

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS



Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas

"Propiedades fisicoquímicas de Metaloproteínas,  
Sistemas Modelo y Ligandos de iones metálicos  
relevantes en Biología"

Lic. Vanina Gisela Franco

Director: Dr. Carlos Dante Brondino

Co-Director: Dr. Alberto Claudio Rizzi

Lugar de realización: Departamento de Física - FBCB

**-2016-**

---

"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la  
energía atómica: **la voluntad**".

Albert Einstein

1879-1955

Al Dr. Carlos Brondino, por haberme permitido realizar el Doctorado en Ciencias Biológicas bajo su dirección y brindado la posibilidad de pertenecer al Departamento de Física de FBCB.

Al Dr. Alberto Rizzi, por su co-dirección y sus aportes siempre precisos sobre mi trabajo.

A mis compañeros del Departamento de Física, quienes me capacitaron, orientaron y ayudaron en las tareas experimentales y de docencia a lo largo de estos años.

Al Dr. Juan Carlos López, que fuera mi tutor académico durante mi estancia en el Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) de la Universidad de Valladolid (Uva), España, donde realicé una parte de este trabajo de tesis.

Al Dr. José Luis Alonso, Director del GEM por su cordial trato durante mi estancia.

A mis compañeros de laboratorio del GEM, muy especialmente, ya que ellos me ayudaron en las cuestiones teóricas y prácticas durante la experimentación.

A la gente de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la FBCB, por apoyarme en este proceso.

A mi familia y amigos, de quienes he recibido una inmensa comprensión para iniciar y terminar esta etapa.

***“PICOLINIC AND ISONICOTINIC ACIDS: A FOURIER TRANSFORM MICROWAVE SPECTROSCOPY STUDY”.***

Peña, M.I.; Varela, M.; Franco, V.G.; López, J.C.; Cabezas, C.; Alonso, J.L. (2014) J. Phys. Chem. A, 118, 11373-11379.

***"SINGLE CRYSTAL EPR OF THE MIXED-LIGAND COMPLEX OF COPPER(II) WITH L-GLUTAMIC ACID AND 1,10-PHENANTHROLINE: A STUDY ON THE NARROWING OF THE HYPERFINE STRUCTURE BY EXCHANGE"***.

Neuman, N.I.; Franco, V.G.; Ferroni, F.; Baggio, R.; Passeggi, M.; Rizzi, A.C.; Brondino, C.D. (2012) J. Phys. Chem. A, 116, 12314-12320.

***“Determinación de Confórmeros en Fase Gas de Isómeros con Anillo Piridínico mediante Espectroscopia de Rotación con Ablación Laser en Jets Supersónicos”***

XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica de la Universidad Nacional de Rosario - AAIFQ.  
Rosario, Santa Fe – Argentina, Abril de 2013.

***“Estudios Estructurales y Espectroscópicos mediante EPR de complejos de Cobre (II) con Ácido Picolínico y Ácido Dipicolínico”***

VIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía  
Asociación Argentina de Cristalografía. Universidad Nacional del Litoral  
Santa Fe, Santa Fe - Argentina, Noviembre de 2012.

***“The Structure of Picolinic Acid Conformers in Gas Phase with CP-FTMW and LA-MB-FTMW”***

Workshop “Fronteras en Biociencia”  
Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina y la Sociedad Max Planck de Alemania. Polo Científico-Tecnológico  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires - Argentina, Abril de 2012.

---

***“APS Reductasa de Desulfovibrio desulfuricans”***

*“XVII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica”*

Universidad Nacional de Córdoba - AAIFQ.

Córdoba, Córdoba - Argentina, Mayo de 2011.

***“Purificación y Caracterización preliminar de ATP Sulfurilasa obtenida de Desulfovibrio desulfuricans”***

*“4to Workshop de Química BIOinorgánica”*

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.

Santa Fe, Santa Fe - Argentina, Marzo de 2010.

***“Estudios Estructurales y Espectroscópicos mediante EPR del Complejo (ác. l-glutámico) (1,10-fenantrolina) Cobre(II)”***

*“XVI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica”*

Universidad Nacional del Salta - AAIFQ.

Salta, Salta - Argentina, Mayo de 2009.

El estudio de sistemas biológicos se puede realizar a partir de dos enfoques opuestos y complementarios: el análisis del sistema completo o la evaluación de sus componentes aislados. Éste último permite explicar los fenómenos que ocurren cuando las unidades que forman parte del mismo interactúan. En el presente trabajo de tesis se han utilizado espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica y espectroscopia de rotación para el estudio de enzimas involucradas en el ciclo del azufre y obtenidas de la bacteria sulfato-reductora *Desulfovibrio desulfuricans* desde los dos enfoques mencionados anteriormente. En la reducción de sulfato a sulfito, intervienen *ATP sulfurilasa* y *APS reductasa* presentando ambas metaloenzimas centros paramagnéticos en su estructura. Mediante la técnica de resonancia paramagnética electrónica en fase condensada, se caracterizaron estructural y magnéticamente estas dos metaloproteínas y el sistema modelo de cobre [Cu(glu)phen]. siendo glu = ácido L-glutámico y phen = 1,10-fenantrolina. Se determinaron el rol del metal en la estructura y las propiedades magnéticas de *ATP sulfurilasa*; las interacciones de los sitios paramagnéticos durante el proceso de transferencia electrónica en *APS reductasa* y los caminos químicos e interacciones magnéticas de sitios metálicos en presencia de los ligandos orgánicos, glu y phen en el complejo de cobre [Cu(glu)phen]. En fase gas se caracterizaron dos ligandos de interés biológico: ácido picolínico y nicotinamida, mediante espectroscopia de rotación siendo las muestras sólidas previamente ablacionadas e inyectadas en un jet supersónico. Ambas moléculas presentan un anillo piridínico lo que ofrece posibilidades conformacionales para la formación de complejos con metales de transición y posibilita interacciones puente hidrógeno e hidrofóbicas, típicas de las que aparecen en metaloproteínas. De cada uno de los ligandos, se determinaron los conformeros teóricos y experimentales y se caracterizaron mediante parámetros propios de la espectroscopia rotacional. Se compararon las estructuras cristalinas de los ligandos (fase condensada) con sus conformeros en fase gas, lo que permitió el análisis de la configuración más estable para generar caminos químicos entre centros metálicos presentes en metaloproteínas.

The study of biological systems can be carried out from two opposite and complementary approaches: the complete system analysis or the evaluation of its individual components. The latter explains the phenomena that occur when units that are part of it interact. In this thesis we have used electron paramagnetic resonance spectroscopy and rotation spectroscopy for the study from these two approaches in enzymes involved in the sulfur cycle, obtained from the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans*. In the reduction of sulfate to sulfide, the metalloenzymes *ATP sulfurylase* and *APS reductase* are involved, both have paramagnetic centers. By the technique of electron paramagnetic resonance in condensed phase, these two structurally and magnetically metalloproteins and a copper model system were characterized. The role of the metal in the structure and the magnetic properties of *ATP sulfurylase*, interactions of paramagnetic sites in the electron transfer process in *APS reductase* and the chemical pathways and interactions between magnetic metal sites in the presence of the organic ligands, L-glutamic acid and 1,10-phenanthroline in the copper complex [Cu(glu)phen] were determined. In gas phase two ligands of biological relevance (picolinic acid and nicotinamide) are characterized. The solid molecules being previously ablated and injected into a supersonic jet. Both molecules have a pyridinic ring, which provides conformational possibilities for the formation of transition metal complexes analogous presenting hydrogen bonds and hydrophobic interactions to active sites of proteins. For each ligand, the theoretical and experimental conformers were determined and characterized by spectroscopic parameters specific to it the rotational spectroscopy. The crystal structures of the ligands in condensed phase were compared to the conformers in gas phase, allowed the analysis of the more stable configuration to generate chemical pathways between metal centers present in metalloproteins.

$\gamma$	Relación giromagnética
$\Delta B$	Ancho de línea de resonancia
$\chi_{ii}$	Constante de acoplamiento de cuadrupolo nuclear
$\kappa$	Parámetro de Ray
$\mu$	Momento magnético
$\mu_B$	Magnetón de Bhör
$\nu$	Número de onda
am	ammonium molybdate
$A$	Constante de rotación
$\mathbf{A}$	Tensor de interacción hiperfina
AFC	Automatic Frequency Controller
APS	Adenosine-5'-Phosphosulphate
APSr	APS reductasa
As	Arsénico
ATP	Adenosine Triphosphate
ATPs	ATP sulfurilasa
$B$	Campo Magnético
$B$	Constante de rotación
BRS	Bacterias Sulfato Reductoras
$C$	Constante de rotación
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de Calcio dihidratado
CP	Chirped Pulse
<i>Dd</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>Dd</i> APSr	APS reductasa de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>Dd</i> ATPs	ATP sulfurilasa de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
Dsr	Dissimilatory sulphite reductase
ENDO III	Endonucleasa III
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
$eQ$	Momento de cuadrupolo nuclear
$F$	Número cuántico
$\text{FeSO}_4$	Sulfato Ferroso
FTMW	Fourier Transform Micro Wave
Fur	Ferric uptake regulator
$g$	Constante característica de sistema paramagnético: Factor $g$
$\mathbf{g}$	Tensor $g$
glu	Ácido L-glutámico
$h$	Constante de Planck
IRE-BP	Iron Responsive Element - Binding Protein
$I$	Intensidad de la señal de EPR
$\mathbf{I}$	Momento de inercia



---

<i>I</i>	Espín nuclear
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Parámetro de intercambio
<i>k<sub>cat</sub></i>	Constante catalítica
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato monoácido de Potasio
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis-Menten
<i>L</i>	Momento angular de rotación
LA	LASER Ablation
MB	Molecular Beam
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Sulfato de Magnesio heptahidratado
MG	Malachite Green
<i>m<sub>s</sub></i>	Proyección del número cuántico de espín
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de Sodio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de Amonio
phen	1,10-fenantrolina
PAPS	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate
Pi	Fosfato inorgánico
<i>p<sub>i</sub></i>	Componente del momento dipolar eléctrico
PPasa	Pirofosfatasa alcalina
PPi	Pirofosfato
<b>q<sub>ii</sub></b>	Gradiente de campo eléctrico
S	Azufre
<i>S</i>	Espín electrónico
S <sup>2-</sup>	Sulfuro
SH <sub>2</sub>	Sulfuro de Hidrógeno
SO	Sulfito Oxidasa
SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Sulfito
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfato
S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Tiosulfato
S <sub>8</sub>	Azufre elemental
SOR	Sulfuro Oxigenasa Reductasa
Sox	Sulfuro Oxidasa
<i>T<sub>1</sub></i>	Tiempo de relajación espín-red
<i>T<sub>2</sub></i>	Tiempo de relajación espín-espín
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
<i>V<sub>m</sub></i>	Velocidad máxima de reacción
ZFS	Zero-Field Splitting
Zn	Zinc

---

---

## Índice

<i>Agradecimientos</i>	<i>iii</i>
<i>Publicaciones y Exposiciones</i>	<i>iv</i>
<i>Resumen</i>	<i>vi</i>
<i>Summary</i>	<i>vii</i>
<i>Abreviaturas y símbolos</i>	<i>viii</i>
<b>Capítulo I</b>	<b>1</b>
I. Introducción General	2
I.1 Rol de los metales de transición en los ciclos biogeoquímicos:	2
I.2 Enfoques para el estudio de metales de transición en sistemas “in vivo”	4
I.3 Metalobiomoléculas	5
I.4 Sistemas Modelo	7
I.5 Ligandos de iones metálicos	8
I.6 Organización general del manuscrito	9
<b>Capítulo II</b>	<b>11</b>
II. Objetivos	12
II.1 Objetivo general	12
II.2 Objetivos específicos	12
<b>Capítulo III</b>	<b>14</b>
III. Espectroscopias	15
III.1 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica	16
III.1.1 Fenómeno de resonancia paramagnética electrónica: el factor g	16
III.1.2 Interacción hiperfina	18
III.1.3 Anisotropía del factor g y de la constante de acoplamiento hiperfino A	21
III.1.4 Procesos de relajación	24
III.1.5 Espectrómetro y mediciones	26
III.1.6 Estudios de saturación	29

III.2 Espectroscopia de rotación	31
III.2.1 Modelo del rotor rígido	31
III.2.2 Clasificación de moléculas en rotores	33
III.2.3 Caracterización de rotores	35
III.2.3.1 Determinación de la estructura	36
III.2.3.2 Dinámica molecular interna	36
III.2.3.3 Relajación entre conformeros	36
III.2.3.4 Distribución de población entre conformeros	37
III.2.4 Espectrómetro y mediciones	37
III.2.4.1 Descripción del espectrómetro	38
III.2.4.2 Funcionamiento del equipo	39
III.2.4.3 Diferentes configuraciones del espectrómetro	42
III.2.4.3.1 Espectrómetro LA-MB-FTMW	42
III.2.4.3.2 Espectrómetro CP-FTMW	45
<b>Capítulo IV</b>	<b>48</b>
IV. Metaloproteínas	49
IV.1 Introducción	49
IV.1.1 Aspectos generales de metaloenzimas	49
IV.1.2 Ciclo biogeoquímico del Azufre	50
IV.1.3 ATP sulfurilasa y APS reductasa	55
IV.2 Aislamiento de <i>DdATPs</i> y <i>DdAPSr</i>	55
IV.2.1 Microorganismo	55
IV.2.2 Purificación de las enzimas	56
IV.3 ATP sulfurilasa	59
IV.3.1 Clasificación de la enzima	59
IV.3.2 Comparación de <i>DdATPs</i> con ATPs de diferentes organismos	60
IV.3.3 Propiedades moleculares	64
IV.3.3.1 Masa molecular	64
IV.3.3.2 Cuantificación de metales	64
IV.3.3.3 Caracterización cinética de <i>DdATPs</i>	65
IV.3.3.3.1 Fundamento	65
IV.3.3.3.2 Cinética enzimática	66
IV.3.3.4 Caracterización espectroscópica mediante UV-vis	68
IV.3.3.5 Caracterización espectroscópica mediante EPR	69
IV.3.3.5.1 Estructura electrónica del ión Co (II) en configuración de alto espín	69
IV.3.3.5.2 Espectros de EPR	73
IV.3.3.5.3 Determinación del ZFS	75
IV.4 APS reductasa	78
IV.4.1 Clasificación de la enzima	78
IV.4.2 Características de APSr desasimilatorias de diferentes especies de <i>Desulfovibrio</i>	79
IV.4.3 Propiedades moleculares de APSr desasimilatoria	81
IV.4.4 Mecanismo cinético	83
IV.4.5. Caracterización espectroscópica mediante UV-vis	86
IV.4.6 Caracterización espectroscópica mediante EPR	87
IV.4.6.1 Centros paramagnéticos	87
IV.4.6.2 Acoplamiento magnético	89

