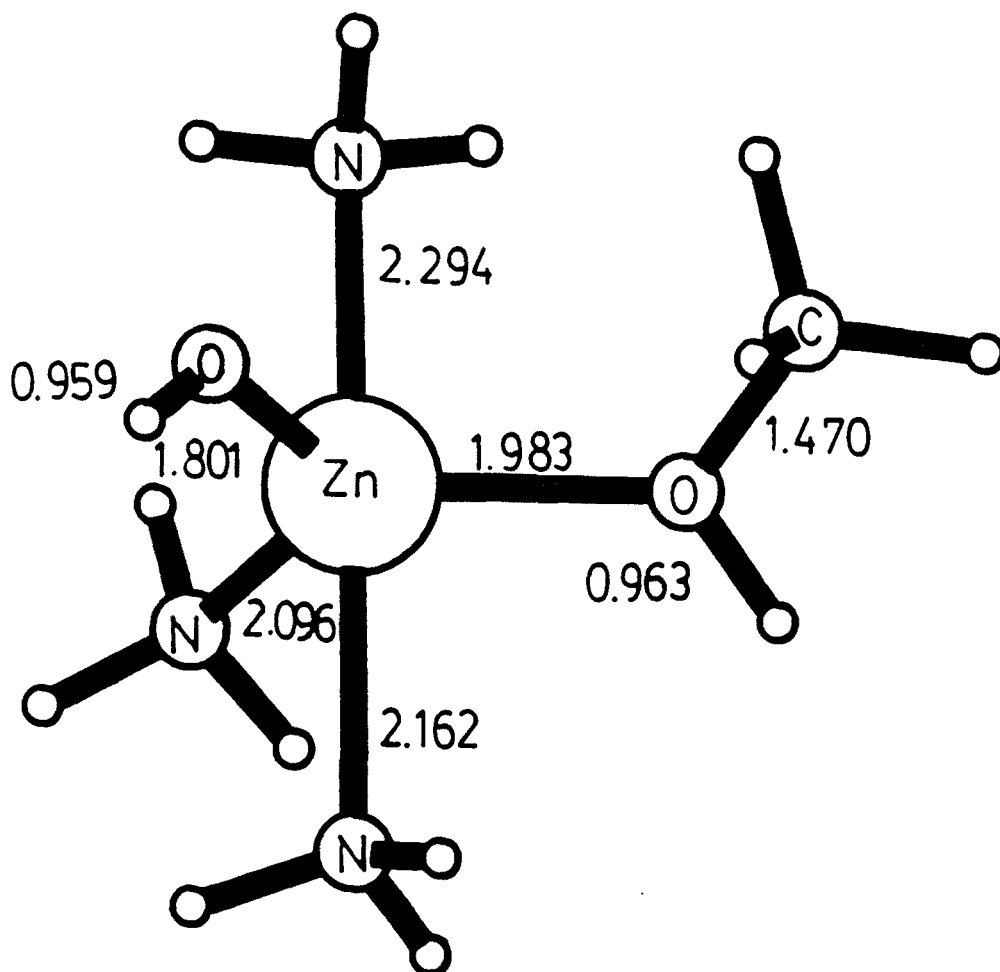


Figura 30: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{OH})$  (**3a**) optimitzada amb la base 3-21G.

en posició axial, el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)_{\text{ax}}(\text{CH}_3\text{OH})_{\text{eq}}$  es descomposa i dona lloc a la formació del complex **3b**, i d'una molècula de  $\text{NH}_3$  que es separa de l'esfera de coordinació del  $\text{Zn}^{+2}$ . La geometria del complex **3b** es presenta en la figura 31. És a dir, el complex pentacoordinat  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)_{\text{ax}}(\text{CH}_3\text{OH})_{\text{eq}}$  no existeix com a mínim en la hipersuperfície de potencial. Tal i com varen demostrar Rossi i Hoffmann, [436] els  $\sigma$  donadors forts estableixen una *tbp* quan es situen en posicions equatorials, i la desestabilitzen en posicions axials. Així doncs, la posició axial de l'hidroxil explica el trencament de l'estructura *tbp* inicial.

L'optimització del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{O}^-)$  (**4a**) es va iniciar amb un

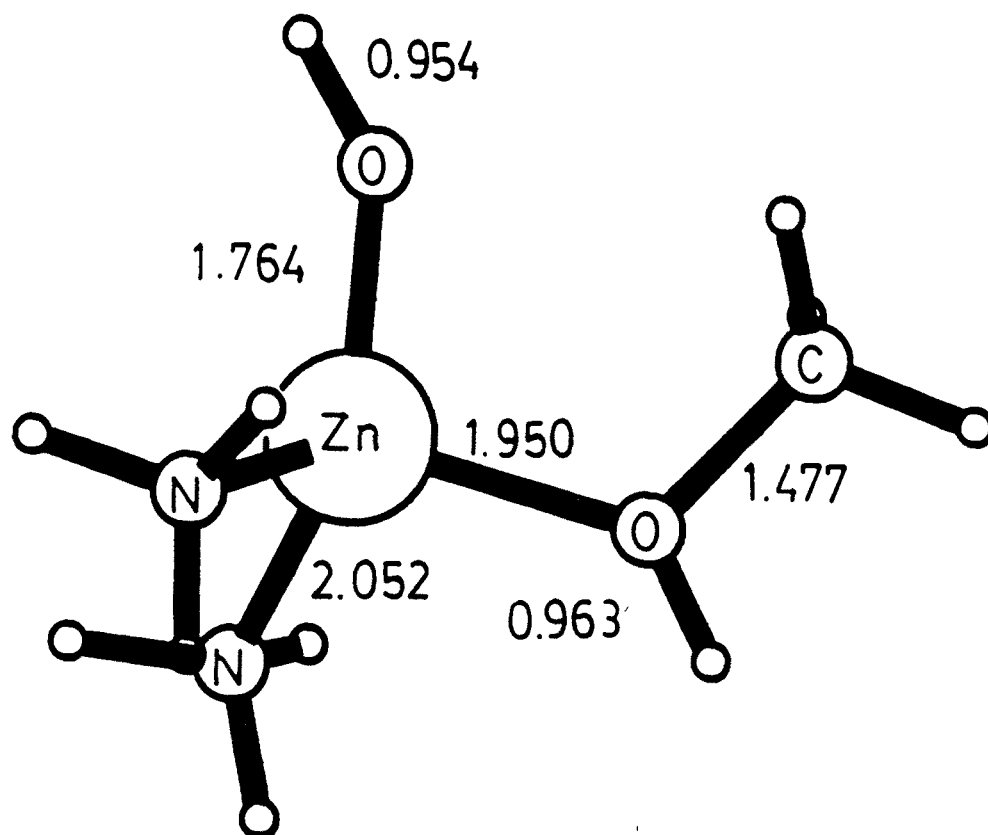


Figura 31: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_2\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{OH})$  (3b) optimitzada amb la base 3-21G.

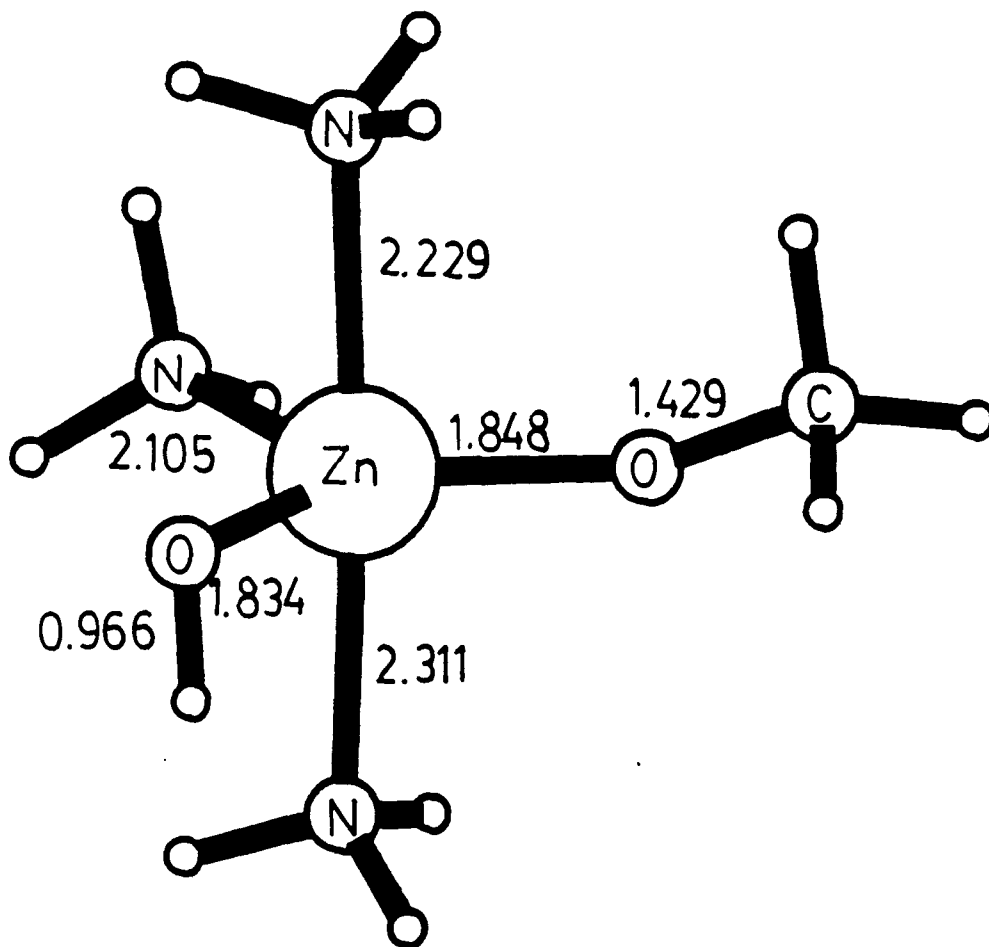


Figura 32: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{O}^-)$  (4a) optimitzada amb la base 3-21G.

grup hidroxil en posició axial dins la tbp. Tanmateix, en el transcurs de l'optimització aquest grup es va moure cap una posició equatorial, tal com un espera a partir de la hipòtesi de Rossi i Hoffmann sobre les preferències del  $\sigma$  donadors per les posicions equatorials en els complexos tbp. El resultat de l'optimització es presenta en la figura 32. L'angle axial  $\text{N}_{\text{ax}1}\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{ax}2}$  és de  $173.6^\circ$ , i el total dels angles equatorials de  $113.4^\circ$  ( $\text{O}_w\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq}}$ ),  $109.7^\circ$  ( $\text{N}_{\text{eq}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_m$ ) i  $136.8^\circ$  ( $\text{O}_m\widehat{\text{Zn}}\text{O}_w$ ), és de  $359.9^\circ$ . Un punt remarcable és la diferència existent entre les distàncies Zn-N axials en els complexos 3a i 4a que és d'aproximadament  $0.1 \text{ \AA}$ . Aquesta diferència ja ha estat observada experimentalment en altres complexos de geometria en forma de tbp distorsionada. [83,431,433]

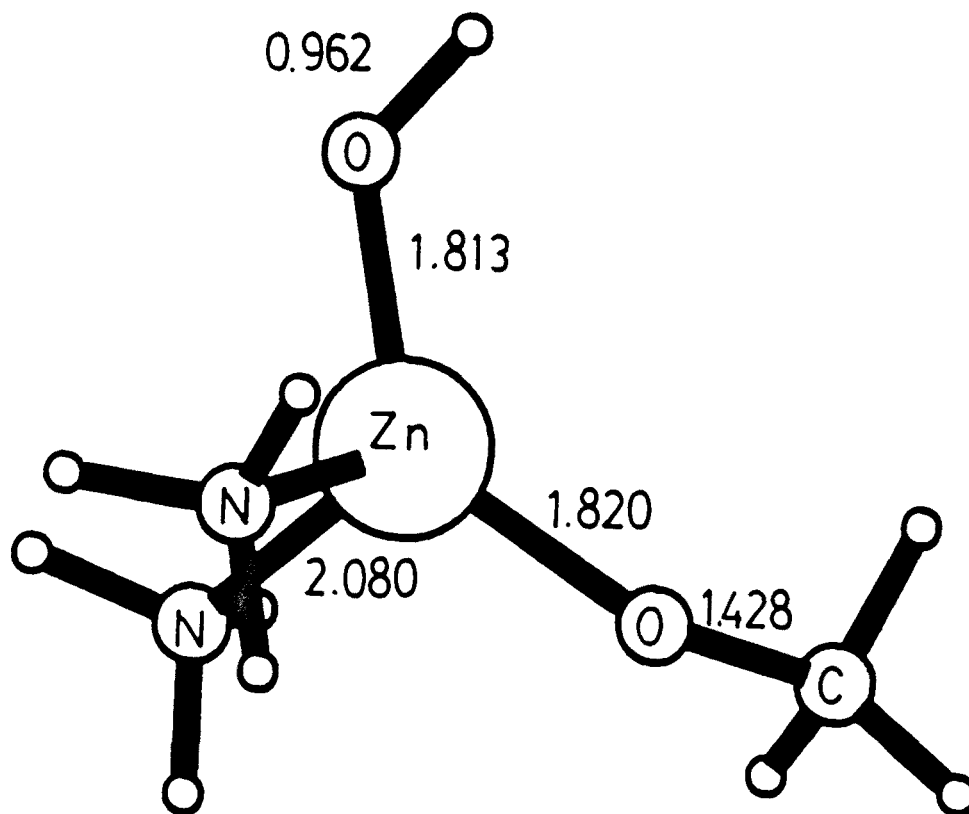


Figura 33: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_2\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{O}^-)$  (4b) optimitzada amb la base 3-21G.