---

<b>Capítulo V</b>	<b>94</b>
V. Modelado en Metaloproteínas	95
V.1 Introducción	95
V.2 Fase condensada: Sistema modelo	96
V.2.1 Cu(glu)phen: Sistema modelo del camino químico FAD-FeS I	96
V.2.2. Síntesis y cristalización del complejo	97
V.2.3 Difracción de Rayos X de polvo	98
V.2.4 Análisis Elemental	99
V.2.5 Difracción de Rayos X de monocristal	100
V.2.6 Descripción de la estructura	102
V.2.7 Mediciones de EPR en polvo	105
V.2.8. Mediciones de EPR en monocristal	106
V.2.9 Análisis magneto estructural	109
V.2.9.1 Hamiltoniano de espín y Tensor $g$ molecular del ión Cu(II)	109
V.2.9.2 Frecuencia de intercambio y su influencia en la estructura hiperfina	112
V.2.9.3 Interacción de intercambio y caminos de superintercambio	115
V.3 Fase gas: Ligandos de Iones Metálicos	116
V.3.1 Ligandos caracterizados	116
V.3.2 Estrategia general de caracterización	118
V.3.2.1 Cálculos teóricos y predicciones	119
V.3.2.2 Desarrollo Experimental	123
V.3.3 Ácido Picolínico	126
V.3.4. Nicotinamida	135
<b>Capítulo VI</b>	<b>142</b>
VI. Conclusiones	143
<b>Anexo I</b>	<b>147</b>
<b>Anexo II</b>	<b>152</b>
<b>Anexo III</b>	<b>159</b>
<b>Anexo IV</b>	<b>166</b>
<b>Anexo V</b>	<b>173</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>181</b>



# *Capítulo I*

---

# I. INTRODUCCIÓN GENERAL

## I.1 Rol de los metales de transición en los ciclos biogeoquímicos

De los 115 elementos que componen la tabla periódica, 28 de ellos son esenciales para los organismos (identificados con círculos en la figura I.1). Los elementos químicos biológicamente esenciales pueden dividirse en mayoritarios y en elementos traza. Los mayoritarios o macronutrientes (figura I.1, en violeta) son: C, H, O, N, P, S, Na, K, Mg y Ca. Éstos se encuentran formando parte de las estructuras básicas de todas las células. Los elementos definidos como micronutrientes o elementos traza (figura I.1, en azul) son: Zn, Mn, Cr, Co, Fe, Mo, W, V, Ni, Cu, B, Si, As, Se, F, Cl, Br e I. Éstos últimos, juegan un rol fundamental al formar parte de estructuras moleculares o catalizar bioreacciones (Fraústo da Silva y Williams, 2001).

1	2											13	14	15	16	17	18																																																												
H hidrógeno 1.008	He helio 4.003											B boro 10.81	C carbono 12.01	N nitrógeno 14.01	O oxígeno 16.00	F flúor 19.00	Ne neón 20.18																																																												
3	4											13	14	15	16	17	18																																																												
Li litio 6.941	Be berilio 9.012											Al aluminio 26.98	Si silicio 28.09	P fósforo 30.97	S azufre 32.06	Cl cloro 35.45	Ar argón 39.95																																																												
11	12	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36																																																												
Na sodio 22.99	Mg magnesio 24.31	Sc escandio 44.96	Ti titanio 47.87	V vanadio 50.94	Cr cromo 52.00	Mn manganeso 54.94	Fe hierro 55.85	Co cobalto 58.93	Ni níquel 58.69	Cu cobre 63.55	Zn zinc 65.38	Ga galio 69.72	Ge germanio 72.64	As arsénico 74.92	Se selenio 78.96	Br bromo 79.90	Kr kriptón 83.80																																																												
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54																																																												
Rb rubidio 85.47	Sr estroncio 87.62	Y itrio 88.91	Zr zirconio 91.22	Nb niobio 92.91	Mo molibdeno 95.94	Tc tecnecio 98.91	Ru rutenio 101.1	Rh rodio 101.07	Pd paladio 106.36	Ag plata 107.87	Cd cadmio 112.41	In indio 114.82	Sn estaño 118.71	Sb antimonio 121.76	Te telurio 127.6	I yodo 126.91	Xe xenón 131.3																																																												
55	56	57-71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86																																																												
Cs cesio 132.9	Ba bario 137.3	lanfánidos	Hf hafnio 178.5	Ta tantalio 180.9	W wolframio 183.84	Re renio 186.21	Os osmio 190.23	Ir iridio 192.22	Pt platino 195.08	Au oro 196.97	Hg mercurio 200.59	Tl talio 204.38	Pb plomo 207.2	Bi bismuto 208.98	Po polonio	At astatino	Rn radón																																																												
87	88	89-103	104	105	106	107	108	109	110	111	112			114	116																																																														
Fr francio	Ra radio	actínidos	Rf rutherfordio	Db dubnio	Sg seaborgio	Bh bohrio	Hs hasio	Mt meibomio	Ds darmstadtio	Rg roentgenio	Cn copernicio			Fl flerovio	Lv livermorio																																																														
<table border="1"> <tbody> <tr> <td>57</td> <td>58</td> <td>59</td> <td>60</td> <td>61</td> <td>62</td> <td>63</td> <td>64</td> <td>65</td> <td>66</td> <td>67</td> <td>68</td> <td>69</td> <td>70</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>La lantano 138.9</td> <td>Ce cerio 140.1</td> <td>Pr praseodimio 140.9</td> <td>Nd neodimio 144.2</td> <td>Pm prometio</td> <td>Sm samario 150.4</td> <td>Eu europio 151.9</td> <td>Gd gadolinio 157.3</td> <td>Tb terbio 158.9</td> <td>Dy dysprosio 162.5</td> <td>Ho holmio 164.9</td> <td>Er erbio 167.3</td> <td>Tm tulio 168.9</td> <td>Yb ytterbio 173.1</td> <td>Lu lutecio 175.0</td> </tr> <tr> <td>88</td> <td>90</td> <td>91</td> <td>92</td> <td>93</td> <td>94</td> <td>95</td> <td>96</td> <td>97</td> <td>98</td> <td>99</td> <td>100</td> <td>101</td> <td>102</td> <td>103</td> </tr> <tr> <td>Ac actinio</td> <td>Th torio 232.0</td> <td>Pa protactinio 231.0</td> <td>U uranio 238.0</td> <td>Np neptunio</td> <td>Pu plutonio</td> <td>Am americio</td> <td>Cm curcio</td> <td>Bk berkelio</td> <td>Cf californio</td> <td>Es einsteinio</td> <td>Fm fermio</td> <td>Md mendelivio</td> <td>No nobelio</td> <td>Lr lawrencio</td> </tr> </tbody> </table>																		57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	La lantano 138.9	Ce cerio 140.1	Pr praseodimio 140.9	Nd neodimio 144.2	Pm prometio	Sm samario 150.4	Eu europio 151.9	Gd gadolinio 157.3	Tb terbio 158.9	Dy dysprosio 162.5	Ho holmio 164.9	Er erbio 167.3	Tm tulio 168.9	Yb ytterbio 173.1	Lu lutecio 175.0	88	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	Ac actinio	Th torio 232.0	Pa protactinio 231.0	U uranio 238.0	Np neptunio	Pu plutonio	Am americio	Cm curcio	Bk berkelio	Cf californio	Es einsteinio	Fm fermio	Md mendelivio	No nobelio	Lr lawrencio
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71																																																															
La lantano 138.9	Ce cerio 140.1	Pr praseodimio 140.9	Nd neodimio 144.2	Pm prometio	Sm samario 150.4	Eu europio 151.9	Gd gadolinio 157.3	Tb terbio 158.9	Dy dysprosio 162.5	Ho holmio 164.9	Er erbio 167.3	Tm tulio 168.9	Yb ytterbio 173.1	Lu lutecio 175.0																																																															
88	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103																																																															
Ac actinio	Th torio 232.0	Pa protactinio 231.0	U uranio 238.0	Np neptunio	Pu plutonio	Am americio	Cm curcio	Bk berkelio	Cf californio	Es einsteinio	Fm fermio	Md mendelivio	No nobelio	Lr lawrencio																																																															

**Figura I.1.** Tabla periódica de los elementos. Elementos esenciales para la vida: se diferencian en elementos mayoritarios o macronutrientes (violeta) y elementos traza o micronutrientes (azul) (modificado de IUPAC, 2013).

Dado que los elementos químicos presentes en la biosfera tienen una cantidad y disponibilidad limitadas, su reciclaje es un punto clave para el mantenimiento de la vida en el planeta. Éstos y sus compuestos, son reciclados continuamente través de los componentes bióticos y abióticos del medio y convertidos en formas disponibles

mediante una combinación de procesos biológicos, geológicos y químicos que reciben el nombre genérico de ciclos biogeoquímicos (Botkin y Keller, 2011). Los ciclos biogeoquímicos son vías para el transporte y la transformación de la materia dentro de las cuatro áreas que componen el planeta Tierra (biósfera, la hidrósfera, la litósfera y la atmósfera). Ejemplos de estos ciclos son el ciclo del nitrógeno (Galloway y col., 2004), el del azufre (Klotz y col., 2011), el del carbono (Schimel, 1995) y el del fósforo (Filippelli, 2009), por citar algunos de los más importantes. En estos ciclos son necesarias transformaciones físicas -tales como disolución, precipitación, volatilización y fijación- así como también transformaciones químicas -tales como biosíntesis, biodegradación y reacciones rédox-. Todos ellos se encuentran interconectados favoreciendo una recirculación constante. En función del medio físico en que se produce el transporte del elemento, se clasifican en gaseoso, sedimentario e hidrológico. En el ciclo gaseoso los nutrientes circulan entre la atmósfera y los organismos; los compuestos que circulan contienen en su estructura carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre. El ciclo sedimentario comprende la meteorización de roca existente seguida de su erosión, transporte y sedimentación. El ciclo hidrológico describe el proceso de circulación del agua que se traslada de un lugar a otro y cambia de estado de agregación

Una parte importante de estos ciclos se realiza a través de bacterias (Falkowski y col., 2008; Rousk y Bengston, 2014), más específicamente a través de enzimas presentes en las bacterias que contienen metales de transición en su estructura. La presencia de metales de transición como constituyentes funcionales y estructurales de organismos vivientes puede ser explicada teniendo en cuenta que la vida se originó en los océanos, a partir de diferentes procesos en los cuales reacciones catalizadas por metales de transición jugaron un papel preponderante. Estos organismos simulaban el medio oceánico rodeando sus células de fluidos intersticiales y abasteciéndolas a través de redes de vasos y canales. Todo esto está de acuerdo con las muy similares relaciones de concentración que presentan diversos elementos en los sistemas biológicos y en las aguas de mar. Durante la evolución, la disponibilidad relativa de estos elementos en balances generales ha ido cambiando desde las etapas donde sólo había microorganismos anaeróbicos hacia la instauración de un medio predominantemente aeróbico (Fraústo da Silva y Williams, 2001).

Los metales de transición han permitido la adaptación de los microorganismos y formas de vida superiores a los distintos ambientes de la Tierra, cumpliendo funciones en el transporte de gases en mecanismos de respiración (aeróbica y anaeróbica), en la

transferencia electrónica mediante la constitución de cofactores metálicos rédox en estructuras celulares y en catálisis enzimática (Atkins y col., 2006). Los mismos son habitualmente encontrados como constituyentes naturales en distintos tipos de moléculas, ya sea cumpliendo roles estructurales, formando parte de una cadena de transferencia electrónica, siendo parte esencial del sitio activo de enzimas, o simplemente acomplejados para su transporte y/o almacenamiento.

## **I.2 Enfoques para el estudio de metales de transición en sistemas “in vivo”**

Debido a que los metales de transición son esenciales para el desarrollo de la vida sobre la Tierra, se realizan importantes esfuerzos en investigación para poder entender cómo estos elementos químicos recirculan en los ciclos biogeoquímicos y para dilucidar sus mecanismos de incorporación en los organismos, además de establecer su estructura y función en las metalobiomoléculas de las que forman parte. El estudio de estas problemáticas ha sido abordado desde distintas ramas de la ciencia, por lo que a estas investigaciones se las encuadra bajo distintas disciplinas científicas. En particular, este área del conocimiento ha sido definido por los químicos como Química Bioinorgánica (Lippard y Berg, 1994), por los bioquímicos como Bioquímica Inorgánica (Crichton, 2008) y por los físicos y fisiólogos como Biofísica (Phillips y Quake, 2006) constituyendo en resumen un campo de investigación multidisciplinario con aportes de la mayoría de las disciplinas base en las cuales normalmente se dividen las Ciencias Exactas y Naturales.

Una parte importante de esta área de investigación multidisciplinaria está orientada al estudio de sistemas de interés biológico que presentan iones metálicos de transición en su estructura, por lo que se las denomina metalobiomoléculas las cuales incluyen metaloproteínas y sistemas miméticos. En el caso de las metaloproteínas, los estudios se realizan a partir de moléculas aisladas del organismo nativo o producidas heterológamente en sistemas de expresión como *E. coli*, que es uno de los organismos más ampliamente utilizados para la expresión y producción de proteínas recombinantes (Baneyx, 1999).

La caracterización de estas estructuras se realiza a partir de los sistemas obtenidos de los organismos que las expresan o de manera recombinante. Si bien esta parecería ser a priori, la estrategia más lógica para este tipo de estudios, en muchos casos debido a la complejidad de los sistemas que se investigan, se recurre al estudio y



caracterización de compuestos inorgánicos más simples que modelen aspectos específicos del sitio metálico y también de los ligandos en forma aislada, que interaccionan con el ion metálico. Estos se denominan específicamente sistemas biomiméticos (Vincent y col., 2006).

Dado que en el presente trabajo de tesis se estudiaron tres tipos de sistemas (metaloproteínas, sistemas modelo y ligandos de iones metálicos) en las siguientes secciones de este capítulo se presentarán paulatinamente los sistemas particulares que se investigaron y las metodologías experimentales utilizadas.