Per tal de poder realitzar diferents comparacions, hem procedit a optimitzar també els complexos 4b, 5, i 6, presentats en les figures 33, 34 i 35 respectivament. En particular el complex 5 és el nostre model per al complex experimental B. Tots aquests sistemes presenten una estructura tetraèdrica quasi regular. Així, els angles  $\widehat{\text{NZnO}}$  són de  $101.3^\circ$ ,  $107.7^\circ$  i  $113.4^\circ$  per als complexos 4b, 5, i 6, respectivament.

Quan es comparen els enllaços Zn-N per a les diferents espècies optimitzades, es pot observar que les distàncies Zn-N en els complexos tetraèdrics són similars a les distàncies Zn-N dels lligands que ocupen posicions equatorials d'una t<sub>bp</sub>. Els enllaços Zn-N axials són d'un 4% a un 6% més llargs que els Zn-N equatorials per als

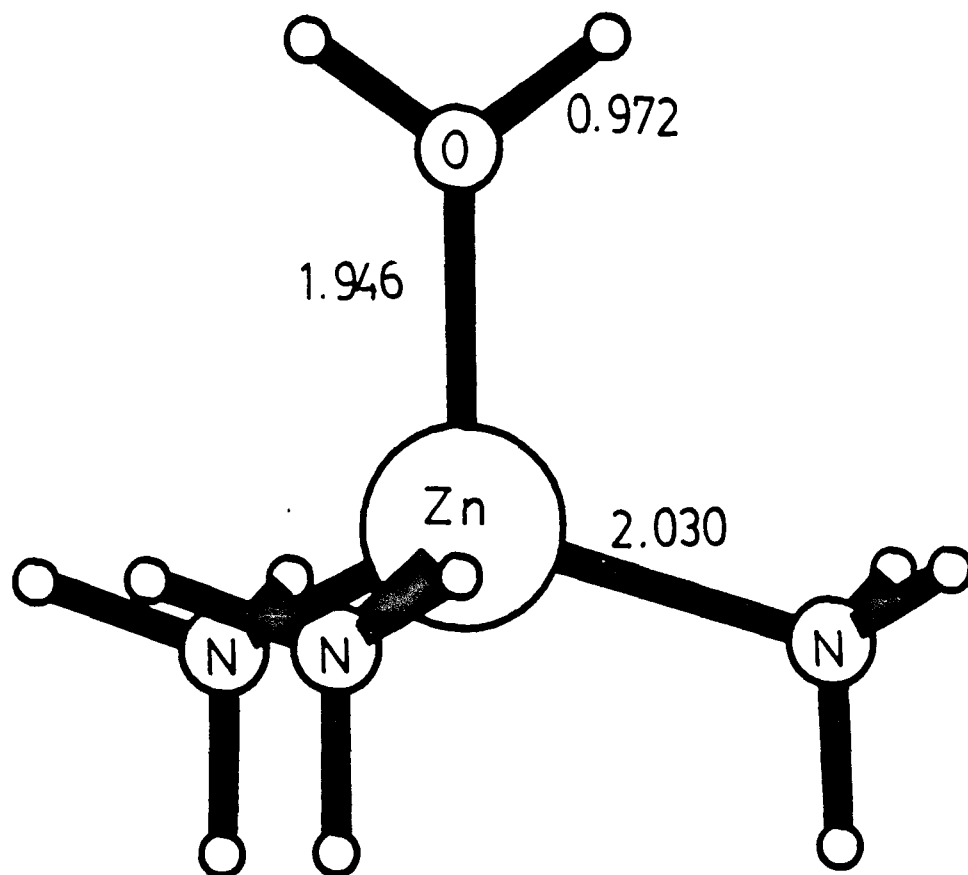


Figura 34: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  (5) optimitzada amb la base 3-21G.

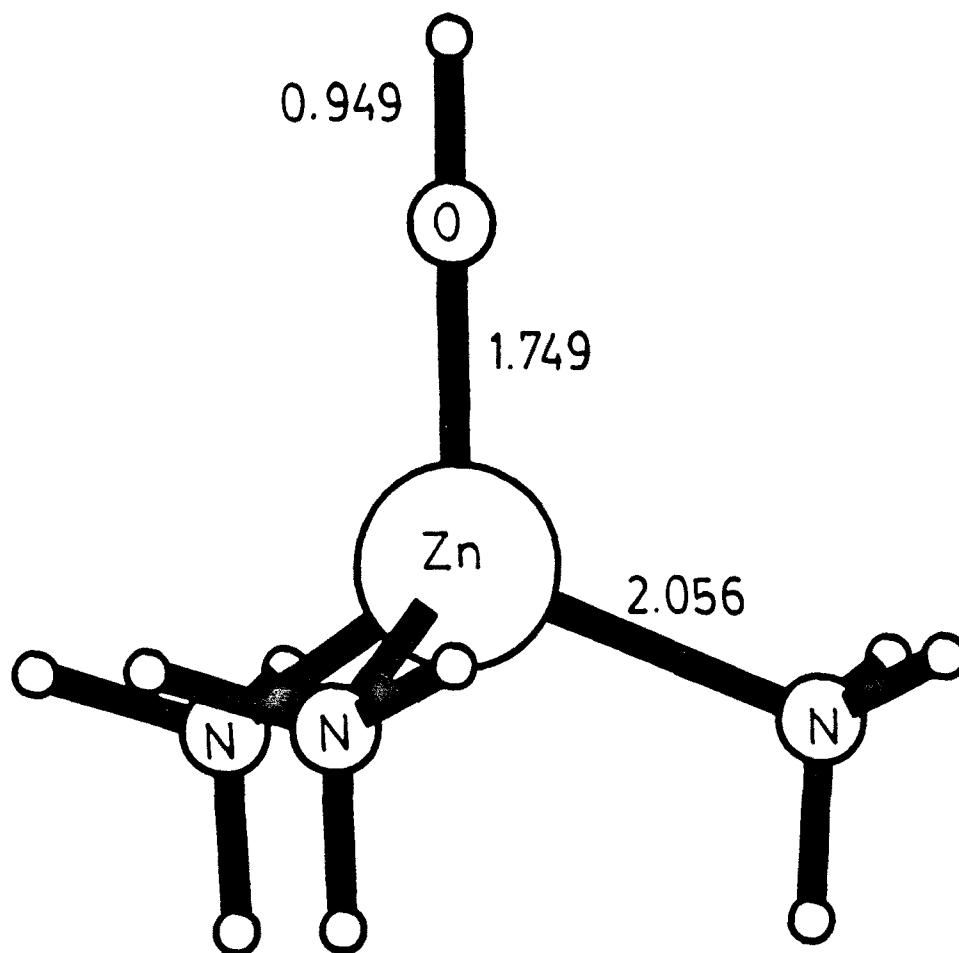


Figura 35: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  (6) optimitzada amb la base 3-21G.

complexos 1 i 2; aquests percentatges són similars als observats experimentalment. [434] Pel que fa a les distàncies Zn-O, la seva longitud depèn de tres factors: en primer lloc del nombre de lligands unit a l'àtom central; en segon lloc, de la càrrega total del complex; i per acabar, de la posició del lligand. El nostre resultat mostra que aquesta distància s'allarga quan augmenta el nombre de lligands (comparar 1 i 5, 3a i 3b, o 4a i 4b) i quan la càrrega total positiva del complex s'incrementa (comparar 1 i 2 o 5 i 6). Es troba també que els enllaços Zn-O axials són sempre més llargs que els Zn-O equatorials.

### 3.3.2.2 Comparació de les energies

En la Taula XXXI es donen les energies d'enllaç (BE) per a alguns dels lligands que es troben en els complexos estudiats. A partir dels valors d'aquesta Taula, es pot veure que l'energia d'enllaç del  $\text{CH}_3\text{O}^-$  en el complex 5 és 250.2 kcal/mol més gran que la del lligand  $\text{CH}_3\text{OH}$  en el mateix complex, el que significa que l'enllaç Zn-O<sub>m</sub> en el complex 2 és més fort que en el complex 1. Aquest punt ve reforçat pels valors dels ordres d'enllaç de Mayer [409] dels dos enllaços Zn-O<sub>m</sub>, que són 0.584 i 0.355 per als complexos 2 i 1, respectivament. De la mateixa manera, l'enllaç del  $\text{CH}_3\text{OH}$  al complex 6, que dona lloc a la formació del complex pentacoordinat 3a, allibera només -20.4 kcal/mol, mentre que l'enllaç del  $\text{CH}_3\text{O}^-$  al complex 6, que porta a la formació del complex 4a, n'allibera -170.0. L'energia d'enllaç del  $\text{CH}_3\text{OH}$  als complexos tetra-coordinats 5 i 6 per donar els complexos 1 i 3a, respectivament, difereix només en 19.7 kcal/mol. En contrast, l'energia d'enllaç del  $\text{CH}_3\text{O}^-$  és considerablement diferent si un dels quatre lligands és aigua (complex 5) o hidroxil (complex 6). Concretament, l'energia d'enllaç del  $\text{CH}_3\text{O}^-$  al complex 5 per donar el complex 2 és -290.3 kcal/mol i decreix fins a -170.0 kcal/mol per al complex 6 quan dona 4a. Per tant, la pèrdua

Taula XXXI: Energies d'enllaç (BE) en kcal/mol per als diferents lligands. L, x  $\rightarrow$  y es refereix a que el lligand L s'uneix al complex x per donar l'y.

Lligands	BE
CH <sub>3</sub> OH, 5 $\rightarrow$ 1	-40.1
CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , 5 $\rightarrow$ 2	-290.3
CH <sub>3</sub> OH, 6 $\rightarrow$ 3a	-20.4
CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , 6 $\rightarrow$ 4a	-170.0
NH <sub>3</sub> , 3b $\rightarrow$ 3a	-14.3
NH <sub>3</sub> , 4b $\rightarrow$ 4a	-4.8

d'un protó de l'aigua per donar un lligand hidroxil redueix la força de l'enllaç entre el Zn i el lligand CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup> en 120.3 kcal/mol degut a l'augment de la densitat electrònica al voltant de l'àtom de zinc. Un altre aspecte important és que, a l'obtenir el complex 4a del 4b i una molècula de NH<sub>3</sub>, s'alliberen només -4.8 kcal/mol, la qual cosa dóna una idea quantitativa de la inestabilitat dels complexos pentacoordinats de Zn<sup>+2</sup> quan dos anions es coordinen al seu voltant. Com ja hem mencionat, la localització de dos  $\sigma$  donadors forts (CH<sub>3</sub>O<sup>-</sup> i OH<sup>-</sup>) en les posicions equatorials ajuda a estabilitzar el complex 4a. Concretament, el complex pentacoordinat (NH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Zn<sup>II</sup>(OH<sup>-</sup>)(CH<sub>3</sub>OH), amb un lligand hidroxil axial i una càrrega positiva total unitat és inestable i es descomposa en el complex tetracoordinat 3b i una molècula d'amoniac en el transcurs del procés d'optimització. La pèrdua d'un NH<sub>3</sub> en aquest complex és 6.2 kcal/mol més favorable que la pèrdua de CH<sub>3</sub>OH per donar el complex 6. També en el complex estable 3a amb l'hidroxil en posició equatorial, és més fort l'enllaç del CH<sub>3</sub>OH que el del NH<sub>3</sub> en 6.1 kcal/mol.

Per veure més clarament la importància de l'enllaç d'hidrogen intramolecular entre



l' $\text{H}_2\text{O}$  i el  $\text{CH}_3\text{O}^-$  en el complex 2, hem optimitzat aquest complex amb la restricció de mantenir fixa la geometria de l'aigua i no permetre la formació d'un enllaç d'hidrogen. En aquest cas, l'energia total és 15.4 kcal/mol més alta que per al complex 2 optimitzat sense aquest constrenyiment. Aquest resultat ens mostra com aquest enllaç intramolecular contribueix parcialment a l'estabilitat final del complex *tbp* 2.

La Taula XXXII recull, per a algunes de les espècies estudiades, les energies de desprotonació (DPE), que poden servir com a primera aproximació per conèixer l'acidesa dels lligands coordinats als complexos estudiats. El primer aspecte interessant és la disminució en més de 300 kcal/mol de la DPE de l'aigua i el metanol per la mera presència del dicatió  $\text{Zn}^{+2}$ . Aquesta disminució en la DPE de l'aigua coordinada al zinc ja ha estat assenyalada per diferents autors. [67,164,169] En particular, Pullmann i Demoulin, [164] i Kitchen i Allen, [169] en uns càlculs teòrics utilitzant pseudopotencials per al zinc, han donat els valors de 158.1 i 166.8 kcal/mol, respectivament, per a la DPE de l'aigua en el complex 5. Aquests valors no són massa diferents del nostre 174.9 kcal/mol obtingut en el càlcul "all electron" amb la base 3-21G.

La desprotonació del metanol en el complex 1 és més fàcil que la desprotonació de l'aigua en el mateix complex per 13.9 kcal/mol. La DPE de l'aigua coordinada al  $\text{Zn}^{+2}$  augmenta en 72.5 kcal/mol quan el dicatió es troba coordinat a tres grups  $\text{NH}_3$  (comparar la DPE per l'aigua del  $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  i la del complex 5). La coordinació addicional del metanol al complex 5 augmenta lleugerament la DPE de l'aigua (comparar la DPE de l'aigua en els complexos 1 i 5). Això és degut a la transferència de càrrega des del metanol, que dificulta la transferència del protó. Aquest punt ja ha estat posat de manifest per Bertini *et al.* en un treball recent. [172] Les DPEs de l'aigua en els complexos 1 i 5 difereixen només en 19.7 kcal/mol, el que mostra que les energies de desprotonació no es troben molt afectades pel canvi en el número de lligands neutres coordinats. Per contra, quan el cinquè lligand considerat

Taula XXXII: Energies de desprotonació (DPE) en kcal/mol per a les diferents espècies tetra- i pentacoordinades estudiades. Els lligands importants en els diferents complexos apareixen entre parèntesi.

Espècies	DPE
$\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$	450.1
$\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{O}^-$	430.9
$\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})/\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$	102.4
$\text{Zn}^{\text{II}}(\text{CH}_3\text{OH})/\text{Zn}^{\text{II}}(\text{CH}_3\text{O}^-)$	109.8
$1(\text{CH}_3\text{OH}, \text{H}_2\text{O})/2(\text{CH}_3\text{O}^-, \text{H}_2\text{O})$	180.7
$1(\text{CH}_3\text{OH}, \text{H}_2\text{O})/3\text{a}(\text{CH}_3\text{OH}, \text{OH}^-)$	194.6
$2(\text{CH}_3\text{O}^-, \text{H}_2\text{O})/4\text{a}(\text{CH}_3\text{O}^-, \text{OH}^-)$	295.2
$3\text{a}(\text{CH}_3\text{OH}, \text{OH}^-)/4\text{a}(\text{CH}_3\text{O}^-, \text{OH}^-)$	281.3
$3\text{b}(\text{CH}_3\text{OH}, \text{OH}^-)/4\text{b}(\text{CH}_3\text{O}^-, \text{OH}^-)$	271.9
$5(\text{H}_2\text{O})/6(\text{OH}^-)$	174.9

és aniónic, la DPE augmenta sensiblement. Concretament, la DPE de l'aigua en el complex pentacoordinat 2 és 120.3 kcal/mol més gran que la DPE de l'aigua en el complex tetracoordinat 5. Aquest fet es pot relacionar amb la variació de l'acidesa de l'aigua en el complex experimental B (modelat aquí amb el complex 5), el qual presenta un canvi en el  $\text{pK}_a$  de l'aigua que té coordinada de 7.5 a 10.3 quan un cinquè lligand fenolat es coordina al dicatió  $\text{Zn}^{+2}$ , tal com han mostrat experimentalment Kimura *et al.* [117] De la mateixa manera, la DPE del metanol en el complex 3a amb un lligand hidroxil equatorial, és substancialment més gran que la del metanol en el complex 1.

### 3.3.2.3 Comparació de les càrregues

Els resultats energètics que hem presentat mostren la disminució de l'acidesa de l'aigua coordinada al  $Zn^{+2}$  per efecte de la coordinació aniònica d'un cinquè lligand. L'anàlisi de les càrregues sobre els diferents àtoms dels complexos permet avançar en la comprensió d'aquest efecte.

Les càrregues de Mulliken per a l'àtom de zinc i per als lligands que hi estan coordinats es troben recollides en la Taula XXXIII. Cal fer notar que els complexos 3a i 4a tenen dos  $NH_3$  axials i un d'equatorial, i per això en ells els valors de les càrregues dels lligands  $NH_3$  axials i equatorials en la Taula XXXIII s'han intercanviat. Malgrat la coneguda dependència de les poblacions de Mulliken respecte de la base de càlcul elegida, aquestes poblacions poden ésser útils per establir comparacions entre complexos similars, i per això les utilitzarem en aquest apartat.

La càrrega sobre l'àtom de zinc no canvia massa per a les diferents espècies estudiades; la més gran és la del complex 1 (1.382 au), i la més petita és la del complex 4b (1.052 au). Aquest fet ja ha estat esmentat en un article recent. [172] Tal com era d'esperar, el factor més important que afecta la càrrega sobre l'àtom de zinc és la càrrega total del complex. Quan més positiva és la càrrega total del complex, més gran és la càrrega positiva sobre l'àtom de zinc. Hi ha, però, un altre factor important, que és el número de coordinació al voltant de l'àtom de zinc. En contra del que podria pensar-se, quan el número de coordinació augmenta, la càrrega positiva sobre l'àtom també augmenta (comparar 1 i 5, 2 i 6, 3a i 3b, o 4a i 4b). L'explicació a aquest fenomen es pot trobar en el fet que la transferència de càrrega dels lligands al zinc disminueix com a resultat de l'habitual augment de les distàncies zinc-lligand en els complexos pentacoordinats en relació amb els tetracoordinats. L'àtom d'hidrogen de l'aigua en el complex 5 té una càrrega positiva més gran que en el complex 1 (0.496

Taula XXXIII: Càrregues sobre l'àtom de zinc i sobre els diferents lligands en els complexos tetra- i pentacoordinats estudiats, en unitats atòmiques.

Número coord.	Càrrega total	Zn	H <sub>2</sub> O o OH <sup>-</sup>	CH <sub>3</sub> OH o CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup>	(NH <sub>3</sub> ) <sub>eq1</sub>	(NH <sub>3</sub> ) <sub>eq2</sub>	(NH <sub>3</sub> ) <sub>ax</sub>	
1	5	+2	1.382	0.140	0.135	0.120	0.121	0.101
5	4	+2	1.344	0.190	-	0.156	0.156	0.156
2	5	+1	1.299	0.043	-0.600	0.092	0.092	0.076
6	4	+1	1.219	-0.539	-	0.107	0.107	0.107
3a	5	+1	1.245	-0.547	0.105	0.054(ax)	0.064(ax)	0.079(eq)
3b	4	+1	1.209	-0.530	0.113	0.107	0.107	-
4a	5	0	1.115	-0.574	-0.650	0.028(ax)	0.035(ax)	0.049(eq)
4b	4	0	1.052	-0.555	-0.628	0.066	0.066	-

.vs. 0.458, respectivament), i per tant l'aigua del complex 5 és més fàcilment desprotonable que la del complex pentacoordinat 1. De manera semblant, el grup hidroxil és un nucleòfil més bó quan una molècula de NH<sub>3</sub> s'afegeix als complexos 3b o 4b per donar els complexos 3a o 4a, respectivament. Finalment, en tots els complexos pentacoordinats, els NH<sub>3</sub> equatorials es troben carregats més positivament que els axials. Això s'explica tenint en compte que les posicions axials d'una t<sub>bp</sub> per a un complex d<sup>10</sup> ML<sub>5</sub> tenen un excés d'electrons, [436] el que provoca que les molècules d'amoníac axials puguin transferir menys càrrega a l'àtom de zinc que les equatorials.

Taula XXXIV: Valors de la contribució electrostàtica ( $\Delta G_{el}$ ) i de l'energia de cavitació ( $G_{cav}$ ) a l'energia de solvatació, i la seva suma ( $\Delta G_{solv}$ ), a 298 K per als diferents complexos estudiats. Totes les energies es donen en kcal/mol.

Espècies	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$
1	-180.6	19.7	-160.9
2	-54.3	19.3	-35.0
3a	-55.3	19.0	-36.3
3b	-61.2	17.6	-43.6
4a	-20.5	18.9	-1.6
4b	-24.8	17.4	-7.4
5	-195.5	16.6	-178.9
6	-63.7	16.0	-47.7

### 3.3.3 RESULTATS PER ALS SISTEMES EN DISSOLUCIO

Per tal d'analitzar l'estabilitat i l'acidesa dels complexos en solució aquosa, l'efecte del solvent s'ha introduït amb el model de la cavitat de Tomasi explicat en la secció 2.1.2.2, utilitzant les geometries ja optimitzades en fase gas. La Taula XXXIV recull l'energia lliure de solvatació i les seves components electrostàtica i de cavitació ( $\Delta G_{el}$  i  $G_{cav}$ ) per als complexos 1-6 en solució aquosa ( $\epsilon=78.36$ ). Es pot veure que l'efecte del solvent és sempre estabilitzant. Quant més gran és la càrrega positiva total, més estabilitzat resulta el complex. A més, l'estabilització és més gran per als complexos tetracoordinats que per als pentacoordinats, el que és degut a dues causes: per un costat, els complexos tetracoordinats tenen una energia de cavitació més petita, per un altre costat, tenen una contribució electrostàtica a l'energia lliure més gran.