### **I.3 Metalobiomoléculas**

Las biomoléculas que contienen metales de transición en su estructura, metalobiomoléculas, pueden ser diferenciadas en dos grandes grupos: Proteicas y no proteicas (tabla I.1). Las moléculas proteicas incluyen enzimas, proteínas de transporte y almacenamiento y proteínas utilizadas en la cascada de transducción de señales. Las moléculas no proteicas están implicadas en el transporte de metales y tienen funciones estructurales y anabólicas (Lipparg y Berg, 1994).

La naturaleza ha logrado la selectividad para realizar ciertas funciones específicas incorporando en proteínas iones metálicos que poseen tamaños y preferencias estereoquímicas o potenciales de reducción apropiados. Así, las diversas formas de vida han desarrollado mecanismos de transporte para incorporar, almacenar y regular las concentraciones y disponibilidad de los diferentes metales de transición y han sabido aprovechar las propiedades químicas de cada uno de estos elementos para adaptarse a las condiciones de un medio cambiante y en constante evolución (Fráusto da Silva y Williams, 2001).

Dentro de las metaloproteínas, las metaloenzimas constituyen un grupo importante debido a que son los catalizadores biológicos con los que cuentan los organismos para el funcionamiento metabólico. Las metaloenzimas efectúan una variedad de transformaciones químicas importantes, que frecuentemente involucran moléculas pequeñas como sustratos o productos así como oxígeno, hidrógeno, nitrógeno y agua. Para cumplir esta función, utilizan una diversidad de arreglos de iones, centros metálicos y/o moléculas orgánicas no proteicas que forman parte de sus sitios activos (Nelson y Cox, 2001). Es importante notar que estos sitios activos son muy similares en ciertas enzimas que catalizan reacciones muy distintas ya que los sistemas biológicos

usan estructuras básicas recurrentes que han sido modificadas o mejoradas para propósitos específicos (Karlin, 1993; Brondino y col., 2006a). Las respuestas a interrogantes tales como estructura y función de éstos sistemas, no pueden ser respondidos sólo con la aplicación de una técnica en particular, de allí el carácter multidisciplinario del tema. En el caso particular de esta tesis se utilizaron métodos de Microbiología para obtener el microorganismo que expresa las proteínas, técnicas cinéticas para caracterizar la reacción enzimática y técnicas espectroscópicas para caracterizar los sitios metálicos.

**Tabla I.1.** Clasificación de biomoléculas que contienen iones metálicos. Se divide en dos grandes grupos, proteicas y no proteicas; y éstos se subdividen de acuerdo a la función que cumple la molécula en su medio natural. En la parte superior se indica cual es el metal preponderante que las compone y en la parte inferior se indica con números otros metales presentes en las biomoléculas.

METALOBIMOLÉCULAS					
Función	Fe	Cu	Mg	Co	Zn
<b>Moléculas Proteicas</b>					
Transporte y Almacenamiento	Portadores de electrones	Citocromo <i>c</i> y P-450	Azules		
	Almacenamiento Estructurales	Ferritina Transferrina	Ceruloplasmina		Metalo-tioneína <sup>(1)</sup>
	Enlace de Oxígeno	Mioglobina Hemoglobina Hemeritrina	Hemocianina		
Transducción de señales	Sensores metálicos y conmutación	IRE-BP Fur	Calmodulina	MerR	
	Enzimas	Hidrolasas		Fosfatasas <sup>(2)</sup>	Amino-peptidasas <sup>(3)</sup>
Oxido-reductasas		Oxigenasas Hidrogenasas Nitrogenasas <sup>(4)</sup>	Oxidasas <sup>(5)</sup> Reductasas <sup>(5)</sup> Hidroxilasas <sup>(5)</sup> Superóxido dismutasas <sup>(6)</sup>		
Isomerasas y Sintetas		Aconitasa ENDO III			Vitamina B12 Coenzimas
<b>Moléculas no Proteicas</b>					
	Almacenamiento y transporte de iones metálicos	Sideróforos			
	Fotoredox		Clorofilas		

(1) Cd  
(2) Mg, Zn  
(3) Mn

(4) Mo  
(5) Mo y Fe  
(6) Mo y Zn

#### **I.4 Sistemas modelo**

Dentro del estudio de los iones metálicos de transición incorporados en la estructura de proteínas para el cumplimiento de la función biológica, es muy usual complementarlo con el de sistemas sintéticos que biomimeten distintos aspectos de la metalobiomolécula tales como la estructura del sitio activo metálico, la función y los caminos de transferencia electrónica. Dado que el comportamiento de un ión metálico ligado a una proteína no puede ser en esencia separado de los aspectos químicos fundamentales asociados a ese metal en particular, el estudio de moléculas pequeñas, análogos sintéticos de sitios activos, es sumamente útil e importante para avanzar no solo en la comprensión de aspectos estructurales de éstos sistemas, sino también en la clarificación de sus aspectos mecanísticos. Estos complejos han sido denominados sistemas modelo (Lippard y Berg, 1994).

El estudio de análogos sintéticos a través de métodos estructurales y espectroscópicos permite lograr, en pasos sucesivos, una aproximación a un conocimiento detallado de las características del sistema natural, usualmente mucho más complejo de investigar. El objetivo final no es necesariamente la duplicación de propiedades naturales, sino aumentar el conocimiento en torno a cuestiones específicas vinculadas a aspectos y propiedades estructurales, electrónicas, espectroscópicas, magnéticas y mecanísticas de los sistemas biológicos.

Los sistemas modelo pueden ser utilizados para estudiar en forma sistemática problemas tales como efectos producidos por variaciones en las geometrías de coordinación, cambios de ligandos y reactividad química. Por otro lado y dado que la estructura de la primera esfera de coordinación es la que más marcadamente influye sobre el comportamiento espectroscópico del centro metálico, los estudios espectroscópicos de sistemas modelo son aproximaciones valiosas para identificar y caracterizar centros similares presentes en sistemas naturales, todavía no bien definidos.

El estudio de sistemas modelo requiere evidentemente de la síntesis del sistema modelo y su caracterización estructural, preferentemente por difracción de rayos X. Un aspecto importante del estudio de sistemas modelo que contienen metales de transición paramagnéticos es su caracterización magnética, ya que muchas de las interacciones presentes en estos sistemas también aparecen en sistemas más complejos como son las metaloproteínas. Debido a que estos complejos contienen electrones desapareados en su estructura, la técnica de Resonancia Paramagnética Electrónica (Electron Paramagnetic

Resonance, EPR) es de elección, dada su capacidad para evaluar propiedades electrónicas de centros paramagnéticos e interacciones débiles entre ellos. Es por ello que, en el presente trabajo de tesis, esta es una de las técnicas espectroscópicas utilizada para caracterizar metalobiomoléculas y sistemas modelo en fase condensada.

### **I.5 Ligandos de iones metálicos**

La caracterización de ligandos realizada en este trabajo de tesis, se fundamenta en que el sitio activo de una de las enzimas estudiadas, APS reductasa, es un cofactor orgánico del tipo cíclico y forma parte del camino de transferencia electrónica de la proteína. Éste podría actuar como potencial coordinador de los metales de transición en sistemas modelo y en metaloproteínas se encuentra formando parte de complejos metálicos en los que intervienen distintos tipos de ligandos. En Química de coordinación, un ligando es una base de Lewis (Whitten y col., 1996) y puede ser desde una molécula orgánica relativamente compleja, como por ejemplo el ligando porfirina de las hemoproteínas hasta una simple molécula de agua (Lippard y Berg, 1994). Los átomos donadores de los ligandos son aquellos que ceden pares de electrones a los metales, mientras que los iones metálicos pueden tratarse como ácidos de Lewis, formando enlaces covalentes coordinados en compuestos de coordinación (Whitten y col., 1996).

El estudio de la conformación y la estructura de ligandos de interés biológico como ser aminoácidos y vitaminas se ha realizado con una gran variedad de técnicas experimentales como espectrometría de masas, difracción de rayos X, difracción de neutrones, difracción electrónica, espectroscopia de RMN, espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia electrónica y métodos teóricos (principalmente cálculos *ab initio*). Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios estructurales se han centrado en fases condensadas, tanto en cristales como en disolución, donde las moléculas presentan un gran número de interacciones. El estudio individual de la forma neutra de moléculas biológicas aisladas sólo es posible en fase gas, siendo este un medio apropiado para entender qué propiedades son intrínsecas de los bloques constructores de la vida o cuales son impuestas por el medio, por el disolvente o por interacciones con moléculas vecinas y así inferir propiedades ligadas a la relación estructura-función (Levy y Corey, 1941).

Sin embargo, el estudio de biomoléculas en fase gas presenta serios problemas experimentales ya que, por ejemplo, los aminoácidos tienen elevados puntos de fusión (250-300°C) lo que implica una muy baja volatilidad. La solución convencional ha consistido en vaporizarlos empleando altas temperaturas. Sin embargo, estas sustancias son inestables térmicamente por lo que no pueden calentarse sin provocar a la vez su descomposición (Suenram y col., 1988).

Un aspecto importante del estudio de moléculas relevantes en sistemas biológicos es su flexibilidad estructural. En general, poseen un gran número de posibles conformaciones debido a la rotación alrededor de los enlaces N-C<sub>α</sub>, C<sub>α</sub>-C y C-O. El elevado número de grados de libertad de torsión produce una superficie de energía potencial con muchos mínimos locales, pudiendo estar la población total repartida entre varios conformeros. Por lo tanto, la investigación de la estructura de biomoléculas y sus precursores plantea la dificultad de identificar y obtener las estructuras individuales de todos los posibles conformeros poblados en fase gas a la vez que permite la identificación fehaciente de los rotámeros y su proporción. Esto conlleva a la dilucidación de las estructuras más complejas que adoptan en fase condensada y explica sus propiedades moleculares (Lehn, 1988).

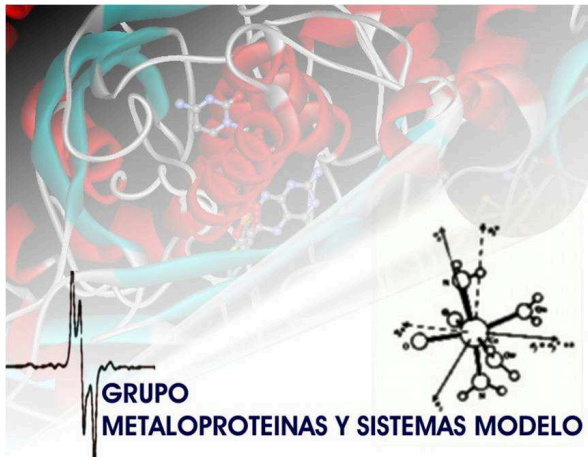
## **I.6 Organización general del manuscrito**

En el presente trabajo de tesis se realizó un estudio multidisciplinario en el que se utilizaron los distintos enfoques descritos anteriormente, con el objeto de caracterizar las dos primeras enzimas involucradas en el ciclo del azufre por la vía desasimilativa.

Con este fin, se estudiaron las metaloenzimas obtenidas de la bacteria sulfatoreductora *Desulfovibio desulfuricans*: ATP sulfurilasa (*DdATPs*, *Adenosine TriPhosphate sulfurilase*) y APS reductasa (*DdAPSr*, *Adenosine 5'-PhosphoSulfate reductase*). Los interrogantes en relación a las cadenas de transferencia electrónica de la metaloenzima oxidoreductasa, en la que están involucrados ligandos no proteicos derivó en la caracterización de un sistema modelo y dos ligandos de relevancia biológica. Se caracterizó un sistema modelo de cobre Cu(glu)phen y los ligandos de iones metálicos ácido picolínico y nicotinamida. Los estudios en fase condensada se realizaron principalmente por Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica y los

realizados en fase gas mediante Espectroscopia de Rotación. Se utilizaron otras técnicas adicionales como espectroscopia UV-vis, ensayos cinéticos, etc.

El manuscrito se encuentra organizado de la siguiente manera: El **capítulo I**, consiste en una introducción general a los tópicos estudiados; el **capítulo II**, expone los objetivos generales y específicos; el **capítulo III**, describe el fundamento teórico de las dos técnicas espectroscópicas más importantes empleadas; en el **capítulo IV**, se reportan los resultados obtenidos para las metaloenzimas bacterianas; el **capítulo V** reporta los resultados correspondientes al sistema modelo de cobre en fase condensada y de los ligandos de iones metálicos en fase gas. Tanto en el capítulo IV como V, se realizan el análisis y la discusión de los resultados obtenidos. Finalmente el **capítulo VI** contiene las conclusiones del trabajo. Las tablas y figuras se enumeran por capítulos y de forma correlativa. La **bibliografía** se encuentra al final, precedida por los **anexos** donde se encuentra toda la información complementaria.



## *Capítulo II*

---

## II. OBJETIVOS

### II.1 Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es contribuir al conocimiento de metaloproteínas que intervienen en el ciclo biogeoquímico del azufre, caracterizando las dos enzimas que inician la recirculación de sulfato. El estudio de éstas metaloenzimas se complementó con la caracterización de un sistema modelo que contiene centros paramagnéticos en su estructura en fase condensada, conectados por caminos químicos típicos de metaloproteínas y de ligandos de relevancia biológica de iones metálicos en fase gas.

### II.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos que se definieron son:

- i) Caracterización fisicoquímica de las enzimas ATP sulfurilasa (*DdATPs*) y APS reductasa (*DdAPSr*) involucradas en el ciclo del azufre obtenidas del organismo reductor de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans*.  
Este trabajo implica:
  - a) La purificación a grado electroforético y la caracterización molecular de las dos enzimas.
  - b) La caracterización cinética de la *DdATPs*.
  - c) La determinación de las propiedades electrónicas del ion Co (II) presente en *DdATPs*.
  - d) La caracterización de la cadena de transferencia electrónica de *DdAPSr* mediante el análisis de los acoplamientos magnéticos entre centros rédox de la metaloenzima.
- ii) Síntesis, caracterización estructural y magnética mediante EPR del complejo mixto del ión Cu (II) con ácido L-glutámico y 1,10-fenantrolina [Cu(glu)phen].



- iii) Evaluación de las conformaciones adoptadas en fase gas de los ligandos ácido picolínico y nicotinamida para determinar los conformeros más estable de cada molécula.

La concreción de los objetivos específicos implicó la utilización de técnicas experimentales muy variadas correspondientes a campos disciplinarios que van desde la bioquímica de proteínas hasta la fisicoquímica del estado sólido. En particular, hay dos técnicas espectroscópicas que son centrales en este trabajo de tesis: Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) para la realización de los objetivos específicos i y ii y Espectroscopia de Rotación con Ablación Láser en jets supersónicos (LA-MB-FTMW y CP-FTMW) para el objetivo específico iii. Los fundamentos básicos de estas dos espectroscopias se presentan en el Capítulo III. Con el objetivo específico iii se implementó una nueva técnica espectroscópica basada, al igual que EPR, en microondas que permite caracterizar ligandos y/o cofactores orgánicos de metaloproteínas.



## *Capítulo III*

---

### III. ESPECTROSCOPIAS

La caracterización espectroscópica de los sistemas que se investigan en esta tesis, implica el uso intensivo de las espectroscopias de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) y de Rotación con métodos auxiliares complementarios acoplados (LA-MB-FTMW y CP-FTMW). En ambas, la radiación electromagnética empleada para efectuar las transiciones cuánticas se encuentra en el rango de las microondas. En EPR la frecuencia en banda X está entre 9-10 GHz y en banda Q en 34 GHz, mientras que en FTMW varía de 5 a 18 GHz.

El estudio de los componentes básicos de las moléculas biológicas en condiciones bien definidas puede explicar sus propiedades biológicas ya que permite su caracterización a nivel atómico de éstos sistemas (Weinkauff y col., 2002). La técnica de EPR se aplicará al estudio de sistemas en fase condensada mientras que la espectroscopia de rotación a sistemas en la fase gas, siendo la información obtenida con ambos enfoques, complementaria.

La espectroscopia de EPR es de elección en sistemas con metales de transición cuya capa d se encuentra incompleta y/o que contienen cofactores orgánicos paramagnéticos en su estructura. Su aplicación permite no solo la caracterización de la estructura electrónica del metal en su entorno de coordinación y la influencia de los ligandos unidos alrededor del mismo, sino que también permite obtener información sobre los acoplamientos magnéticos entre centros paramagnéticos. Toda esta información analizada mediante modelos fisicoquímicos apropiados puede ser utilizada para entender propiedades estructurales (que no pueden ser resueltas mediante métodos estructurales convencionales) y procesos de transferencia electrónica en estas proteínas, entre otras aplicaciones (Brondino y col., 2006a, Brondino y col, 2006b).

Por otra parte, la espectroscopia de rotación permite evaluar la estructura conformacional de sistemas pequeños en fase gas, lo cual combinado con cálculos químicos cuánticos puede profundizar el conocimiento sobre las propiedades moleculares como estructura, reconocimiento molecular, reactividad y fotoestabilidad (Weinkauff y col., 2002). Particularmente, el estudio de la conformación de ligandos de iones metálicos y la observación de la correlación entre la estructura molecular y las propiedades macroscópicas de las moléculas es fundamental para comprender la influencia en la distribución de carga de los complejos metálicos que forman. Es

importante notar que una biomolécula de bajo peso molecular puede ser caracterizada en fase gas libre de interacciones con el medio, con el solvente y/o con moléculas vecinas que en fase condensada pueden producir modificaciones de sus propiedades espectroscópicas.

### III.1 Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica

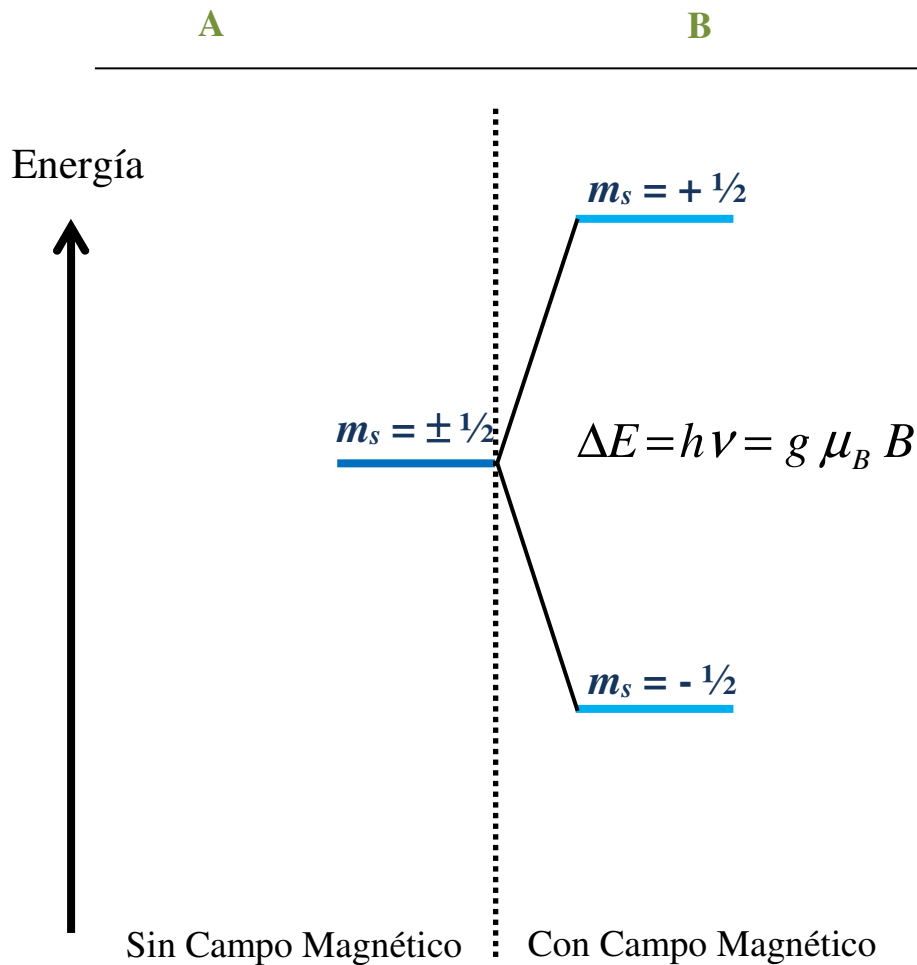
La espectroscopia de EPR permite el estudio de especies paramagnéticas, es decir especies químicas con electrones desapareados. Estas especies son centros atómicos o moleculares que poseen un momento magnético neto ( $\mu$ ). Las especies paramagnéticas incluyen dos grandes grupos: radicales libres y metales de transición. Dado que un amplio número de sistemas biológicos presentan en su estructura especies paramagnéticas que juegan importantes roles ya sea a nivel estructural y/o funcional, la técnica de EPR ha sido extensivamente utilizada en su caracterización. Los centros paramagnéticos en proteínas pueden ser parte integral de la misma o producirse transientemente como intermediarios de reacción y en la mayoría de los casos se encuentran generalmente relacionados con procesos de transferencia electrónica.

#### III.1.1 Fenómeno de resonancia paramagnética electrónica: el factor $g$

Los electrones tienen espín ( $S$ ), el cual les otorga una propiedad magnética conocida como momento magnético ( $\mu$ ). Para un sistema con un único electrón desapareado donde  $S = 1/2$ , éste puede adoptar los estados de espín electrónico  $m_s = -1/2$  y  $m_s = +1/2$  y aunque cada uno de estos estados presenta un momento magnético asociado, *a priori* no existen diferencias energéticas entre los mismos. La interacción del momento magnético de espín con un campo magnético externo produce la separación de estos dos estados de espín a través de un fenómeno conocido como interacción Zeeman (Weil y col., 1995). De esta manera el momento magnético de estado  $m_s = -1/2$  se alinea paralelamente con el campo externo disminuyendo su energía mientras que el estado  $m_s = +1/2$  se alinea antiparalelamente aumentándola (figura III.1). La separación en energía entre estos dos estados está dada por:

$$\Delta E = g \mu_B B \quad (\text{III.1})$$

donde  $g$  es una constante característica del sistema paramagnético denominado factor  $g$ ,  $\mu_B$  es el magnetón de Bhör y  $B$  es el campo magnético aplicado.



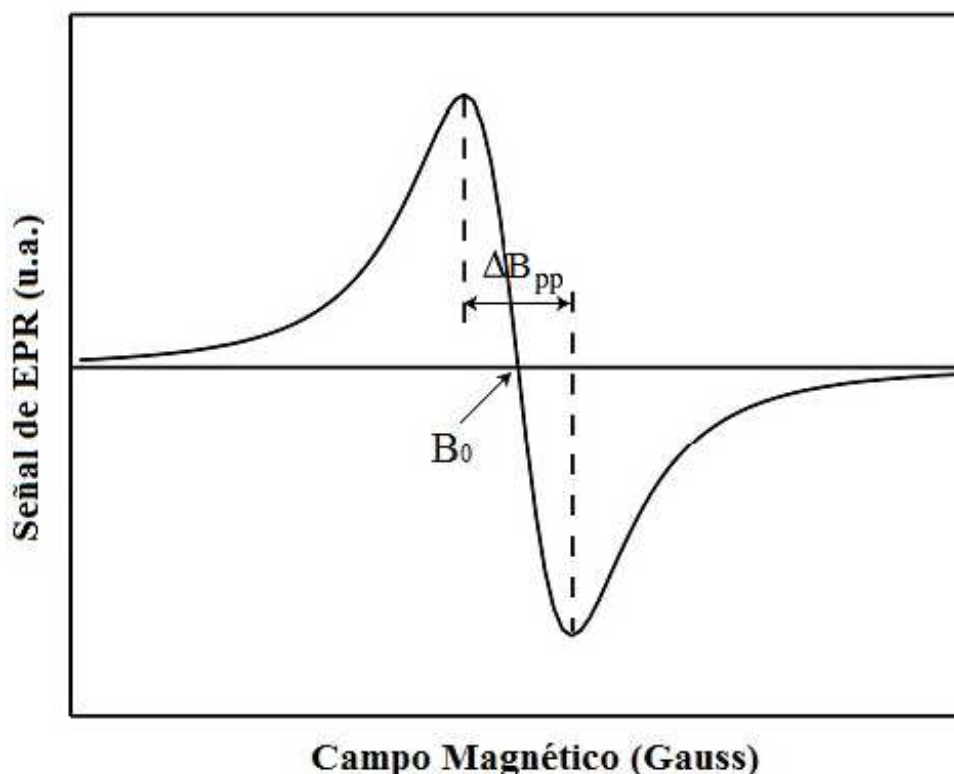
**Figura III.1.** Niveles de energía para un electrón de espín  $S = 1/2$ . **A)** En ausencia de campo magnético. **B)** En presencia de campo magnético.

En un experimento típico de EPR se irradia la muestra con una frecuencia fija ( $\nu$ ) de microondas mientras se varía el campo magnético externo aplicado. Cuando el desdoblamiento energético entre los estados  $m_s = -1/2$  y  $m_s = +1/2$  es de la misma magnitud que la energía de la radiación utilizada se satisface la condición de resonancia  $\Delta E = g \mu_B B = h \nu$ , donde  $h$  es la constante de Planck, la cual es registrada por el sistema de detección como una absorción de energía.

La figura III.2 muestra una línea de resonancia típica de EPR. El espectrómetro debido a su arquitectura electrónica, registra la derivada de la línea de resonancia, lo que establece una característica distintiva de esta espectroscopia respecto de la mayoría que registran espectros de absorción. En la figura, además, se indican los parámetros a

evaluar del espectro: el valor del campo magnético donde se da un pico de absorción ( $B_0$ ), dato necesario para calcular el factor  $g$  y el ancho pico a pico ( $\Delta B_{pp}$ ) que está asociado al tiempo de relajación del espín.

El factor  $g$  tiene un valor de 2,002319 en el caso del electrón libre. Desviaciones de este valor se producen como consecuencia de interacciones tales como el acoplamiento espín-órbita entre el centro paramagnético y átomos vecinos, entre otras, lo cual aporta información acerca del entorno del electrón en estudio.

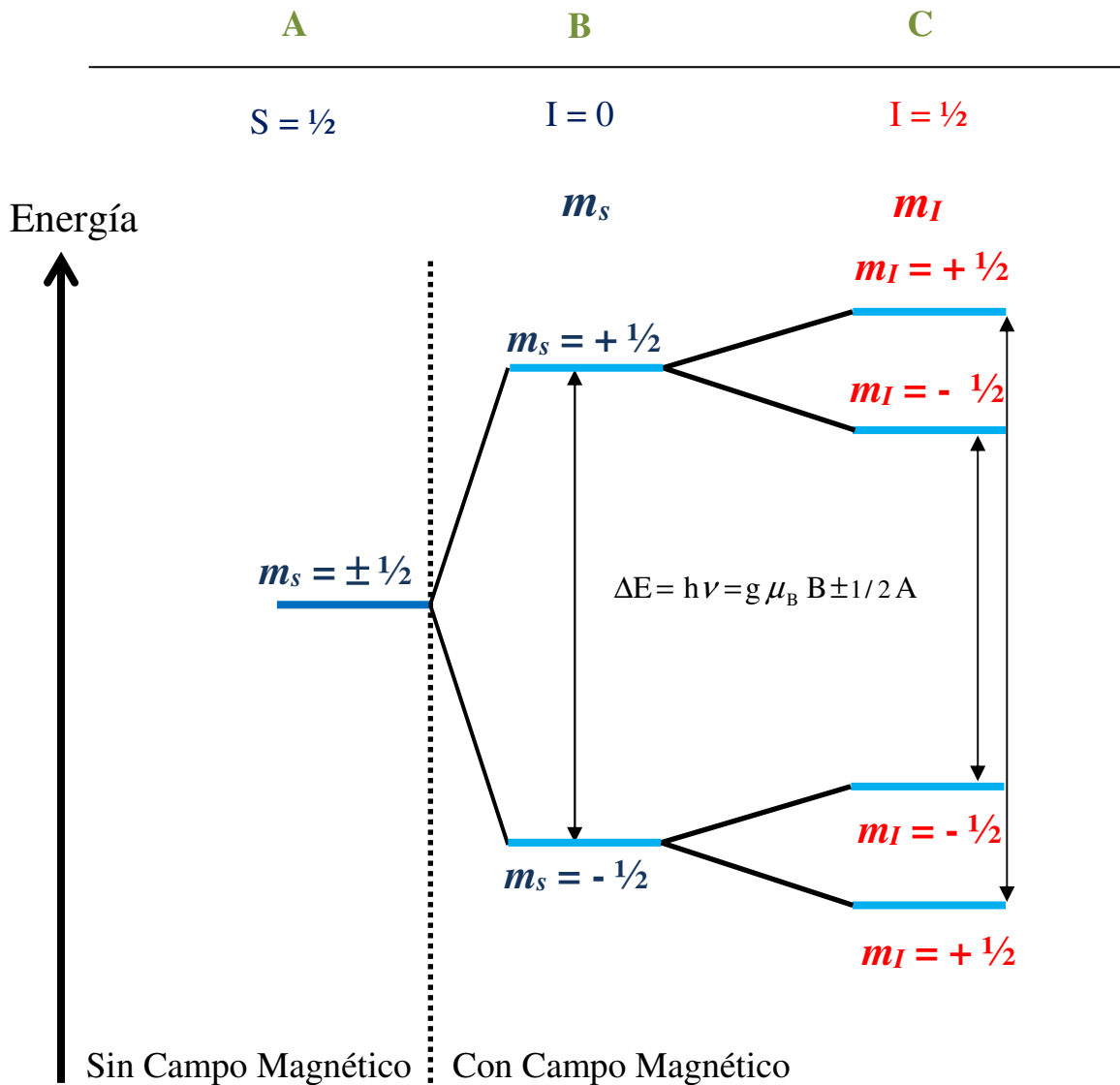


**Figura III.2.** Espectro típico de EPR asociado con un espín  $S = 1/2$ . Los parámetros más importantes a evaluar del espectro son la posición en campo de la línea de resonancia ( $B_0$ ) y el ancho pico a pico ( $\Delta B_{pp}$ ).