Les energies lliures d'enllaç (BFE) dels diferents lligands a l'àtom de zinc en

solució aquosa es donen en la Taula XXXV. Al comparar els valors d'aquesta Taula amb els de la Taula XXXI, pot veure's que totes les energies d'enllaç han disminuït en presència del solvent. Aquesta disminució és deguda a que hi ha menys transferència de càrrega dels lligands cap al zinc quan estem en solució. De fet, en aquest model les càrregues es mouen cap a la part exterior del complex per tal d'interaccionar més fortament amb el solvent representat per un dielèctric polaritzable. Això porta a enllaços zinc-lligand més febles. Aquest punt es veu reforçat pels valors que prenen els ordres d'enllaç de Mayer, els quals disminueixen per a tots els enllaços Zn-O, i oscil·len a voltes augmentant i a voltes disminuint per als enllaços Zn-N. Degut a la menor transferència de càrrega per part dels lligands, el zinc es troba més carregat positivament. Això porta a que el complex 4a sigui inestable en solució. A més, la descomposició del complex  $(\text{NH}_3)\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{CH}_3\text{OH})$ , amb un lligand hidroxil axial i un metanol equatorial, dona lloc a la formació del complex 6 i un metanol, enlloc de  $\text{NH}_3$  i el complex 3b tal com passava en fase gas, encara que la diferència entre ambdues descomposicions és de només 2.316.6 kcal/mol. Malgrat que el complex pentacoordinat 3a amb un lligand hidroxil equatorial continua essent estable en solució, la seva descomposició a metanol i el complex 6 allibera únicament 1.2 kcal/mol. Si ens fixem en les càrregues atòmiques, i encara que les poblacions de Mulliken dels orbitals *d* no canvien, les poblacions dels orbitals *4s* i *4p* disminueixen sensiblement. Per exemple, en el complex 1 l'àtom de zinc augmenta la seva càrrega positiva de 1.382 a 1.401 electrons, mentre que la població de Mulliken conjunta dels orbitals *4s* i *4p* disminueix de 0.751 a 0.733 electrons quan passem de fase gas a solució aquosa. Per acabar, cal fer notar que els efectes de solvatació disminueixen l'energia d'estabilització de l'enllaç d'hidrogen del complex 2 de 15.4 kcal/mol en fase gas a 11.3 kcal/mol en solució.

La Taula XXXVI recull les energies de transferència protònica (PTE) en fase gas

Taula XXXV: Energies lliures d'enllaç (BFE) en solució aquosa (en kcal/mol) per als diferents lligands. L, x → y es refereix a que el lligand L s'uneix al complex x per donar l'y.

Lligands	BFE
CH <sub>3</sub> OH, 5 → 1	-14.3
CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , 5 → 2	-71.6
CH <sub>3</sub> OH, 6 → 3a	-1.2
CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , 6 → 4a	-49.3
NH <sub>3</sub> , 3b → 3a	-3.5
NH <sub>3</sub> , 4b → 4a	-4.4

i les energies lliures en solució per a la reacció:



Respecte al que es troba en fase gas, en solució aquosa les diferències entre les PTE de les espècies estudiades són més petites. Per als complexos 1 i 5 en fase gas s'obtenen transferències protòniques exotèrmiques. Per contra, en solució aquestes transferències són endotèrmiques, el que està més d'acord amb els resultats experimentals, i mostra que la inclusió dels efectes de solvatació ens porta a descripcions més realistes dels processos de transferència protònica. En particular, per al complex B (modelat en aquest treball com 5), que té un  $\text{pk}_a$  experimental de 7.5, [117] hem obtingut -16.7 i 40.3 kcal/mol com a PTEs en fase gas i en solució, respectivament. El valor negatiu de la PTE per al sistema aïllat no permet explicar el  $\text{pk}_a$  observat experimentalment.

Per a l'aigua i per al metanol l'ordre de les energies per a la transferència protònica en solució es troba invertit respecte al que es troba en fase gas. En el complex 1, la

Taula XXXVI: Energies de transferència protònica en fase gas i energies lliures de transferència protònica en solució, ambdues per a la reacció (85), per a les diferents espècies AH/A<sup>-</sup> estudiades. Les energies estan donades en kcal/mol.

Espècies	$\Delta E_{PT, gas}$	$\Delta G_{PT, solv}$
H <sub>2</sub> O/OH <sup>-</sup>	258.5	93.7
CH <sub>3</sub> OH/CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup>	239.3	97.8
1(CH <sub>3</sub> OH, H <sub>2</sub> O)/2(CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O)	-10.9	40.5
1(CH <sub>3</sub> OH, H <sub>2</sub> O)/3a(CH <sub>3</sub> OH, OH <sup>-</sup> )	3.0	53.4
2(CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O)/4a(CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup> )	103.6	62.6
3a(CH <sub>3</sub> OH, OH <sup>-</sup> )/4a(CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup> )	89.7	49.7
3b(CH <sub>3</sub> OH, OH <sup>-</sup> )/4b(CH <sub>3</sub> O <sup>-</sup> , OH <sup>-</sup> )	80.3	41.8
5(H <sub>2</sub> O)/6(OH <sup>-</sup> )	-16.7	40.3

desprotonació del CH<sub>3</sub>OH és més senzilla que la de l'aigua, tant en fase gas com en solució, en total acord amb el resultat experimental publicat per Kimura *et al.* [117] La diferència de 22.3 kcal/mol en la  $\Delta G_{PT, solv}$  de l'aigua en els complexos 2 i 5, permet interpretar els diferents  $pK_a$  experimentals de l'aigua dels complexos A i B, que són 10.7 i 7.5, respectivament. [117] En conclusió, aquest estudi teòric permet mostrar la important disminució de l'acidesa de l'aigua en el complex B quan un anió entrant s'uneix en una cinquena coordinació al zinc.

### 3.3.4 DISCUSSIO

En aquesta secció s'han estudiat els complexos 1-6 a nivell *ab initio* utilitzant la base 3-21G. Els resultats experimentals de Kimura *et al.* [117] es veuen confirmats



pel present estudi.

S'ha trobat que l'enllaç d'anions als complexos tetracoordinats és més fort que l'enllaç de lligands neutres. Aquests anions estabilitzen l'estructura de t<sub>bp</sub> quan es situen en posicions equatorials. Per contra, quan es situen en posicions axials donen lloc a la formació de complexos molt poc estables, que en alguns casos poden arribar a descomposar-se. La formació d'enllaços d'hidrogen intramoleculars pot ésser un factor important d'estabilització de la coordinació d'anions com a cinquè lligand. Per la seva part, l'enllaç de dos lligands aniònics a l'esfera de coordinació del Zn<sup>+2</sup> és difícil, de manera que inclús quan els dos anions es troben en posicions equatorials es formen complexos poc estables.

L'energia de desprotonació de l'aigua coordinada al Zn<sup>+2</sup> no es troba massa afectada pel número de lligands, si aquests són neutres. Ara bé, si són aniònics, l'energia de desprotonació d'aquesta aigua augmenta considerablement, de manera que el seu pK<sub>a</sub> també augmenta i la seva acidesa disminueix.

Tot i que la coordinació d'un anió suposa un canvi d'una unitat en la càrrega total del complex, la càrrega sobre l'àtom de Zn no canvia massa. Així, un augment de la càrrega positiva global en dues unitats atòmiques suposa un increment de només 0.3 electrons sobre l'àtom de zinc. Per tal de mantenir la càrrega més o menys constant, l'àtom de zinc modifica la seva distància als lligands, i com a conseqüència disminueix la transferència de càrrega des d'aquests.

L'energia d'estabilització per efecte del solvent augmenta en fer-se més gran la càrrega total del complex i en disminuir el número de coordinació, mentre que els enllaços Zn-lligand es debiliten. Les energies lliures de desprotonació es troba que són més properes a les experimentals quan s'inclou l'efecte de la solvatació. Si bé el nivell de càlcul emprat no permet realitzar una evaluació acurada dels pK<sub>a</sub> de les

diferents espècies que hi intervenen, cal dir que l'ordre de les afinitats protòniques dels diferents lligands en els complexos estudiats s'ha pogut reproduir correctament mitjançant els càlculs realitzats.

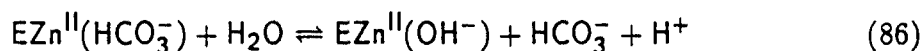
En aquest estudi hem comprovat que la inhibició aniònica de la CA és deguda a la disminució d'acidesa de l'aigua coordinada al  $Zn^{+2}$ . L'augment del  $pK_a$  d'aquesta aigua dificulta la generació de l'espècie activa  $EZn^{II}(OH^-)$ , i per tant, bloqueja el cicle catalític. Aquesta interpretació havia estat ja proposada a partir d'estudis experimentals. [74,86,107,130,131,174,429]

Els resultats que hem presentat donen una primera indicació del problema de l'intercanvi de  $HCO_3^-$  per  $H_2O$  en la CA, que tractarem amb més detall en el proper apartat. Per començar, hem vist que els lligands aniònics tenen una energia d'enllaç molt més gran que els neutres. Per tant, cal pensar que l'intercanvi directe del  $HCO_3^-$  per l' $H_2O$  ha d'ésser un procés molt difícil, donat que es tracta de substituir un lligand aniònic per un de neutre. Ara bé, la desprotonació prèvia de l'aigua per donar el grup hidroxil, ha de facilitar l'alliberament posterior del  $HCO_3^-$  per regenerar així l'espècie activa, tal com han posat de relleu diferents autors. [131] De fet, la formació d'un complex de  $Zn^{+2}$  amb dos anions en l'esfera de coordinació ha de debilitar molt els enllaços dels lligands, i ha de donar lloc a un complex poc estable i facilitar així la sortida del  $HCO_3^-$ . Per acabar, l'efecte del medi ha d'actuar també ajudant la sortida del  $HCO_3^-$ .

Tots aquests aspectes importants de l'intercanvi de  $HCO_3^-$  per  $H_2O$  que hem adelantat aquí, seran tractats més exhaustivament en el proper apartat del capítol de resultats.

### 3.4 ESTUDI DEL BESCANVI DE $\text{HCO}_3^-$ PER $\text{H}_2\text{O}$ EN LA CA

Un cop formada l'espècie  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ , el pas següent en el cicle catalític de la CA és la regeneració de l'espècie catalíticament activa  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ , el que comporta l'eliminació del bicarbonat i la coordinació d'una molècula d'aigua que es desprotona. El procés pot formular-se com:



Aquest és probablement el pas menys estudiat dels que componen el mecanisme global de reacció de la CA. Concretament, només hi ha un estudi experimental de RSE [85] on es parla de la formació d'un complex pentacoordinat en aquest pas del mecanisme, i on s'ha proposat que en primer lloc es dona l'entrada d'una molècula d'aigua en l'esfera de coordinació del metall, i posteriorment es produeix la sortida del bicarbonat. D'estudis teòrics només n'hi ha un amb el mètode semiempíric AM1. [157] En aquest estudi, s'ha trobat que el procés directe que comporta la sortida del bicarbonat i l'entrada de l'aigua no és factible. En canvi, s'ha optimitzat un complex pentacoordinat amb una estructura de bipiràmide trigonal, on el bicarbonat ocupa una de les posicions axials i l'aigua una de les equatorials, que sembla ésser un intermedi del procés d'intercanvi. A partir d'aquest complex, els autors proposen, per explicar l'eliminació del  $\text{HCO}_3^-$  i la regeneració de l'espècie catalíticament activa, un mecanisme de transferència d'un protó de l'aigua al bicarbonat, amb eliminació de  $\text{H}_2\text{CO}_3$  i formació simultània de l'espècie activa  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ . El problema d'aquest mecanisme és que no compleix la cinètica ping-pong per al procés catalític, la qual

és generalment acceptada per tots els investigadors d'aquest camp. Aquesta cinètica implica que l'eliminació del bicarbonat i la desprotonació de l'aigua es fan en dues etapes separades.

Com ja hem comentat hi ha clares evidències que en el transcurs del bescanvi de bicarbonat per l'aigua es forma un complex pentacoordinat. Dedicarem aquest apartat de la Tesi a l'estudi de complexos pentacoordinats que poden ésser importants en l'etapa de regeneració de l'espècie activa en la CA.

L'experiència adquirida en la secció anterior sobre geometria i estructura electrònica de complexos pentacoordinats ens serà molt útil per tractar ara el problema del bescanvi del bicarbonat per l'aigua en el nostre model de centre actiu d'anhidrasa carbònica.