### III.1.2 Interacción hiperfina

Además de interactuar con el campo magnético externo, el momento magnético de espín electrónico puede interactuar con otros momentos magnéticos presentes en el sistema como son los momentos magnéticos asociados al espín nuclear del átomo que contiene el espín desapareado o de algún átomo vecino, efecto que se produce cuando los núcleos presentan espín nuclear distinto de cero ( $I \neq 0$ ). Esta interacción entre los momentos de espín electrónico y nuclear, la cual se conoce como

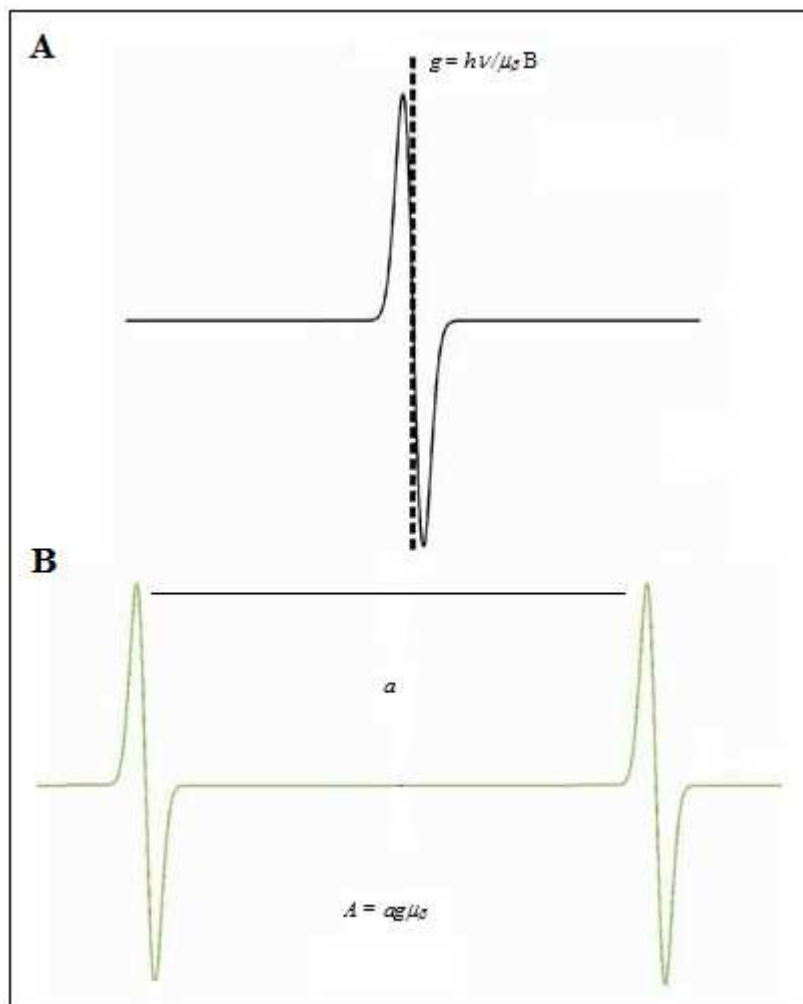
acoplamiento hiperfino o superhiperfino dependiendo si es generado por el núcleo central o si se debe a un núcleo vecino (Weil y Bolton, 2006), produce también un desdoblamiento energético de los estados de espín electrónico tal como se presenta en la figura III.3.



**Figura III.3.** Niveles de energía para un electrón de espín  $S = 1/2$ . **A)** En ausencia de campo magnético. **B)** y **C)** En presencia del campo magnético. En **C)** los niveles de energía se desdoblan cuando el espín del electrón desapareado interactúa con el espín nuclear  $I = 1/2$  de un núcleo en presencia de campo magnético dando lugar a la aparición de la constante de acoplamiento hiperfino  $A$ .

El desdoblamiento provocado por el núcleo interactuante depende de su espín nuclear produciéndose  $2I+1$  subniveles energéticos por cada estado  $m_s$ . De manera análoga a lo que ocurre con un  $S = 1/2$ , un núcleo con espín nuclear  $I = 1/2$  puede adoptar los estados  $m_I = -1/2$  y  $m_I = +1/2$ , cada uno de los cuales presenta un momento magnético

asociado. Al igual que si se tratara de un campo externo, el momento magnético nuclear interactúa con el momento magnético electrónico desdoblado cada estado en dos nuevos subniveles energéticos (figura III.3).



**Figura III.4.** A) Espectro de EPR en ausencia de interacciones nucleares. B) Espectro de EPR donde se evidencia la interacción del espín electrónico con el espín nuclear. Aparece la constante de acoplamiento hiperfino  $A$  ( $A$ , en unidades de energía y  $a$  en unidades de campo magnético).

La aplicación de un campo oscilante de microondas en esta situación produce transiciones entre los distintos estados de acuerdo a la regla de selección  $\Delta m_s = 1$ ,  $\Delta m_l = 0$ , lo que determina que el espectro original de una sola línea se desdobra en un espectro con centro de gravedad en  $B = hv / g \mu_B$  compuesto de 2 líneas de resonancia separadas por el parámetro hiperfino  $A = a g \mu_B$  ( $A$  tiene unidades de energía;  $a$  tiene unidades de campo magnético) tal como se aprecia en la figura III.4. El número de líneas hiperfinas así como la magnitud de  $A$  permite obtener información que complementa a la derivada del factor  $g$ .



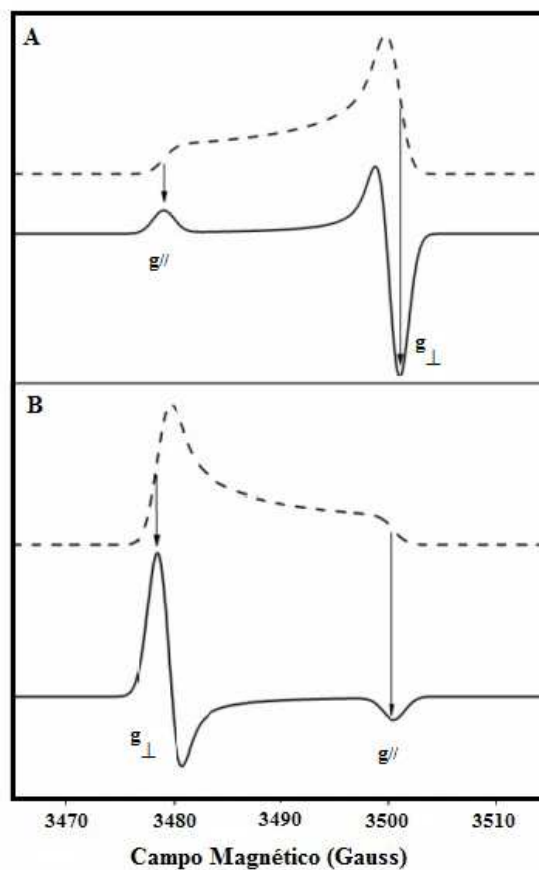
### III.1.3 Anisotropía del factor $g$ y de la constante de acoplamiento hiperfino $A$

Los parámetros  $g$  (posición) y  $A$  (desdoblamiento hiperfino) son normalmente anisotrópicos, es decir sus valores dependen de la dirección del campo magnético externo respecto a un dado sistema de referencia molecular del sistema paramagnético. Cuando ello ocurre, el factor  $g$  y la constante  $A$  se describen mediante magnitudes tensoriales denominadas tensores  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$ , respectivamente. Las matrices de  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$  ( $3 \times 3$ ) se caracterizan por 3 valores principales o autovalores (*eigenvalues*),  $g_x$ ,  $g_y$  y  $g_z$  y  $A_x$ ,  $A_y$  y  $A_z$ , respectivamente, donde  $x$ ,  $y$ ,  $z$  son direcciones características de la molécula que contiene el electrón desapareado que se denominan autovectores (*eigenvectors*) (Weil y col., 1995).

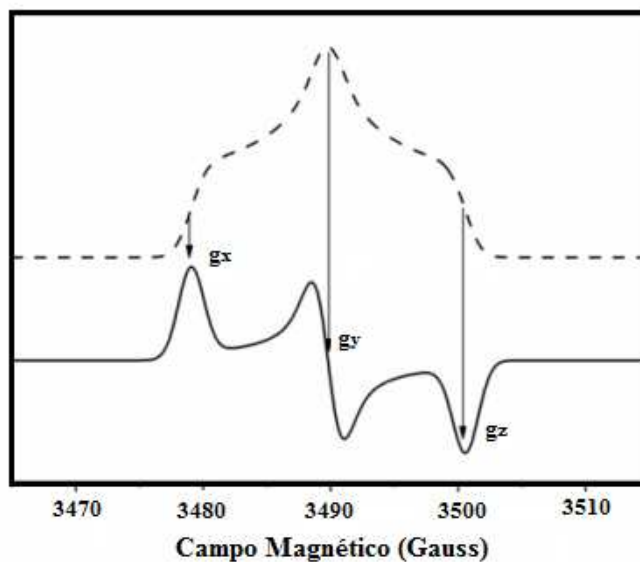
En simetría cúbica, las 3 direcciones son equivalentes y entonces el valor de  $g$  será isotrópico ( $g_x = g_y = g_z$ ), es decir su valor no depende de la orientación del campo magnético externo respecto del sistema molecular. En el caso de simetría axial, que es común encontrar en metales de transición como el ion Cu (II),  $g_x = g_y \neq g_z$ . Por convención,  $g_z$  se define como el valor de  $g$  observado cuando el campo aplicado es paralelo al eje de simetría y se lo denomina  $g_{//}$ , mientras que  $g_x$  y  $g_y$  se designan como  $g_{\perp}$ , que es el valor de  $g$  obtenido cuando el campo aplicado es perpendicular al eje de simetría. La situación más general corresponde al caso de simetría rómbica donde los 3 valores de  $g$  son diferentes ( $g_x \neq g_y \neq g_z$ ).

La simetría de las matrices  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$  puede ser visualizada obteniendo espectros de polvo microcristalino o de solución congelada, los cuales representan los tipos de muestras más usuales en EPR. En estos tipos de muestras, las moléculas paramagnéticas presentan todas las orientaciones posibles respecto al campo magnético exterior, por lo que el espectro de EPR representa la suma (convolución) de todas las resonancias posibles que puede presentar una molécula paramagnética.

Los distintos tipos de espectros posibles de acuerdo con la simetría de  $g$  se muestran en las figuras III.5 y III.6, en las que se observan las líneas de absorción como una línea punteada y su derivada en línea continua. Los espectros en el caso de sitios paramagnéticos con factores  $g$  isotrópicos son similares al obtenido para el caso de un radical aislado (figura III.2).

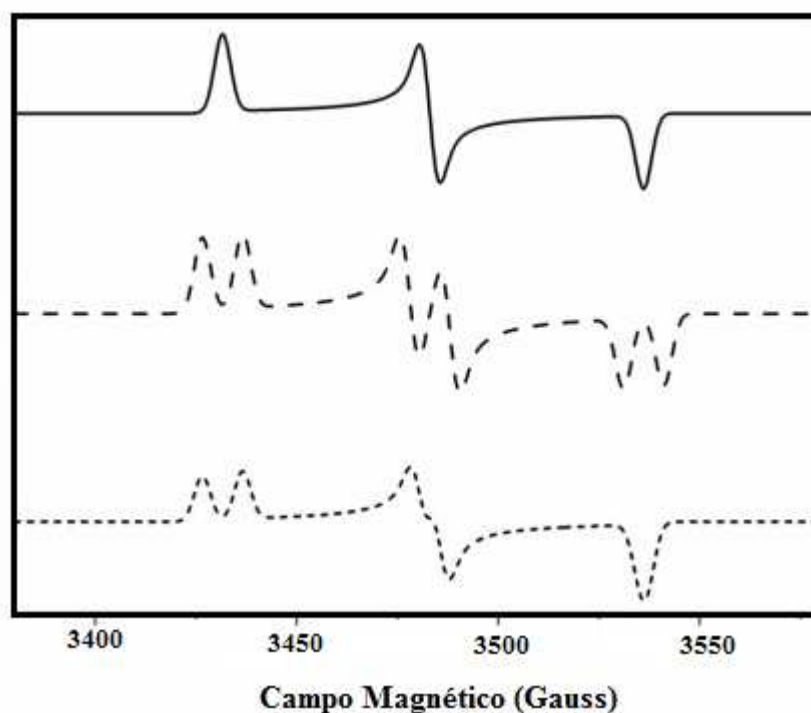


**Figura III.5.** Espectros EPR con simetría axial ( $g_x = g_y = g_{\perp} \neq g_z = g_{//}$ ). La línea punteada corresponde a la señal de absorción y la línea continua a la 1<sup>ra</sup> derivada. A)  $g_{//} > g_{\perp}$ . B)  $g_{//} < g_{\perp}$ .



**Figura III.6.** Anisotropías del parámetro de posición  $g$ . En líneas punteadas se grafica la señal de absorción mientras que en línea llena su derivada (grafico típico de los espectros de EPR). En simetría rómbica  $g_x \neq g_y \neq g_z$ .

Como se explicó anteriormente, el desdoblamiento hiperfino también puede presentar anisotropías, la cual proviene de la interacción dipolar entre el espín electrónico y el espín nuclear (Weil y col., 1995). Las consideraciones que se aplican para los valores anisotrópicos de  $A$  son las mismas que para los valores de  $g$  obteniéndose situaciones de simetría isotrópicas y anisotrópicas (figura III.7).