La base utilitzada per a aquest estudi (3-21G) i les restriccions geomètriques que s'imposen als lligands  $\text{NH}_3$  han estat les mateixes que les considerades en els càlculs de la secció 3.1.2.1. En el procés d'eliminació del bicarbonat, l'efecte del camp creat pel medi pot ésser molt important en l'estabilització de l'espècie aniònica que s'allibera. Per aquest motiu, s'ha introduït en els càlculs l'efecte del medi amb la mateixa metodologia de model continu que s'ha emprat en la resta d'aquesta Tesi. Els paràmetres experimentals que precisa el programa han estat els mateixos que els utilitzats en la secció 3.2.2.1.3. L'objectiu que ens hem proposat en aquesta part de la Tesi és comprendre els factors que afavoreixen l'eliminació del bicarbonat i la regeneració de l'espècie activa. Hem subdividit aquest estudi en dues parts. En primer lloc, tractarem els possibles intermedis pentacoordinats resultants de l'enllaç d'una molècula d'aigua a l'espècie  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ . Donat que s'ha proposat que la desprotonació de l'aigua pot debilitar l'enllaç  $\text{Zn}^{+2}$ -bicarbonat, [131] en una segona part estudiarem els complexos pentacoordinats amb hidroxil i bicarbonat.

### 3.4.1 ESPECIES DEL TIPUS $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)(\text{H}_2\text{O})$

En aquesta secció ens proposem confirmar l'existència d'espècies pentacoordinades amb bicarbonat i aigua, i estudiar l'energètica de l'eliminació del bicarbonat.

Hem estructurat aquesta secció de la següent manera: en una primera part, presentarem les geometries dels complexos optimitzats; mentre que en una segona part, discutirem les energies d'enllaç d'alguns dels lligands.

#### 3.4.1.1 Geometries optimitzades

En aquest apartat volem veure si l'enllaç d'una aigua al  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$  dóna lloc o no a la formació d'espècies pentacoordinades de  $\text{Zn}^{+2}$  estables, i en cas que existeixin, establir la seva geometria. La nostra estratègia ha consistit en fer optimitzacions de geometria partint de complexos pentacoordinats. En aquestes optimitzacions que hem dut a terme no hem prejudicat en cap moment la geometria del complex final, i hem deixat optimitzar tots els paràmetres que defineixen l'esfera de coordinació de cadascun d'ells. Això vol dir que el resultat final de les optimitzacions podia haver donat tant complexos tetracoordinats amb eliminació d'un lligand, com complexos pentacoordinats en una estructura de *tbp*, o de *sp*, o també formes intermitges. També cal dir que s'han permès canvis en la posició dels lligands dins l'estructura inicial, de manera que un lligand que inicialment sigui equatorial, pot acabar en una posició axial en el complex final optimitzat. Com ja hem comentat el resultat de les optimitzacions depèn del punt de partida inicial. Nosaltres hem considerat dos punts de partida diferents, el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_{\text{eq}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{ax}}$  i el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{eq}}$ , els dos en forma de *tbp*. L'optimització d'aquestes dues espècies ens ha portat a dos

mínims diferents que corresponen a dos complexos pentacoordinats que hem anomenat *weba* i *wabe* segons la posició que ocupen l'aigua i el bicarbonat en l'esfera de coordinació.

La figura 36 mostra la geometria del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_{\text{eq}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{ax}}$  que resulta de l'addició d'una aigua al producte de la hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA, el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ . Aquest complex que hem anomenat *weba* té una aigua en la posició equatorial i un bicarbonat en la posició axial d'una *tbp* força distorsionada. L'angle axial  $\text{N}_{\text{ax}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_1$  és de  $158.4^\circ$ , i els angles equatorials són de  $115.7^\circ$  ( $\text{N}_{\text{eq1}}\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq2}}$ ),  $114.2^\circ$  ( $\text{N}_{\text{eq2}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_4$ ) i  $129.4^\circ$  ( $\text{O}_4\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq1}}$ ). Tal com ja hem vist en la secció anterior, en els complexos *tbp* de  $\text{Zn}^{+2}$  les distàncies Zn-N axials són més grans que les equatorials. A més, aquest complex presenta un enllaç d'hidrogen de característiques similars al del complex 2 de la secció anterior i que ajuda a estabilitzar l'estructura de *tbp*.

La geometria del mateix complex, però ara amb l'aigua en una posició axial i el bicarbonat en una equatorial es mostra en la figura 37. En aquest complex pentacoordinat en forma de *tbp* anomenat *wabe* l'angle axial  $\text{N}_{\text{ax}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_4$  és de  $166.3^\circ$ , mentre que els equatorials  $\text{N}_{\text{eq1}}\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq2}}$ ,  $\text{N}_{\text{eq2}}\widehat{\text{Zn}}\text{O}_1$  i  $\text{O}_1\widehat{\text{Zn}}\text{N}_{\text{eq1}}$ , són de  $119.1^\circ$ ,  $114.9^\circ$  i  $123.3^\circ$ , respectivament. En aquest complex també es forma un enllaç d'hidrogen entre un dels hidrògens de l'aigua i l'oxigen 1. Ara la distància de l'enllaç d'hidrogen  $\text{O}_1\text{-H}$  és aproximadament  $0.1 \text{ \AA}$  més llarga que en el complex *weba*, i per tant sembla que ha d'ésser un enllaç d'hidrogen més feble. Aquesta impressió es veu reforçada pels valors dels ordres d'enllaç de Mayer [409] per a aquests dos enllaços d'hidrogen que valen 0.091 i 0.072 per als complexos *weba* i *wabe*, respectivament. Com ja hem vist en la secció anterior, quan un lligand està en posició axial d'una *tbp* en un complex  $d^{10} \text{ML}_5$ , transfereix menys càrrega a l'àtom central. Per aquesta raó, el bicarbonat del complex *weba* ha transferit menys càrrega que el del complex *wabe* (0.306 enfront de 0.322 electrons, respectivament). Per això l' $\text{O}_1$  del bicarbonat en el complex

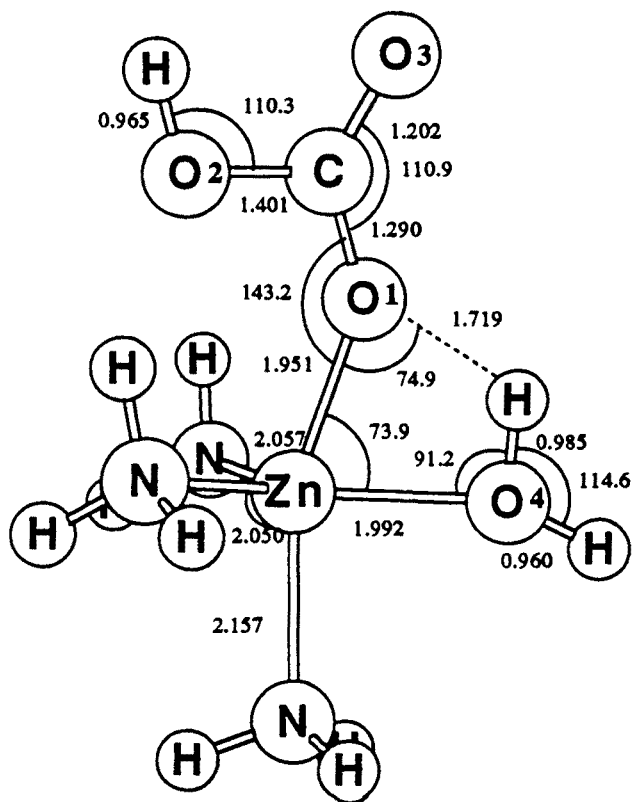


Figura 36: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_{\text{eq}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{ax}}$  weba optimitzat amb la base 3-21G.

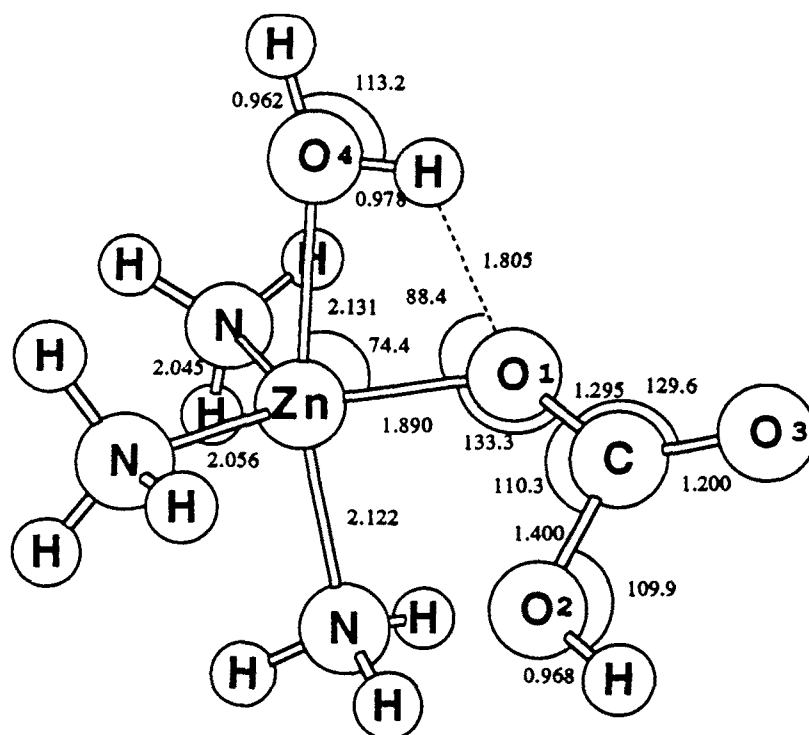


Figura 37: Estructura del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_{\text{ax}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{eq}}$  wabe optimitzat amb la base 3-21G.

weba té més càrrega negativa que el del wabe, i això explica per què forma un enllaç d'hidrogen intramolecular més fort.

Es interessant assenyalar que l'ordre d'enllaç de Mayer per l'enllaç  $\text{Zn}-\text{O}_1$  passa de 0.584 en el complex tetracoordinat  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$  a 0.392 en el complex weba i a 0.455 en el wabe. Aquests valors estan directament relacionats amb els valors de les distàncies  $\text{Zn}-\text{O}_1$  que són de 1.844, 1.951 i 1.890 Å, respectivament. Es a dir, l'entrada d'una molècula d'aigua com a cinquè lligand, debilita l'enllaç del bicarbonat. Aquest fet és especialment notable en el cas del complex weba, on el bicarbonat ocupa una



posició axial. Es ben sabut que els  $\sigma$  donadors s'uneixen amb més força quan es situen en posicions equatorials.

A partir d'aquestes dues geometries s'apunta la possibilitat de transferència d'un protó de l'aigua al bicarbonat. En aquest cas es formaria el complex pentacoordinat  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$  amb un grup hidroxil coordinat al zinc, i un  $\text{H}_2\text{CO}_3$  que és d'esperar s'alliberi amb més facilitat donat que es tracta d'un lligand neutre. Aquesta possibilitat ha estat proposada per Merz *et al.* [157] a partir de càlculs teòrics amb el mètode AM1.

Quan s'ha intentat optimitzar el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$  en la hipersuperfície d'energia potencial amb l'hidroxil en posició axial i l'àcid carbònic en equatorial, o a l'inrevés, els resultats han estat sempre els complexos *weba* o *wabe*. Aquest comportament l'atribuïm a la més gran basicitat del grup hidroxil enfront del bicarbonat, el que provoca la transferència immediata d'un hidrogen de l'àcid carbònic a l'hidroxil, i que per tant el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$  no sigui un mínim en la hipersuperfície explorada. Això ens fa concloure que la transferència d'un protó de l'aigua al bicarbonat com a pas previ per a l'alliberament d'àcid carbònic tal com han proposat a partir de càlculs teòrics Merz *et al.*, [157] no és un procés massa probable en la CA. De fet, experimentalment s'ha observat sempre la formació de  $\text{HCO}_3^-$  i mai de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , [437] el que és una prova més a favor d'aquesta hipòtesi.