**Figura III.7.** Anisotropía del parámetro de interacción hiperfina  $A$ . De arriba hacia abajo: señal de EPR sin interacción hiperfina; señal de EPR con interacción hiperfina isotrópica, con  $I = 1/2$ ; señal de EPR con interacción hiperfina anisotrópica también con  $I = 1/2$ .

La determinación completa de los tensores  $g$  y  $A$  (autovalores y autovectores) en un sistema de referencia molecular solo puede efectuarse a partir de mediciones en muestras de un sólido orientado, tal como se describe en el capítulo V. No obstante, información importante puede ser obtenida a partir del análisis de muestras policristalinas no orientadas (comúnmente denominadas polvos) o soluciones líquidas congeladas. Para el caso de muestras sólidas policristalinas o soluciones congeladas (*powder-like*) es posible evaluar los autovalores del tensor  $g$  en ausencia de interacciones magnéticas significativas entre centros pero no así los autovectores. Por el contrario, en el caso de las soluciones líquidas el movimiento rápido en todas direcciones de las moléculas paramagnéticas promedia la anisotropía de los tensores  $g$  y  $A$ , obteniéndose en este caso los valores isotrópicos de los tensores  $g$  y  $A$ .

### III.1.4 Procesos de relajación

En un sistema de espines  $S = 1/2$  con niveles de energía como el mostrado en la figura III.1.B, la absorción continua de energía de microondas en un experimento de EPR llevaría a que después de un cierto tiempo todos los estados con niveles de energía superior ( $m_s = + 1/2$ ) estarían poblados siendo imposible la transición de EPR. Este estado, en el que no son posibles las transiciones de EPR es conocido como “estado saturado”. Evidentemente, debe existir algún procedimiento a nivel molecular que evite este estado de saturación, ya que de producirse, la técnica de EPR y las técnicas espectroscópicas en general no tendrían razón de ser.

Los procesos a nivel molecular que impiden el estado de saturación son englobados dentro del nombre genérico de “procesos de relajación”. Estos procesos “descargan” a un sistema de espines con determinada energía devolviéndolo al nivel fundamental y posibilitando que el proceso de absorción de energía continúe cuando el sistema es perturbado mediante radiación electromagnética.

En general, existen dos procesos de relajación: espín – red y espín – espín. En el primero, los dipolos magnéticos en el estado de mayor energía ceden ésta a la red; en el segundo, se la ceden a otros dipolos vecinos (Pilbrow, 1991; Weil y Bolton, 2006). Estos procesos se describen mediante dos tiempos de relajación:  $T_1$  para el espín – red (también se le llama tiempo de relajación longitudinal) y  $T_2$  para el espín – espín (o transversal). En principio  $T_2$  no depende de la temperatura y  $T_1$  es el tiempo de relajación que determina que exista una diferencia entre los estados inferiores y superiores de energía del sistema de espines y es altamente dependiente de temperatura; a menor temperatura, mayor es el  $T_1$  o equivalentemente menor es la velocidad de relajación.

Para un sistema de dos niveles, la diferencia  $n$  de poblaciones entre el número de estados con  $m_s = - 1/2$  (estado inferior) y  $m_s = + 1/2$  (superior) en estado estacionario, está dada por (Pilbrow, 1991):

$$n = \frac{n_0}{(1 + T_1 P)} \quad \text{(III.2)}$$

donde  $n_0$  es la diferencia de poblaciones entre los dos estados en el equilibrio térmico determinada por la distribución de Boltzmann (diferencia al comienzo del fenómeno de resonancia) y  $P$  es la potencia de microondas.

La ecuación III.2 muestra que la condición de no saturación se obtiene cuando  $1 + T_1 P \approx 1$  y  $n \approx n_0$ , lo cual se logra cuando  $T_1$  es muy corto o cuando la  $P$  es muy baja. Otra implicancia de que  $T_1$  sea muy corto es que aunque exista diferencia de poblaciones entre los dos estados de espín, el tiempo de vida media del estado superior de espín también es corto, con lo cual de acuerdo con el principio de incertidumbre de Heisenberg, trae implicancias en la detección de la señal de EPR dado que el ancho de línea es inversamente proporcional al  $T_1$ . Es por ello que en algunos de los sistemas que se investigan, las señales de EPR solo se pueden detectar a temperaturas por debajo de los 60 K, debido a que estas temperaturas el tiempo de relajación toma un valor considerable como para hacer posible la medición de EPR.

En contraste, la relajación espín-espín, la cual como se menciona anteriormente, depende poco de temperatura, contribuye de manera constante al ancho de la línea de resonancia. De esta manera, el ancho de línea de la señal de EPR es determinado por  $T_1$  y  $T_2$ , siendo solo dependiente de  $T_2$  en aquellos casos en que  $T_1 \gg T_2$  (Pilbrow, 1991):

$$\Delta B \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (\text{III.3})$$

En 1946 Felix Bloch propuso un conjunto de ecuaciones derivadas a partir de argumentos fenomenológicos, para explicar las propiedades de un conjunto de núcleos en un campo magnético. Si bien el fenómeno de resonancia magnética es un fenómeno cuántico, el modelo propuesto por Bloch permite explicar de forma cualitativa el fenómeno de la resonancia y también da las bases para caracterizar los dos tipos de relajación que ocurren en resonancia magnéticas tanto de espín electrónico como nuclear. Las ecuaciones de Bloch así como los fundamentos que llevaron a este a proponerlas pueden ser encontradas en la bibliografía (Hollas, 2004; Weil y Bolton, 2006) y por lo tanto solo se presentarán sus resultados.

El principal resultado de Bloch es que a partir de su modelo, además de explicar el fenómeno de resonancia, permite obtener la forma de línea de la absorción de energía, la cual en unidades de frecuencia está dada por:

$$I \propto \frac{\omega_0 T_2}{1 + (\omega - \omega_0)^2 T_2^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} \quad (\text{III.4})$$

donde  $I$  es la intensidad de la línea de resonancia para cada frecuencia  $\omega = g \mu_B B / \hbar$ ,  $\omega$  representa la posición de la línea de resonancia en unidades de frecuencia,  $B_1$  es la intensidad del campo de microondas,  $\gamma = -g_e \mu_B / \hbar$  es la relación giromagnética (constante proporcional al factor  $g$ ) y como ya se definió,  $T_1$  y  $T_2$  son los tiempos de relajación espín-red y espín-espín respectivamente (Pilbrow, 1991).

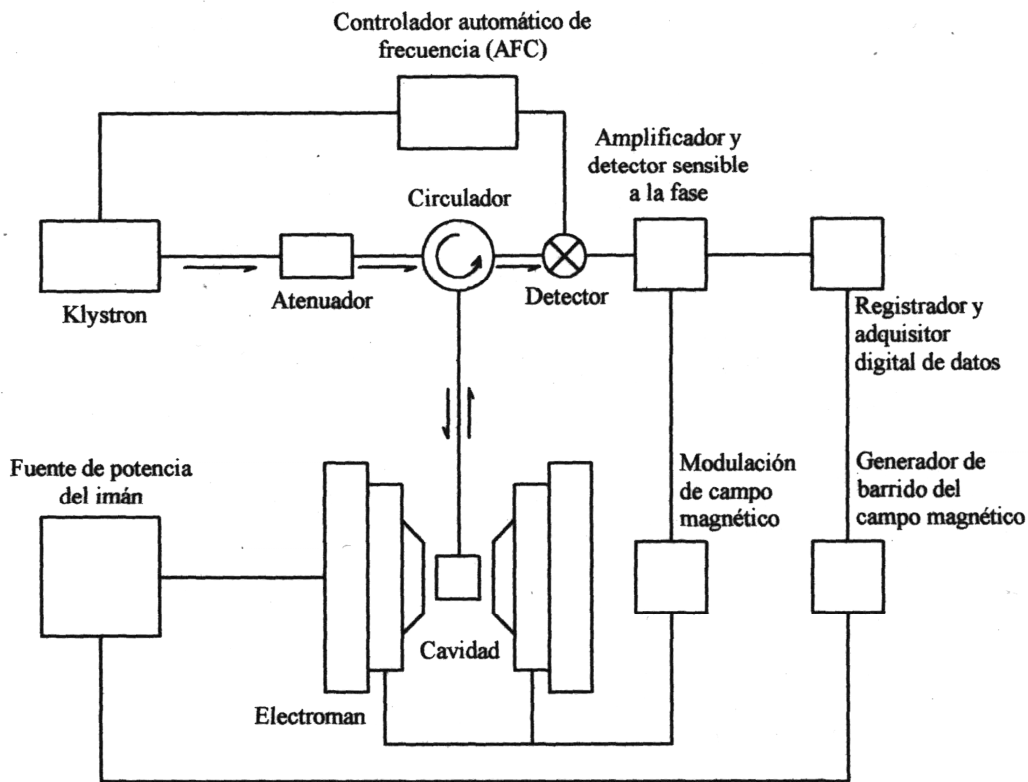
Al menos dos importantes conclusiones pueden ser derivadas de la ec. III.4: La primera es que cuando el producto  $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2$  es mucho menor a 1, la ecuación predice que la forma de línea de resonancia es Lorentziana, una de las formas de líneas más comunes encontradas en resonancia magnética; la segunda es que cuando este factor es mucho mayor que 1 como producto del incremento del  $B_1$  o en el caso de sistemas con  $T_1$  muy largos, la intensidad de la línea de resonancia disminuye produciéndose el fenómeno de saturación, lo cual se condice con lo explicado anteriormente. No obstante hay que tener en cuenta que las ecuaciones de Bloch pueden explicar el fenómeno de saturación y la forma de línea de resonancia en los sistemas que investigamos en este trabajo, aunque fallan para explicar la indetectabilidad de las líneas de resonancia en los casos de  $T_1$  muy cortos, fenómeno que también ocurre en nuestros sistemas.

### III.1.5 Espectrómetro y mediciones

Los espectrómetros de EPR están diseñados para inducir y observar transiciones magnéticas entre los estados Zeemann de los espines desapareados en presencia de un campo magnético exterior. La figura III.8 muestra un esquema de un espectrómetro básico de EPR. El mismo requiere de una fuente de radiación y de algún dispositivo que detecte absorción de energía en la muestra. Sin embargo, hay una diferencia importante entre un espectrómetro de EPR y uno óptico: los espectrómetros de EPR operan a frecuencia de microondas fija y barren un espectro de EPR modificando lentamente la intensidad del campo magnético estático aplicado hasta obtener la condición de resonancia. Cuando se cumple esa condición, se produce la absorción neta de energía por parte de la muestra.

En el espectrómetro el campo magnético estático se genera mediante un electroimán que garantiza un campo magnético homogéneo sobre la muestra. El

generador de microondas era antiguamente una válvula electrónica denominada *klystron* y que ha sido reemplazada por generadores de estado sólido (diodo gunn).



**Figura III.8.** Esquema de un espectrómetro básico de EPR.

No obstante el nombre de *klystron* se sigue usando actualmente para referirse al generador de microondas. El generador de microondas se acopla mediante una guía de ondas a la cavidad resonante en la que se coloca la muestra. Para asegurar la transferencia óptima de la potencia de microondas desde el *klystron* hacia la cavidad y desde la cavidad al detector se incorpora un circulador, normalmente de cuatro puertas de manera de impedir que las ondas reflejadas en la cavidad puedan volver al *klystron*. De ésta forma se asegura que toda la potencia de microondas reflejada por la muestra incida en el detector. La cavidad se acopla a la guía de ondas mediante un iris cuyo diámetro efectivo se puede controlar con una punta metálica. Este mecanismo permite adaptar la impedancia del sistema a la de la cavidad para permitir que toda la potencia incidente de la microonda sea absorbida por la cavidad. Cuando esto ocurre la cavidad está acoplada, la transferencia de energía es máxima y la frecuencia de resonancia de la cavidad coincide con la frecuencia de microonda. Durante el proceso de medición, el

controlador automático de frecuencia (AFC, Automatic Frequency Controller) se encarga de mantener la frecuencia de emisión del *klystron* igual a la frecuencia natural de absorción de la cavidad.

Cuando se produce la absorción de energía de microondas por la muestra, cambia la frecuencia natural de la cavidad y parte de la potencia que le llega es reflejada. En consecuencia cambia la cantidad de energía de microondas que llega al detector. Para detectar la señal de EPR con una máxima relación señal/ruido (es decir alta sensibilidad) se modula el campo magnético estático mediante bobinas adosadas a la cavidad. La potencia reflejada por la cavidad (que es proporcional a la energía absorbida por la muestra) llega al detector, se amplifica y se detecta mediante un detector sensible a fase.



**Figura III.9.** Aspecto general del espectrómetro de EPR marca *Bruker* del Departamento de Física de la FCB, UNL.

La salida de éste detector sensible a fase es la derivada primera de la energía absorbida por la muestra respecto del campo magnético estático y puede registrarse en forma digital mediante un adquirente electrónico de datos. La intensidad de la señal de EPR depende de parámetros propios del sistema como  $T_1$ ,  $T_2$ , y la temperatura, además



de factores instrumentales producto de la electrónica del sistema ( $G$ , ganancia), y el campo de modulación ( $M_{pp}$ ). Para el caso de un espín  $S = 1/2$  en ausencia de saturación ( $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2 \ll 1$ ), la intensidad de la señal de EPR está dada por (Manual de *Bruker*, 2009):

$$I \propto \frac{N_s \cdot M_{pp} \cdot G \cdot \sqrt{P}}{T} \quad (\text{III.5})$$

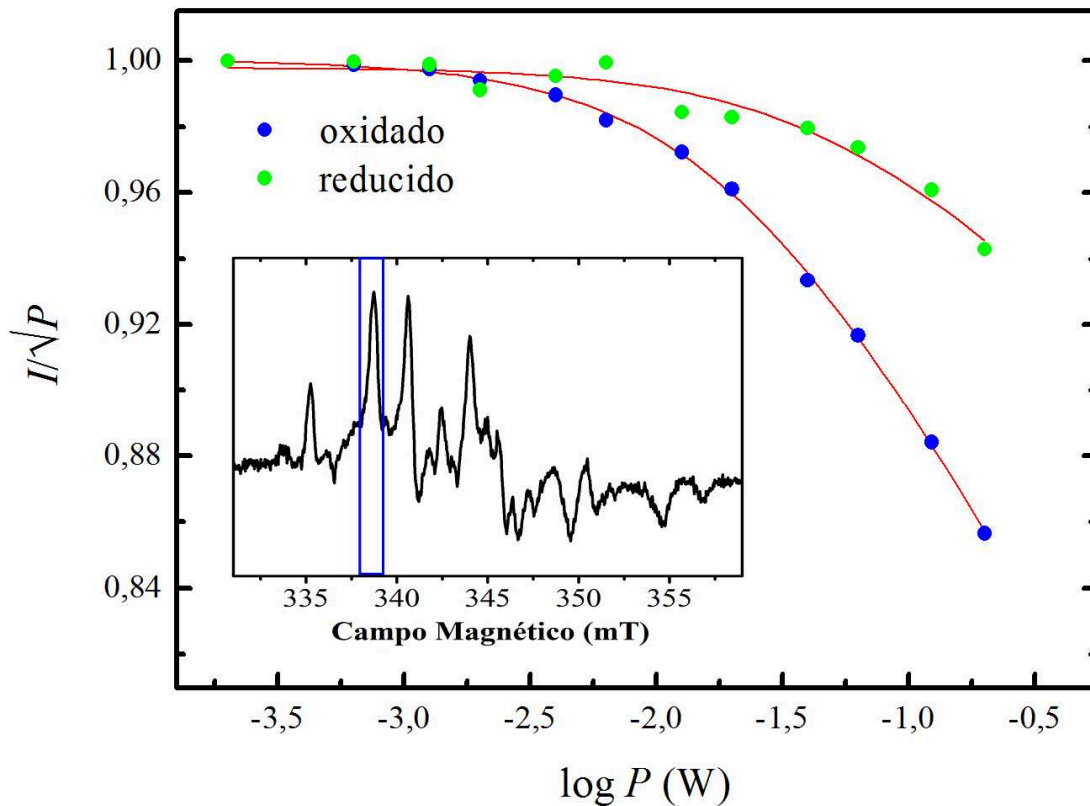
siendo,  $N_s$  es el número de espines de la muestra,  $M_{pp}$  es el campo de modulación pico a pico,  $G$  es la ganancia del instrumento,  $P$  la potencia de la radiación de microondas y  $T$  es la temperatura. Una importante conclusión a la cual se arriba a partir de esta ecuación que deriva de condiciones experimentales, es que la intensidad de la línea depende de la raíz cuadrada de la potencia de microondas y no de la potencia como predice la ecuación de Bloch (Weil y col., 1995) lo cual tiene impacto en los estudios de saturación que se realizaron en esta tesis y que son analizados en el capítulo IV. Una segunda derivación importante es que mediante esta ecuación se pueden efectuar estudios de cuantificación de espines ( $N_s$ ) por EPR, evaluando la segunda integral del espectro y comparándola con un patrón de espines  $S = 1/2$  (habitualmente una solución de iones  $\text{Cu}^{2+}$ ).

### III.1.6 Estudios de saturación

Una derivación importante de la ecuación III.5 es que en ausencia de saturación debe existir una relación lineal entre la intensidad  $I$  de la señal de EPR y la raíz cuadrada de la potencia de microondas o en otras palabras la relación  $I/\sqrt{P}$  vs  $P$  debe mantenerse constante en todo el rango de  $P$ . Desviaciones de este comportamiento, es decir valores menores de  $I/\sqrt{P}$  para mayores  $P$  son indicativos de saturación. Dado que estos estudios serán utilizados para entender procesos de interacción espín-espín y espín-red se explicará brevemente como se efectúa un estudio de saturación.

La figura III.10 muestra un experimento típico de saturación de EPR. Se realizan mediciones de la muestra variando la potencia de microondas y la  $I$  de la señal de EPR se obtiene midiendo la altura de alguna resonancia representativa del espectro (recuadro rojo) o evaluando la segunda integral del espectro. Se relaciona  $I/\sqrt{P}$  vs  $P$ . Como se

observa en esta figura, el comportamiento de  $I/\sqrt{P}$  se desvía del esperado para  $P > 0,001$  W, indicando que a partir de esa potencia la señal se encuentra saturada.



**Figura III.10.** Ensayo de saturación mediante EPR para evaluar estados de oxidación de una metaloproteína. La figura muestra la potencia de microondas normalizada para la metaloenzima Aldehído Oxido Reductasa, en estado reducido (verde) y en estado oxidado (azul) inhibida la señal de EPR por Arsenito.  $I$  es la intensidad de señal de EPR y  $P$ , la potencia de microondas en W. El ajuste se realiza mediante la ec. III.6. El pico de la señal de EPR utilizado para evaluar  $I$  está recuadrado en azul en la figura en concordancia al estado oxidado de la enzima. Para  $P > 0,001$  W la señal comienza a saturar.

El paso a seguir es ajustar los valores experimentales con un modelo apropiado, el cual se realiza mediante la ecuación empírica (Makinen y Yim, 1981):

$$\frac{I}{\sqrt{P}} \propto \left( 1 + \frac{P}{P_{1/2}} \right)^{-b/2} \quad (\text{III.6})$$

dónde  $P_{1/2}$ , es la potencia de microondas que hace el valor de  $I/\sqrt{P} \propto 2^{-b/2}$  y  $b$ , es una constante característica de los mecanismos de relajación. Este parámetro no se analizará en esta tesis y por lo tanto no se darán más detalles sobre el mismo.

Usualmente, se compara la ec. III.6 con la de Bloch, ec. III.4, para  $\omega = \omega_0$ , asumiendo  $b = \text{cte}$  y factor de saturación  $(1 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2)^{-1} = (1 + P / P_{1/2})^{-1}$ . Bajo estas

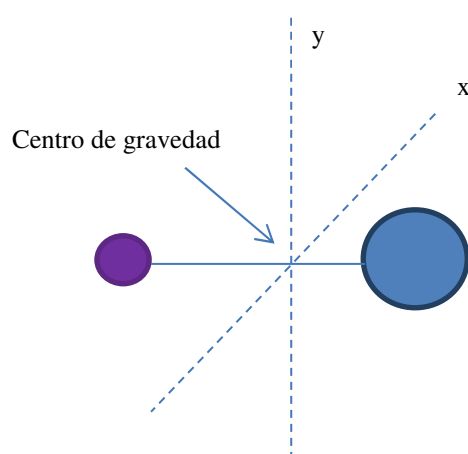
condiciones  $P_{1/2} \propto 1 / \gamma^2 T_1 T_2 = \text{constante} / T_1$ . Por lo tanto,  $P_{1/2}$  es directamente proporcional al tiempo relajación espín-red ( $T_1$ ). (Makinen y Yim, 1981).

## III.2 Espectroscopia de rotación

La espectroscopia de rotación caracteriza a las moléculas de acuerdo a sus ejes principales de inercia, mediante la interacción con microondas en el rango de 5 a 18 GHz (Hollas, 2004). La combinación de ésta espectroscopia con otras técnicas auxiliares, como *jets* supersónicos y ablación laser, amplía el tipo de moléculas a estudiar y la cantidad de parámetros de caracterización que se pueden obtener. Moléculas en estado sólido son ablacionadas ingresando en estado gaseoso a un *jet* supersónico, este las introduce en una cavidad resonante donde son irradiadas con microondas. Éstas técnicas en tándem permiten dilucidar todas las posibilidades conformacionales de la estructura de moléculas de bajo peso molecular, debido a que los valores de las constantes rotacionales en moléculas muy grandes se aproximan a cero.

### III.2.1 Modelo del rotor rígido

Un modelo aproximado útil para la rotación de extremo a extremo de una molécula diatómica es el rotor rígido en el que el enlace que une los núcleos se considera como una varilla rígida sin peso, como se muestra en la figura III.11.



**Figura III.11.** Modelo de rotación de una molécula diatómica alrededor de los ejes perpendiculares al enlace y su centro de gravedad.

El momento angular está dado por:

$$P_L = [L(L+1)]^{1/2} \hbar \quad (\text{III.7})$$

siendo  $\hbar = h/2\pi$  ( $h$ , constante de Planck) y  $L = 0, 1, 2, \dots$  el número cuántico rotacional. En general,  $L$  se asocia con un momento angular total excluyendo espín nuclear, pero cuando no hay un momento angular o de espín, se refiere simplemente a la rotación. Al igual que para otros momentos angulares, la componente  $z$  viene dada por:

$$(P_L)_z = M_L \hbar \quad (\text{III.8})$$

siendo  $M_L = L, L-1, \dots, -L$ . Por lo tanto, cada nivel  $L$  de energía de rotación, en ausencia de campo eléctrico, es  $(2L+1)$  veces degenerados.

La solución de la ecuación de Schrödinger para un rotor rígido muestra que la energía rotacional ( $E_r$ ) está cuantizada con valores:

$$E_r = (h^2/8\pi^2 I) L(L+1) \quad (\text{III.9})$$

donde  $I$  es el momento de inercia. Los niveles de energía de rotación dados por la ec. III.9 aumentan con el aumento de  $L$ .

El momento de inercia  $I$  de una molécula sobre cualquier eje a través del centro de gravedad está dado por:

$$I = \sum_i m_i r_i^2 \quad (\text{III.10})$$

donde  $m_i$  y  $r_i$  son la masa y la distancia de un átomo  $i$  desde el centro de masa, respectivamente.

Una molécula se caracteriza mediante los parámetros denominados  $I_a, I_b$  e  $I_c$ , que son los momentos de inercia principales y que son etiquetados dependiendo a cual de los ejes de inercia principales corresponde cada uno. El eje convencionalmente etiquetado como el eje  $c$  es aquel donde el momento de inercia tiene el valor máximo. Un segundo eje, denominado eje  $a$  es en el cual el momento de inercia tiene su mínimo valor. Los ejes  $a$  y  $c$  son perpendiculares entre sí y a su vez un tercer eje, el eje  $b$ , es perpendicular a los otros dos.

En general, de acuerdo con la convención, cuando el sistema en rotación está aislado, se cumple la ecuación:

$$\frac{1}{2} \{ \mathbf{I}_a \omega_a^2 + \mathbf{I}_b \omega_b^2 + \mathbf{I}_c \omega_c^2 \} = \text{cte} \quad (\text{III.11})$$

que describe la superficie tridimensional de un elipsoide en el espacio de velocidades angulares ( $\omega$ ).

La ec. III.11, es la base para la definición del elipsoide de inercia:

$$\mathbf{I}_a x^2 + \mathbf{I}_b y^2 + \mathbf{I}_c z^2 = 1 \quad (\text{III.12})$$

siendo  $\mathbf{I}_a$ ,  $\mathbf{I}_b$ ,  $\mathbf{I}_c$  las constantes de inercia a lo largo de los ejes  $x$ ,  $y$  y  $z$ , respectivamente. Experimentalmente, lo que se mide es la frecuencia  $F$  por lo que la ecuación de energía se convierte en:

$$F(L) = \frac{E_r}{h} = \frac{h}{8\pi^2 \mathbf{I}} L(L+1) = D L(L+1) \quad (\text{III.13})$$

siendo  $D$  **la constante rotacional experimental** que se denomina  $A$ ,  $B$  o  $C$  de acuerdo a los ejes cartesianos y es inversamente proporcional al momento de inercia. Se determina por mediciones espectroscópicas.

### III.2.2 Clasificación de moléculas en rotores

Para estudiar los espectros rotacionales de las moléculas es esencial clasificarlas en función de sus momentos principales de inercia:

$$\mathbf{I}_c \geq \mathbf{I}_b \geq \mathbf{I}_a = 0$$

Para una molécula lineal como el HCN en la figura III.12 (a):

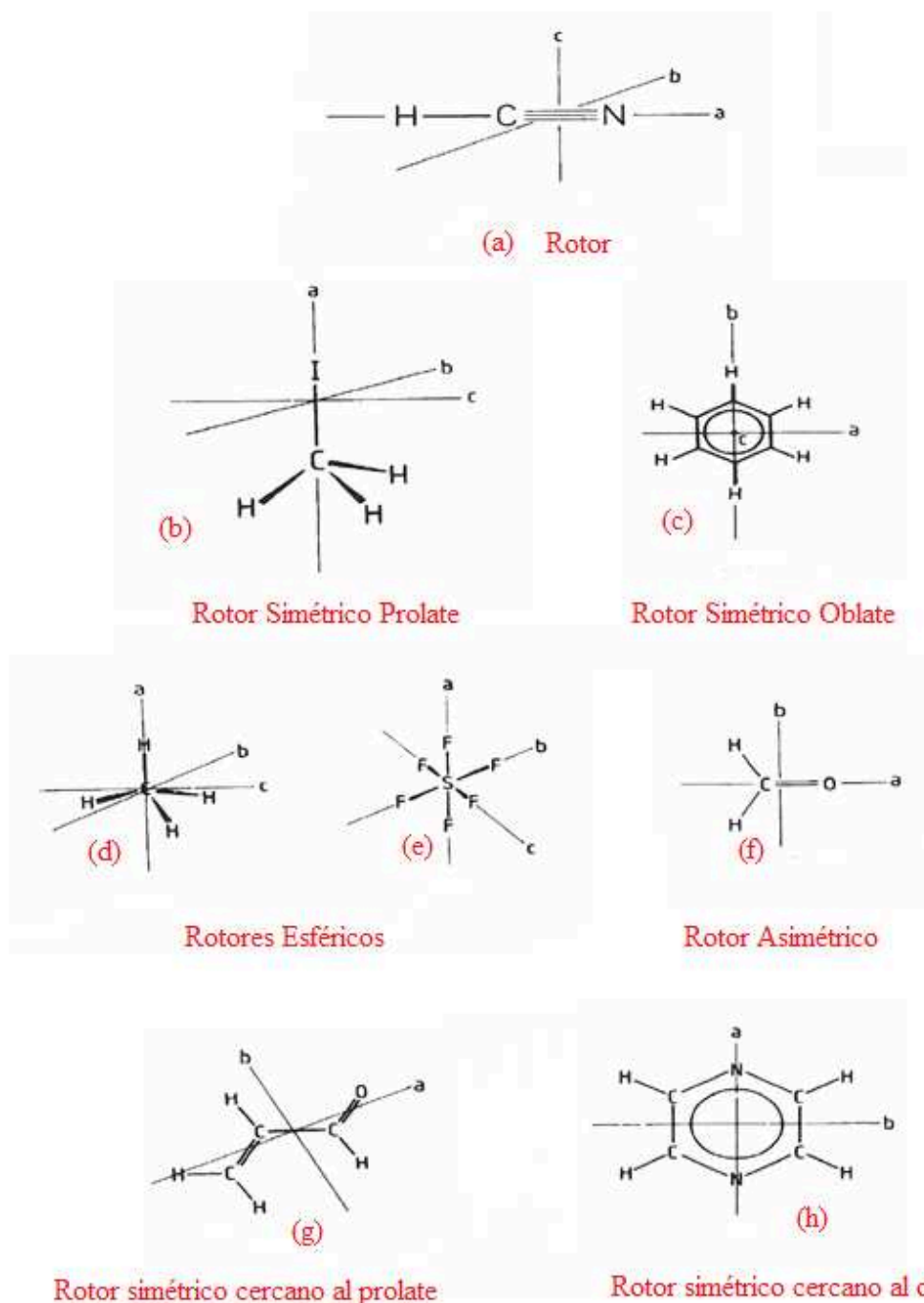
$$\mathbf{I}_c = \mathbf{I}_b > \mathbf{I}_a = 0$$

donde los ejes  $b$  y  $c$  pueden estar en cualquier dirección perpendicular al eje  $a$  internuclear. Considerando los núcleos como masas puntuales en el eje  $a$ , es evidente que  $\mathbf{I}_a$  debe ser cero, ya que todas las  $r_i$  en la ec. III.10 son cero.