### 3.4.1.2 Energètica

En la Taula XXXVII es recullen els valors de les energies relatives al complex inicial  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$  de les diferents espècies implicades en l'entrada de l'aigua en l'esfera de coordinació d'aquest complex i la posterior alliberació del bicarbonat, obtinguts per a diferents valors de la constant dielèctrica del medi. Si ens fixem primer en la diferència d'energia entre els complexos tetracoordinats inicial i final, s'observa que per al sistema aïllat ( $\epsilon=1.00$ ), aquest bescanvi és energèticament molt costós (205.4 kcal/mol). La dificultat d'aquest bescanvi s'enten fàcilment si es té en compte que s'elimina un lligand aniònic i se'n coordina un de neutre. Això significa passar d'un complex inicial amb càrrega total +1 a dos productes amb càrregues +2 i -1. En fase gasosa aquest procés de separació de càrrega és extremadament desfavorable. Lògicament, l'existència d'un medi dielèctric polaritzable que estabilitzarà notablement els productes, farà disminuir sensiblement aquesta diferència. Això es veu clarament en la Taula XXXVII. A mesura que augmenta la constant dielèctrica del medi, la diferència energètica es fa més petita, i per a  $\epsilon=78.36$ , acaba per ésser de només 10.9 kcal/mol. L'explicació d'aquesta tendència la podem trobar en el diferent comportament que presenten les espècies implicades enfront del medi dielèctric. A partir dels valors de la Taula XXXVIII es pot veure que de totes les espècies implicades, els dos productes finals  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  i  $\text{HCO}_3^-$  són els que tenen una  $\Delta G_{\text{solv}}$  més gran, i per tant, són els que s'estabilitzen més per la presència del medi. Com ja hem comentat en el capítol anterior, l'energia lliure de solvatació és tant més gran quant més gran és la càrrega total del complex i quant més gran és la constant dielèctrica. També és més important per a espècies tetracoordinades que per a pentacoordinades.

En la secció anterior hem vist que les espècies pentacoordinades amb  $\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{HCO}_3^-$  (*weba* i *wabe*) són espècies estables. Els valors d'energies de la Taula XXXVII donen

Taula XXXVII: Energies relatives (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés de bescanvi del bicarbonat per l'aigua, en medis d' $\epsilon=1.00$ ,  $1.88$  i  $78.36$ , calculades amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.00$	$\epsilon=1.88$	$\epsilon=78.36$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-) + \text{H}_2\text{O}$	0.	0.	0.
<b>weba</b>	-26.5	-21.9	-15.0
<b>wabe</b>	-26.4	-21.7	-14.9
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O}) + \text{HCO}_3^-$	205.4	112.7	10.9

Taula XXXVIII: Energies lliures de solvatació i les seves components electrostàtica i de cavitació (en kcal/mol) per a les diferents espècies que intervenen en el procés de bescanvi del bicarbonat per l'aigua en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $78.36$ , obtingudes amb la base 3-21G.

	$\epsilon=1.88$			$\epsilon=78.36$		
	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$	$\Delta G_{el}$	$G_{cav}$	$\Delta G_{solv}$
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$	-33.2	11.3	-21.9	-73.4	18.8	-54.6
$(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$	-91.9	10.1	-81.8	-195.6	16.7	-178.9
<b>weba</b>	-31.5	12.1	-19.4	-69.5	20.1	-49.4
<b>wabe</b>	-31.4	12.0	-19.4	-69.5	20.0	-49.5
<b>hebe</b>	-11.3	11.6	0.3	-28.1	19.4	-8.7
$\text{H}_2\text{O}$	-3.0	3.7	0.7	-7.6	5.5	-2.1
$\text{HCO}_3^-$	-36.9	5.1	-31.8	-79.9	8.0	-71.9

idea de l'estabilització deguda a la coordinació d'una molècula d'aigua. Aquests valors per als sistemes aïllats ( $\epsilon=1.00$ ) són comparables amb els obtinguts per a altres lligands neutres en l'apartat 3.3 d'aquesta Tesi. En augmentar la constant dielèctrica del medi, aquesta energia d'enllaç disminueix, si bé l'efecte és molt menys notable que en el cas de lligands aniònics.

Per a un medi d' $\epsilon=1.00$  la diferència energètica entre els complexos *weba* i *wabe* és d'únicament 0.1 kcal/mol. En principi semblaria que hauria d'ésser més estable el complex *wabe*, donat que els  $\sigma$  donadors més forts prefereixen situar-se en les posicions equatorials per tal d'estabilitzar la *tbp*. [436] L'explicació a la pràctica igualació d'estabilitats trobada en aquests dos complexos pentacoordinats s'ha de buscar en la diferent intensitat dels enllaços d'hidrogen intramoleculars que es formen en ambdós complexos. Ja hem comentat abans que l'enllaç d'hidrogen en el complex *weba* és més fort que en el *wabe*, el que permetria explicar l'anivellació d'estabilitats. Els  $\Delta G_{\text{solv}}$  dels dos complexos no modifiquen les estabilitats relatives, donat que són pràcticament iguals per als dos.

L'últim aspecte a comentar és l'energia necessària per arrencar el  $\text{HCO}_3^-$  dels complexos pentacoordinats. En el cas del complex *weba* aquesta energia és de 231.9 kcal/mol en fase gasosa, però disminueix fins a 25.9 kcal/mol en un medi d' $\epsilon=78.36$ . L'efecte del medi és, per tant, fonamental per entendre l'alliberament d'aquest anió. Tot i així, el valor de 25.9 kcal/mol és encara massa alt per explicar els valors experimentals que es tenen.

### 3.4.2 ESPECIES DEL TIPUS $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)(\text{OH}^-)$

Un cop s'ha coordinat una molècula d'aigua al complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$  poden haver-hi diferents alternatives que ens permetin regenerar l'espècie activa. Una d'elles és la sortida directa del  $\text{HCO}_3^-$  per donar lloc a l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ . Ja hem vist que aquesta possibilitat és poc probable degut a l'elevat cost energètic que comporta. Una segona alternativa és la transferència protònica intramolecular d'un protó de l'aigua coordinada al zinc cap al bicarbonat per formar el complex amb hidroxil i  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$ , on l'eliminació del  $\text{H}_2\text{CO}_3$  seria relativament senzilla. Hem comprovat com aquesta possibilitat tampoc és factible, donat que el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$  no existeix com a mínim, i a més des d'un punt de vista experimental, no s'ha observat mai la sortida d'una molècula de  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Finalment, una darrera possibilitat és la desprotonació prèvia de l'aigua en l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{HCO}_3^-)$  amb formació de l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$ . En aquesta espècie la pèrdua del  $\text{HCO}_3^-$  seria molt menys costosa, degut a que com ja hem vist els complexos pentacoordinats de  $\text{Zn}^{+2}$  amb dos anions en l'esfera de coordinació són poc estables. A més l'alliberament del  $\text{HCO}_3^-$  ens permetria recuperar l'espècie catalíticament activa  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ . Val a dir que aquest darrer camí compliria amb la cinètica ping-pong observada experimentalment, donat que la transferència protònica des de l'aigua a un residu acceptor, i l'eliminació de  $\text{HCO}_3^-$  serien dos processos separats.

Aquesta darrera possibilitat és la que volem estudiar en aquest apartat.

### 3.4.2.1 Geometries optimitzades

Per al complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$  hem estudiat totes les possibilitats de coordinació, excepte aquella que suposa que tant l'hidroxil com el bicarbonat ocupin posicions axials, possibilitat que s'ha descartat de bon principi. El motiu és que ja hem comprovat a la secció 3.3 que un complex de  $\text{Zn}^{+2}$  amb dos lligands aniònics en posicions axials no és estable. Així hem procedit a l'optimització del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$  amb l'hidroxil en posició equatorial i el bicarbonat en axial (**heba**) i a la inversa (**habe**), i també amb l'hidroxil i el bicarbonat ocupant tots dos posicions equatorials (**hebe**). S'ha observat que en els dos primers casos es perd un lligand  $\text{NH}_3$ , el que confirma la ja observada dificultat que presenta la CA per acomodar dos lligands aniònics en el seu centre actiu. [130] En canvi, el complex **hebe** resta com un mínim pentacoordinat amb els dos lligands  $\text{OH}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  enllaçats al  $\text{Zn}^{+2}$ .

De manera semblant al que passava per al complex **4a** de la secció anterior, el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$  només és un mínim en la hipersuperfície de potencial quan els dos lligands aniònics es situen en posicions equatorials de la *tbp*, i formen un complex que es troba dibuixat en la figura 38. L'estabilitat d'aquest complex enfront dels altres dos, es podia preveure a partir de les conegudes preferències [436] dels  $\sigma$  donadors per les posicions equatorials d'una *tbp* en els complexos  $d^{10} \text{ML}_5$ . Aquest complex té una estructura de *tbp* més regular que els dos anteriors, amb un angle axial  $\widehat{N_{ax1}ZnN_{ax2}}$  bastant lineal de  $169.3^\circ$ , i uns angles equatorials de  $102.7^\circ$  ( $\widehat{N_{eq}ZnO_1}$ ),  $135.5^\circ$  ( $\widehat{O_1ZnO_4}$ ) i  $121.9^\circ$  ( $\widehat{O_4ZnN_{eq}}$ ), i que sumen  $360.1^\circ$ . La presència de dos anions en dues posicions equatorials fa obrir molt l'angle  $\widehat{O_1ZnO_4}$ . Les distàncies  $\text{Zn}-\text{O}_1$  i  $\text{Zn}-\text{O}_4$  són de 1.956 i 1.824 Å i els seus ordres d'enllaç 0.399 i 0.798, respectivament, el que ja dona una idea que el lligand hidroxil es troba més fortament enllaçat que no pas el

bicarbonat en aquest complex. Si comparem l'ordre d'enllaç Zn-O<sub>1</sub> d'aquest complex amb el del complex *wabe* (que és de 0.455), observem que l'enllaç Zn-bicarbonat s'ha debilitat al desprotonar-se l'aigua per donar el grup hidroxil. S'ha estudiat també el complex *heba* mantenint les distàncies Zn-N fixes a 2.05 Å i deixant optimitzar la resta de paràmetres geomètrics, per veure si així es perdia el  $\text{HCO}_3^-$  i relacionar això amb la possibilitat que per alguna raó la ruptura de l'enllaç Zn-N no fos possible en la CA, i això facilités la sortida del  $\text{HCO}_3^-$ . En el transcurs de l'optimització no es perd el  $\text{HCO}_3^-$ , si bé la distància Zn-O<sub>1</sub> augmenta fins a 2.001 Å i l'ordre d'enllaç disminueix a 0.354, mentre que el de l'enllaç Zn-O<sub>4</sub> augmenta fins a 0.841 en aquest complex. Hem de concloure doncs, que la pèrdua directa del  $\text{HCO}_3^-$  no és possible ni en el cas de mantenir les distàncies Zn-N fixes sense deixar que es perdi un grup  $\text{NH}_3$ , que com hem vist és el que passa quan s'optimitzen totes les variables geomètriques.

Finalment, cal assenyalar que, a l'igual que el que havíem vist en el capítol anterior, la càrrega sobre el zinc es manté aproximadament constant en tots els complexos tetra- i pentacoordinats estudiats. Concretament les càrregues sobre l'àtom de  $\text{Zn}^{+2}$  són de 1.29, 1.28 i 1.17 a.u. en els complexos *weba*, *wabe* i *hebe*, respectivament. La càrrega total sobre el grup  $\text{HCO}_3^-$  tampoc canvia massa, i és per als mateixos complexos de -0.694, -0.678 i -0.743 au, respectivament.

### 3.4.2.2 Energètica

Hi ha dos aspectes energètics a considerar. Hem vist a la secció 3.3 que la coordinació d'un anió a l'espècie  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  dificulta la desprotonació de l'aigua. Es tracta de veure en primer lloc, fins a quin punt la presència de l' $\text{HCO}_3^-$  coordinat fa augmentar l'energia de desprotonació de l'aigua. Hem vist també que quan són



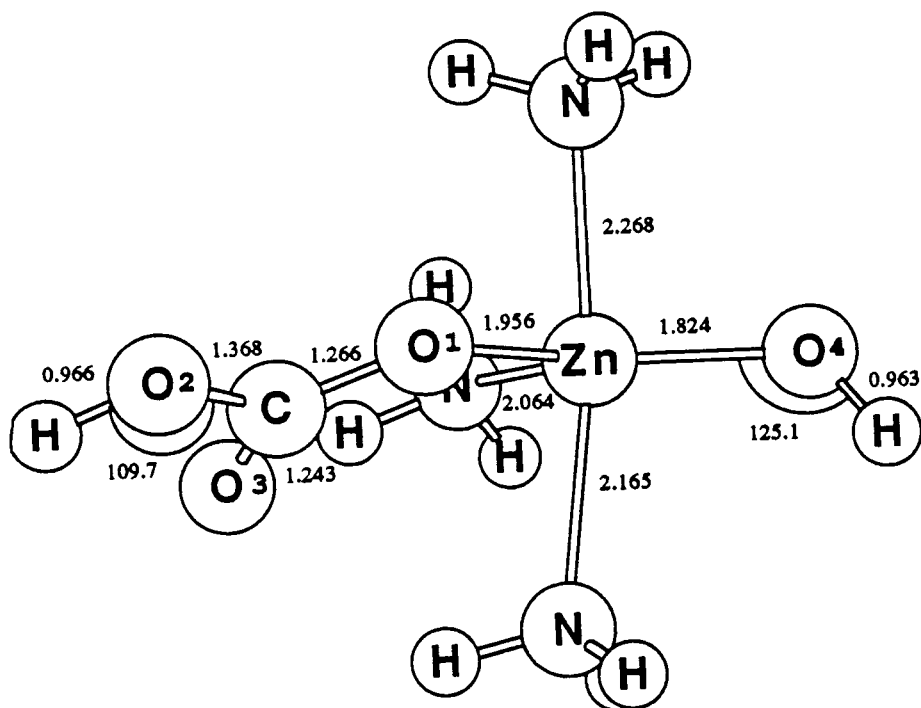


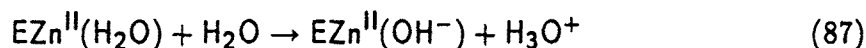
Figura 38: Estructura del complex hebe  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)_{\text{eq}}(\text{HCO}_3^-)_{\text{eq}}$  optimitzat amb la base 3-21G.

Taula XXXIX: Energies de transferència protònica en fase gas i energies lliures de transferència protònica en medis d' $\epsilon=1.88$  i  $\epsilon=78.36$ , per a la reacció de desprotonació dels complexos *weba* i *wabe*. Les energies estan donades en kcal/mol.

Espècies	$\Delta E_{\text{PT,gas}}$	$\Delta G_{\text{PT},\epsilon=1.88}$	$\Delta G_{\text{PT},\epsilon=78.36}$
<i>weba</i> / <i>hebe</i>	84.5	68.9	51.2
<i>wabe</i> / <i>hebe</i>	84.2	68.7	51.1

dos els anions coordinats, l'eliminació d'un d'ells és molt menys costosa. En segon lloc tractarem de com la presència de l'hidroxil que s'ha format facilita la sortida del bicarbonat.

En la Taula XXXIX es donen les energies de transferència protònica (PTE) per a la reacció:



Com a  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  es consideren els complexos *weba* i *wabe*.

Per al complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  hem vist (Taula XXX) que els valors de  $\Delta E_{\text{PT,gas}}$  i  $\Delta G_{\text{PT},\epsilon=78.36}$  són de -16.7 i 40.3 kcal/mol. La diferència en la  $\Delta E_{\text{PT,gas}}$  entre aquest complex i el *weba*, per exemple, és de més de 100 kcal/mol. Aquest augment de l'energia de desprotonació de l'aigua al passar d'un complex tetracoordinat a un de pentacoordinat, ja ha estat posada de manifest prèviament per altres autors. [118,164,172]

Ara bé, en un medi d' $\epsilon=78.36$ , la diferència entre les dues energies lliures de transferència protònica ( $\Delta G_{\text{PT},\epsilon=78.36}$ ) és de només 10.9 kcal/mol. Comparant la desprotonació de l'aigua en un complex com el *weba* amb la del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ ,

Taula XL: Energia (en kcal/mol) necessària per arrencar un  $\text{HCO}_3^-$  de l'esfera de coordinació del complex **hebe**, en medis d' $\epsilon=1.00$ , 1.88 i 78.36, calculades amb la base 3-21G.

Energia	$\epsilon=1.00$	$\epsilon=1.88$	$\epsilon=78.36$
<b>wabe</b>	231.9	134.6	25.9
<b>hebe</b>	131.8	76.6	16.0

s'observa que la del complex **weba** és veu molt afavorida per la presència de solució aquosa, mentre que la del complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$  es veu bastant dificultada. El fet més interessant és que en un medi de constant dielèctrica gran, la presència d'un bicarbonat en l'esfera de coordinació no modifica excessivament l'energia de desprotonació de l'aigua.

En la Taula XL es donen els valors de les energies necessàries per arrencar un  $\text{HCO}_3^-$  de l'esfera de coordinació del complex **weba** i **hebe**, en medis de diferent constant dielèctrica. S'observa que per al sistema aïllat, l'energia necessària per alliberar  $\text{HCO}_3^-$  és 100.1 kcal/mol més petita en el complex **hebe** que en el **weba**. La desprotonació de l'aigua coordinada al zinc facilita doncs la sortida del grup  $\text{HCO}_3^-$ . Aquest fet ja ha estat comentat a partir de càlculs experimentals i teòrics d'altres autors. [80,131] Aquesta diferència es fa més petita en augmentar la polaritat del medi. Per a  $\epsilon=78.36$  és de només 9.9 kcal/mol en favor del complex amb hidroxil (**hebe**). Ara la pèrdua d'aquest bicarbonat en solució aquosa només suposa 16.0 kcal/mol, el que es troba més proper al que es podria esperar experimentalment.

Tot això ens fa veure que si bé la desprotonació prèvia de l'aigua és un procés que facilita la sortida del  $\text{HCO}_3^-$ , aquesta desprotonació és més costosa energèticament quan el bicarbonat està coordinat al  $\text{Zn}^{+2}$  que no pas quan l'enzim l'ha alliberat. Així doncs, és interessant fer notar que juguem amb dos factors que es contraposen. Per una part, la presència del  $\text{HCO}_3^-$  en l'esfera de coordinació del  $\text{Zn}^{+2}$  dificulta la desprotonació de l'aigua, però per una altra, un cop s'ha desprotonat l'aigua la sortida d'aquest grup  $\text{HCO}_3^-$  es veu molt més afavorida.

En un medi d' $\epsilon=78.36$  els dos factors que es contraposen per determinar si es produeix primer la desprotonació de l'aigua o l'alliberament del grup  $\text{HCO}_3^-$ , han perdut pes de manera notable. Per una part, la presència d' $\text{HCO}_3^-$  en l'esfera de coordinació continua dificultant la desprotonació de l'aigua, però ara de manera molt menys sensible. Per una altra, la sortida de l' $\text{HCO}_3^-$  de l'esfera de coordinació encara està afavorida per a la desprotonació prèvia de l'aigua, però la diferència tampoc és tan gran.

### 3.4.3 DISCUSSIÓ

En aquesta secció hem estudiat l'existència de complexos pentacoordinats en el procés de bescanvi de  $\text{HCO}_3^-$  per  $\text{H}_2\text{O}$  en l'esfera de coordinació del  $\text{Zn}^{+2}$ . Hem comprovat que els complexos pentacoordinats amb bicarbonat i aigua (*weba* i *wabe*) són espècies estables. Aquests complexos presenten estructura de *tbp* un xic distorsionada. Es d'esperar doncs que, en el procés de bescanvi es formin espècies pentacoordinades, la qual cosa recolza les evidències esperimentals indirectes que es tenen sobre aquest punt.

En el procés d'eliminació del bicarbonat, la possibilitat que es faci a través d'una

transferència protònica intramolecular amb formació simultània de l' $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$  i l'eliminació d'un  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , ha estat descartada. El complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{H}_2\text{CO}_3)$  no és cap mínim en la superfície d'energia potencial i la seva optimització evoluciona cap als complexos *weba* o *wabe*. Aquest resultat està d'acord amb l'evidència experimental de cinètica ping-pong. S'ha considerat la possibilitat que la desprotonació de l'aigua en el complex pentacoordinat sigui prèvia a l'eliminació del  $\text{HCO}_3^-$ . Els càlculs han portat al complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$ , que és estable quan els dos lligands aniónics ocupen posicions equatorials en la *tbp* (*hebe*).

Des del punt de vista energètic s'ha trobat que quan no es considera l'efecte del medi, en els complexos *weba* i *wabe* és molt difícil perdre el lligand bicarbonat. En el complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$  la pèrdua d' $\text{HCO}_3^-$  és més senzilla. Però per una altra part, la presència de l' $\text{HCO}_3^-$  en els complexos *weba* i *wabe* dificulta la desprotonació de l'aigua. Tots aquests resultats es mantenen en medis de constant dielèctrica gran, si bé les diferències energètiques dels processos de desprotonació i pèrdua del bicarbonat es redueixen sensiblement.

A la vista dels resultats obtinguts podem proposar com a seqüència viable en el bescanvi de  $\text{HCO}_3^-$  per aigua en la CA una en la que: en primer lloc, es dona l'entrada d'una molècula d'aigua en posició equatorial; en segon lloc, es desprotona aquesta aigua; i finalment, es perd el bicarbonat i es forma l'espècie catalíticament activa. En ser la desprotonació i l'eliminació del  $\text{HCO}_3^-$  dos processos separats, entenem que aquest mecanisme és compatible amb la cinètica ping-pong.

## 3.5 DISCUSSIO GLOBAL DEL MECANISME DE LA CA

En aquesta Tesi s'han fet càlculs mecano-quàntics per tal d'estudiar el mecanisme d'hidratació del  $\text{CO}_2$  en presència d'anhidrasa carbònica. En aquest capítol volem resumir els resultats més importants que hem obtingut en el nostre treball, i relacionar-los amb els estudis experimentals i teòrics més remarcables que s'han dut a terme fins ara. Finalment, volem acabar describint una proposta de mecanisme d'actuació de la CA segons es desprèn de l'estudi que hem realitzat en aquesta Tesi.

Al llarg d'aquesta memòria hem dividit l'estudi del mecanisme d'hidratació del  $\text{CO}_2$  en la CA en quatre parts que són: en primer lloc, la desprotonació de l'aigua per generar l'espècie catalíticament activa; en segon lloc, l'apropament del  $\text{CO}_2$  al centre actiu de la CA; en tercer lloc, la formació de l'espècie  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{HCO}_3^-)$ ; i en quart lloc, l'entrada de l'aigua i sortida del bicarbonat. Comentarem ara els resultats més rellevants que hem obtingut de cadascuna d'aquestes etapes.

La desprotonació de l'aigua per donar l'espècie activa, ha estat probablement l'etapa més estudiada, tant des d'un punt de vista experimental com teòric. Ha estat demostrat a partir d'efectes d'isòtop [125] que es tracta del pas limitant del procés, i que per tant ha de tenir una barrera de l'ordre de 10 kcal/mol. Estudis d'inhibició, [120] marcatge isotòpic, [92,119,124,127] i d'espectroscòpia electrònica, [84] han demostrat que la transferència d'un protó de l'aigua coordinada al zinc fins al buffer es fa mitjançant una cadena de com a mínim dues molècules d'aigua cap a la His-64. Aquesta histidina juga el paper de receptor intermig del protó,

que posteriorment passa al buffer. Teòricament s'ha estudiat utilitzant el mètode PRDDO [118] i l'AM1. [157] Amb el primer mètode s'ha conclòs que la barrera energètica per a aquest procés és de 34 kcal/mol, quasi independentment del número de molècules d'aigua que actuin de cadena entre l'aigua coordinada al zinc i la His-64. Amb el mètode AM1 s'ha fet un estudi més complet i s'ha proposat que l'etapa de desprotonació va lligada a l'eliminació del bicarbonat, de manera que la transferència protònica més favorable és la que ocorre des de l'aigua coordinada fins al bicarbonat, per acabar amb l'alliberament de l'àcid carbònic.

El nostre estudi de la primera etapa ens ha servit, d'entrada, per determinar el model de centre actiu i el nivell de càlcul més adients per realitzar els càlculs de seccions posteriors. Hem preferit un mètode *ab initio* a un de semiempíric o de mecànica molecular, donat que com hem explicat en els objectius, volíem una descripció el més acurada possible de totes les interaccions que tenen lloc en el centre actiu de l'enzim. Com a contrapartida, lògicament, el model utilitzat s'ha hagut de simplificar al màxim. La base de càlcul emprada ha estat la 3-21G, de qualitat intermitga, a cavall entre una base mínima i bases més esteses. Aquesta base ens ha permès bones descripcions dels processos sense que això hagi suposat un temps de càlcul que fes l'estudi inviable. En tots els casos s'han dut a terme optimitzacions de geometria per localitzar mínims i estats de transició en les superfícies d'energia potencial. Per a algunes espècies s'ha introduït l'efecte de la correlació electrònica al nivell MP2. Hem elegit com a model de centre actiu el  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})$ , on els tres  $\text{NH}_3$  representen les His-94, 96 i 119, que es troben coordinades directament al  $\text{Zn}^{+2}$  en la CA. Sempre que ha estat indispensable en el mecanisme que s'estava tractant, s'ha incorporat a la descripció del centre actiu una molècula d'aigua addicional. Per acabar, s'ha representat el camp creat per l'entorn mitjançant un mètode continu. Els avantatges d'aquest model són: en primer lloc, permet un tractament *ab initio* donat

que el número d'àtoms considerat no és massa gran; en segon lloc, recull els efectes més importants produïts pels lligands; i en tercer lloc, permet fer un estudi complet del mecanisme, amb determinació de barreres d'activació. Les limitacions del model són també evidents. En primer lloc, el número de residus considerat és massa petit per esperar tenir una bona descripció de totes les interaccions que es produeixen en el centre actiu de la CA durant el procés de catàlisi. En segon lloc, si bé la base de càlcul és acceptable, es troba encara lluny del límit Hartree-Fock, i a més les correccions de correlació només s'han realitzat fins a segon ordre (MP2). Per acabar, a l'introduir el camp de l'entorn no reoptimitzem les espècies que hi intervenen, malgrat que l'efecte del camp ha de modificar substancialment les superfícies d'energia potencial.

Del nostre estudi de la transferència protònica hem deduït que el  $Zn^{+2}$  catalitza aquest tipus de processos bàsicament a través d'efectes de tipus electrostàtic i de transferència de càrrega. A més s'ha comprovat que la barrera energètica de la transferència a una molècula d'aigua és elevada a menys que hi hagi també algun grup més bàsic que dongui la 'driving-force' necessària perquè es produeixi la transferència protònica. Hem vist que és molt probable que aquest grup sigui la His-64. A més, hem trobat que la transferència protònica intramolecular de l'aigua coordinada cap al bicarbonat que s'ha format no és possible degut a l'elevada afinitat protònica del grup hidroxil. Això contradiu d'altres resultats teòrics, però està d'acord amb els resultats experimentals segons els quals el mecanisme de la CA està governat per una cinètica ping-pong. En aquest tipus de cinètica, la desprotonació de l'aigua per generar l'espècie activa i la formació del bicarbonat corresponen a dues etapes successives.

Per a l'enllaç del  $CO_2$ , Riepe i Wang [93] varen concloure, a partir d'un canvi de  $2.5\text{ cm}^{-1}$  en la freqüència del stretching asimètric del  $CO_2$ , que el  $CO_2$  no s'uneix directament al metall. Estudis teòrics de Merz *et al.* [157] havien reforçat aquesta



hipòtesi. Per la seva banda, un treball experimental d'inhibició aniònica, [128] i càlculs teòrics de Pullman [163] i de Lipscomb [118] van suggerir que el  $\text{CO}_2$  sí que es coordina directament al metall. Els nostres resultats mostren un  $\text{CO}_2$  proper al centre actiu de l'enzim amb interaccions essencialment de tipus electrostàtic. L'efecte més important de la interacció del metall amb el  $\text{CO}_2$  és la reordenació de càrrega que es produeix en aquesta última molècula, de manera que queda activada per al posterior atac nucleofílic de l'hidroxil. L'estudi de la densitat electrònica demostra que no pot parlar-se pròpiament d'enllaç del  $\text{CO}_2$  al  $\text{Zn}^{+2}$ , si bé la important component electrostàtica en la interacció estabilitza fortament el complex inicial.

Hi ha força controvèrsia sobre si en aquest estadi de la interacció, s'ha iniciat o no l'atac nucleofílic. Ja hem comentat que els resultats dels estudis teòrics reportats fins ara han arribat a resultats contradictoris. Lipscomb [118] va considerar que en l'intermedi inicial, l'atac nucleofílic ja s'ha acabat. Per contra, Jacob *et al.* [173] i Merz *et al.* [157] van creure que encara ha de començar. Els resultats que hem obtingut en aquesta Tesi depenen del model de centre actiu i de la base emprats per al seu estudi. En el model més complex que incorpora una molècula d'aigua, s'obté una distància del C a l'O de l'hidroxil molt petita i una transferència electrònica cap al  $\text{CO}_2$  important, que ens indica que l'atac nucleofílic es troba bastant avançat en aquest intermedi inicial, encara que no acabat del tot, com demostra la presència en el vector de transició, per a la formació de  $\text{HCO}_3^-$ , d'una certa component que correspon a aquest atac nucleofílic. En qualsevol cas, és interessant fer notar que en el cas d'existir una barrera per a l'atac nucleofílic, aquesta ha d'ésser molt petita.

S'han proposat dos possibles mecanismes per explicar la formació d' $\text{HCO}_3^-$  en el centre actiu, els anomenats mecanismes de Lipscomb i de Lindskog. Des d'un punt de vista experimental, el primer ve recolzat per diferents estudis, [119,401] el més remarcable dels quals és el de la substitució del protó del bicarbonat per algun grup

alquil. [119] Càlculs teòrics amb el mètode PRDDO [80] també donen barreres de reacció més petites per a aquest mecanisme que per al de Lindskog. El mecanisme de Lindskog també es basa en una sèrie de treballs experimentals i teòrics. Inicialment proposat per Lindskog a partir d'estudis cinètics i de NMR  $C^{13}$ , [71,125,412,413] posteriorment ha estat confirmat com el més probable per diferents autors a partir de càlculs teòrics. [157,173]

En els nostres resultats s'observa que el mecanisme de Lindskog és en principi el més favorable. Ara bé, quan s'inclou una molècula d'aigua addicional a la descripció del centre actiu, es produeix una disminució important de la barrera de reacció del mecanisme de Lipscomb. La molècula d'aigua afegida al nostre model actua com a catalitzador bifuncional, de manera que es forma una cadena que facilita la transferència protònica que dona lloc a la formació de  $HCO_3^-$ . Ja hem comentat que experimentalment es sap que són més o menys deu les molècules d'aigua que es troben al voltant del centre actiu de l'enzim, i que alguna d'elles pot intervenir activament en la reacció. Així mateix, tant l'efecte de l'entorn com la introducció de correccions de correlació electrònica afavoreixen el mecanisme de Lipscomb enfront del de Lindskog. La consideració global de tots aquests efectes porta a barreres per a aquests dos mecanismes que difereixen en aproximadament una kcal/mol, i que es troben per sota del valor màxim esperat des d'un punt de vista experimental, que és de 10 kcal/mol. Això ens fa concloure que la reacció en la CA podria donar-se per les dues vies, donada la petita diferència energètica trobada entre les barreres per ambdós mecanismes. En aquest cas, les fluctuacions de les molècules del medi, i en especial de les molècules d'aigua properes al centre actiu de l'enzim, governarien la cinètica de la reacció, i provocarien que la reacció es produís per una via o altra. Per discutir més a fons aquest punt caldria realitzar càlculs dinàmics amb introducció de l'efecte de l'entorn. Dissortadament, aquests càlculs, avui per avui, es troben lluny del nostre abast, tant

des d'un punt de vista de software com de hardware.

Respecte al bescanvi de l' $\text{HCO}_3^-$  per l'aigua, ja hem comentat que tant des del punt de vista experimental com teòric és poc el que s'ha descrit. A partir d'un treball de RSE [85] s'ha comprovat la formació d'un complex pentacoordinat durant aquesta etapa. Amb el mètode AM1 [157] s'ha optimitzat un complex pentacoordinat que presenta una estructura de bipiràmide trigonal on el bicarbonat ocupa una de les posicions axials, i l'aigua una de les posicions equatorials. En el nostre treball hem demostrat l'existència d'espècies pentacoordinades d'aquest tipus com a espècies estables, i per tant, creiem molt probable que el mecanisme de bescanvi es faci passant per complexos del tipus  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})(\text{HCO}_3^-)$ . En concret hem localitzat dos complexos estables pentacoordinats d'aquestes característiques amb estructura de tbp. Hem considerat després la desprotonació de l'aigua en el complex pentacoordinat i hem obtingut un complex  $(\text{NH}_3)_3\text{Zn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)(\text{HCO}_3^-)$  amb els dos lligands aniònics en posicions equatorials. L'anàlisi energètica ha permès establir que la pèrdua del protó de l'aigua facilita molt la sortida del grup bicarbonat. Tots aquests resultats ens han portat a proposar la hipòtesi que la desprotonació de l'aigua en un complex pentacoordinat pot ésser prèvia a l'eliminació del bicarbonat. És interessant fer notar que en aquest procés de bescanvi hi juguen dos factors que es contraposen. Per una banda, la desprotonació de l'aigua és energèticament més costosa quan hi ha un bicarbonat coordinat al  $\text{Zn}^{+2}$ , però per una altra, l'eliminació del bicarbonat és més senzilla quan s'ha desprotonat l'aigua que es troba coordinada al  $\text{Zn}^{+2}$ . La inclusió de l'efecte del camp de reacció és clau per entendre el procés de bescanvi.

Per acabar, basant-nos en els resultats obtinguts voldríem fer una proposta de mecanisme catalític global de la CA. Segons aquesta, a través d'una transferència protònica fins a la His-64, es genera l'espècie activa  $\text{EZn}^{\text{II}}(\text{OH}^-)$ . Tot seguit, el  $\text{CO}_2$  s'aproxima al centre actiu, i forma un intermedi en el que l'atac nucleofílic del grup

$EZn^{II}(OH^-)$  al  $CO_2$  està ja quasi acabat. En aquest intermedi, el  $CO_2$  no es troba directament coordinat al metall, encara que sí que pot ésser considerat com un cinquè lligand distant. Tot seguit, la formació del  $HCO_3^-$  a partir d'aquest intermedi té lloc simultàniament a través de dues vies, com són les del mecanisme de Lipscomb i del mecanisme de Lindskog, amb barreres d'activació inferiors a 7 kcal/mol. El proper pas és la coordinació d'una molècula d'aigua al metall que dóna lloc a la formació d'un complex pentacoordinat *tp*. Tot seguit es perd un protó d'aquesta aigua que és acceptat molt probablement per la His-64. Finalment, s'allibera el  $HCO_3^-$ , i així es regenera l'espècie catalíticament activa  $EZn^{II}(OH^-)$ , que permet tornar a recomençar el cicle catalític.