Para un rotor simétrico o de elevada simetría, dos de los momentos principales de inercia son iguales y el tercero distinto de cero. Si,

$$I_c = I_b > I_a$$

la molécula es un rotor simétrico prolata. En la figura III.12 (b) se presenta un ejemplo representativo de este tipo de rotores simétricos, el metiloyoduro, donde el núcleo fuerte de yodo no contribuye a  $I_a$ .



**Figura III.12.** Ejes principales de inercia de diferentes moléculas. (a) HCN (b) Metiloyoduro (c) Benceno (d) Metano (e) Sulfuro de Hexafluoruro (f) Formaldehído (g) *s-trans*-acroleina (h) pirazina (modificado de Hollas, 2004).

La molécula de benceno, figura III.12 (c), es un rotor simétrico oblate dado que:

$$I_c > I_b = I_a$$

Es importante notar que un rotor simétrico debe tener un eje  $C_n$  con  $n > 2$ . El metiloduro tiene un eje  $C_3$  y el benceno un eje  $C_6$  por lo tanto, estos son rotores simétricos.

Un rotor esférico tiene los tres momentos principales de inercia iguales:

$$I_c = I_b = I_a$$

como es el caso del hexafluoruro de azufre y el metano que se muestran en la figuras III.12 (d) y (e) respectivamente. De hecho, todas las moléculas que pertenecen a cualquiera de los grupos puntuales  $T_d$  u  $O_h$  son rotores esféricos.

Un rotor asimétrico tiene todos los momentos principales de inercia diferentes:

$$I_c \neq I_b \neq I_a$$

siendo la mayoría de las moléculas incluidas en la categoría de rotores asimétricos.

Un ejemplo de rotor asimétrico es el formaldehído que se visualiza en la figura III.12 (f).

Si las constantes tienen la siguiente relación,

$$I_c \approx I_b > I_a$$

la molécula se conoce como un rotor simétrico-cercano al prolato.

Si las constantes tienen la siguiente relación,

$$I_c > I_b \approx I_a$$

la molécula se conoce como un rotor simétrico-cercano al oblate. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la *s-trans*-acroleína figura III.12 (g) y la pirazina figura III.12 (h).

### III.2.3 Caracterización de rotores

En espectroscopia de rotación las moléculas reciben el nombre de *rotámeros*. Cuando los rotámeros pueden ser identificados como una entidad específica reciben el nombre de *confórmeros*.

A continuación se describe la información que se puede obtener mediante espectroscopia rotacional en fase gas relativa a estructura y dinámica molecular interna. En relación a la información estructural, ésta técnica aporta información precisa, no solo de la ubicación de los átomos sino además de todas las posibilidades conformacionales

que puede adoptar una molécula, libre de interacciones con otras moléculas vecinas y/o con el medio como ocurre en fase condensada.

### III.2.3.1 Determinación de la estructura

La información estructural que se obtiene a partir de espectroscopia rotacional, resulta de los momentos de inercia moleculares que dependen críticamente de las masas y la geometría molecular. Sin embargo, dado que la molécula no es un sistema rígido, los momentos de inercia están afectados por la energía de vibración aún en el estado fundamental de vibración. Esta energía de vibración es la responsable de la incertidumbre asociada a la determinación de los parámetros estructurales.

### III.2.3.2 Dinámica molecular interna

La espectroscopia de rotación permite obtener información sobre la dinámica interna de sistemas que presentan vibraciones de gran amplitud, como los modos de flexión (*bending*) y plegamiento (*ring-puckering*) en heterociclos, la inversión del grupo amino, la pseudorotación o la rotación interna. El análisis de los efectos de interacción rotación - vibración en estos sistemas permite determinar la función de potencial, la dinámica y la estructura de este tipo de moléculas.

### III.2.3.3 Relajación entre conformeros

El estudio en el seno de *jets* supersónicos puede provocar la no observación de algunos conformeros que se predicen teóricamente entre los más estables. Este problema de conformeros “perdidos” se explica a través del fenómeno de relajación a formas de menor energía por colisiones con átomos de gas inerte.

La relajación se produce cuando las barreras de interconversión no exceden de un cierto valor límite. Este valor umbral dependerá de las características de la superficie de energía potencial (energía de los mínimos, caminos de interconversión, alturas de las barreras) y el proceso de enfriamiento del *jet*.

Las investigaciones empíricas realizadas en sistemas en los que sólo interviene un grado de libertad de interconversión de torsión estiman que el valor umbral es del orden de  $\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, en sistemas donde intervienen varios grados de



libertad se proponen barreras cercanas a los  $1000\text{ cm}^{-1}$ . La determinación experimental de éstas barreras de interconversión es complicada.

El fenómeno de relajación se favorece con el uso de gases portadores pesados que hacen más efectivas las colisiones, como se pone de manifiesto en estudios de complejos intermoleculares de enlace de hidrógeno.

#### **III.2.3.4 Distribución de población entre confórmeros**

Se puede obtener información muy interesante sobre la distribución de población entre confórmeros a partir de la comparación de las intensidades relativas de las transiciones de rotación de las especies observadas.

Se admite que el enfriamiento en la expansión supersónica lleva a todos los sistemas moleculares al estado fundamental de vibración, la intensidad experimental de las transiciones del confórmero  $i$  será proporcional a las componentes del momento dipolar eléctrico  $p_\alpha$  ( $\alpha = a, b$  y  $c$ ) y a la población de la especie  $i$  en el *jet*.

Una comparación de las intensidades de las transiciones de rotación experimentales entre los distintos confórmeros dará por lo tanto una relación de las poblaciones en el *jet*.

#### **III.2.4 Espectrómetro y mediciones**

El estudio de moléculas en fase gas relevantes en sistemas biológicos se realizó con técnicas desarrolladas en el Grupo de Espectroscopia Molecular (GEM) de la Universidad de Valladolid (UVa), España.

En el año 1997 se construyó en Valladolid el primer espectrómetro MB-FTMW (Molecular Beam-Fourier Transform Microwave) (Alonso y col., 1997) basándose en las ideas originales de Flygare (Balle y Flygare, 1981) y en los avances realizados en el grupo de la Universidad de Kiel, Alemania dirigido por el Prof. Dreizler (Grabow, 1996). El primer equipo contaba con un resonador con sistema de inyección y el espectrómetro de microondas, tal como se presenta en la figura III.13. Sólo se podían estudiar muestras susceptibles de volatilización por calor. Desde entonces, esta configuración se ha ido renovando incorporando cambios en el sistema de vacío y en los componentes electrónicos.



**Figura III.13.** Aspecto general del espectrómetro de rotación y equipos accesorios. (a) Cámara de vacío donde se detectan las moléculas (b) Sistema de inyección para generar el *jet* supersónico (c) Espectrómetro de Microondas.

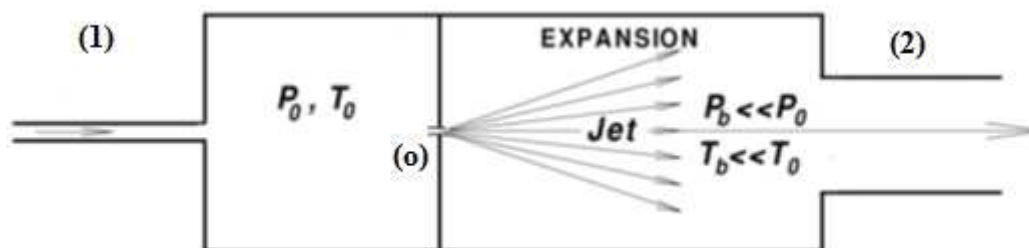
### III.2.4.1 Descripción del espectrómetro

Todos los instrumentos construidos tienen dos componentes básicos: la cámara de vacío en la que ingresa el sistema de inyección para la generación del *jet* supersónico (MB, Molecular Beam) y el espectrómetro de microondas con Transformada de Fourier (FTMW, Fourier Transform Microwave) para la polarización de las moléculas presentes en la expansión y la posterior detección de su emisión molecular. Ambos son acoplados a otros instrumentos que permiten aumentar la eficiencia y resolución de la técnica.

La cámara de vacío está formada por un tanque cilíndrico de acero inoxidable, que se evacua por su parte inferior con una bomba difusora de aceite apoyada por una bomba rotativa, permitiendo alcanzar un vacío de  $10^{-7}$  mbar. El *jet* supersónico (MB) se genera mediante la expansión adiabática de una muestra gaseosa diluida en un gas noble, a presiones relativamente altas (15 - 20 bares) a través de un pequeño orificio o tobera ( $< 1$  mm) en el seno de una cámara a muy baja presión ( $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  mbars). Si la relación de presiones supera un cierto valor límite, el gas alcanza a la salida la velocidad del sonido (figura III.14).

En la expansión, el movimiento térmico aleatorio de la muestra se transforma en un flujo direccional y la energía de los modos internos de la molécula se convierte en

energía cinética direccional debido a las colisiones que tienen lugar en las proximidades de la tobera. Estas colisiones tienden a disminuir las temperaturas efectivas de rotación ( $T_{\text{rot}} \sim 5\text{-}10\text{ K}$ ) y en menor medida las de vibración.



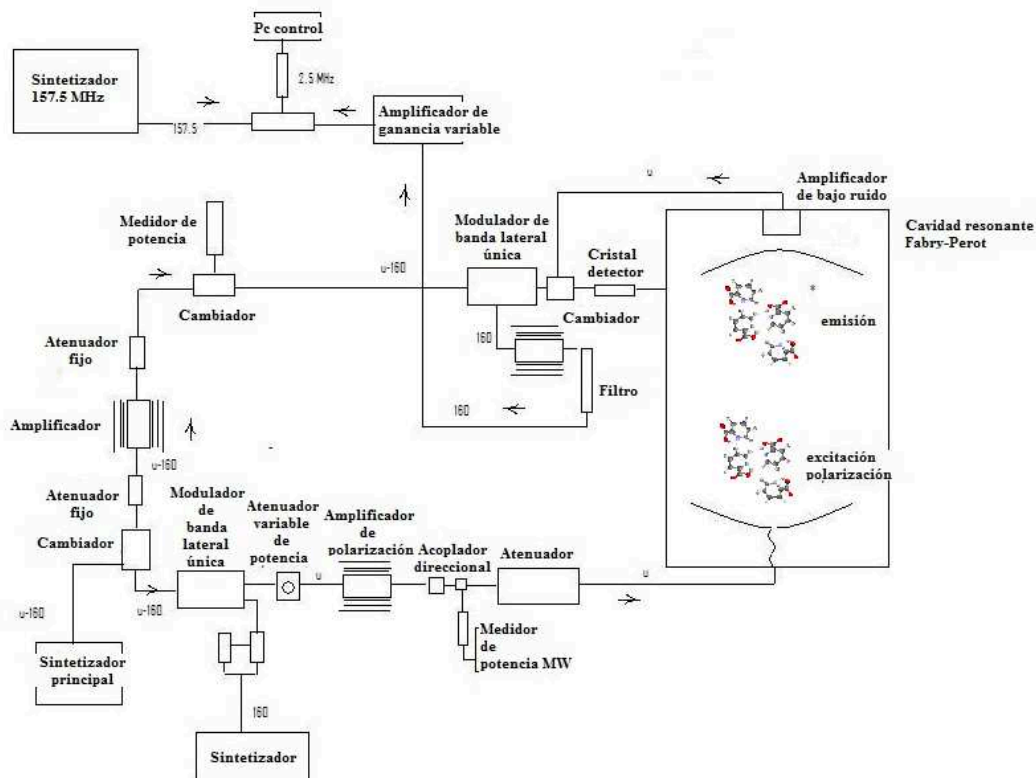
**Figura III.14.** Formación de un *jet* supersónico. El gas ingresa (1) a la cavidad con una presión inicial ( $P_0$ ) y una temperatura inicial ( $T_0$ ). Al pasar por un pequeño orificio (o) a la cavidad que se encuentra en vacío, se da la expansión supersónica siendo en las condiciones finales la presión y la temperatura ( $P_b$  y  $T_b$ ) significativamente menores, a la salida del gas (2).

De este modo, la expansión adiabática provoca un enfriamiento drástico que puebla tan sólo los niveles más bajos de rotación del nivel fundamental de vibración. Sin embargo, aunque las moléculas están rotacional y vibracionalmente enfriadas, la distribución de la población de confórmeros no lo está necesariamente y dependerá de las barreras de interconversión de un confórmero a otro. De esta forma, si las barreras de interconversión de un confórmero a otro son lo suficientemente altas, se pueden detectar independientemente los diferentes rotámeros aislados como estructuras estables congeladas en la expansión supersónica.

### III.2.4.2 Funcionamiento del equipo

El espectrómetro FTMW está compuesto por una serie de sintetizadores, atenuadores, amplificadores, moduladores y un sistema de detección (figura III.15). El funcionamiento del espectrómetro FTMW comienza con la generación de una radiación de microondas con un sintetizador ( $\nu \sim 160\text{ MHz}$ ), se mezcla en un modulador de banda lateral única con una señal de 160 MHz para generar la frecuencia de polarización  $\nu$ . Ésta se amplifica y se modula en pulsos por medio de un conmutador. Otro conmutador permite a la radiación acoplarse a la cavidad durante el período de polarización y abrir el sistema de detección durante el tiempo de emisión molecular. Transcurrido el tiempo necesario para la extinción de la radiación de polarización, se abre el sistema de detección. La débil señal de emisión molecular se amplifica y transforma en una frecuencia centrada

en 160 MHz, utilizando la radiación de microondas del sintetizador ( $\nu \sim 160$  MHz) como oscilador local.

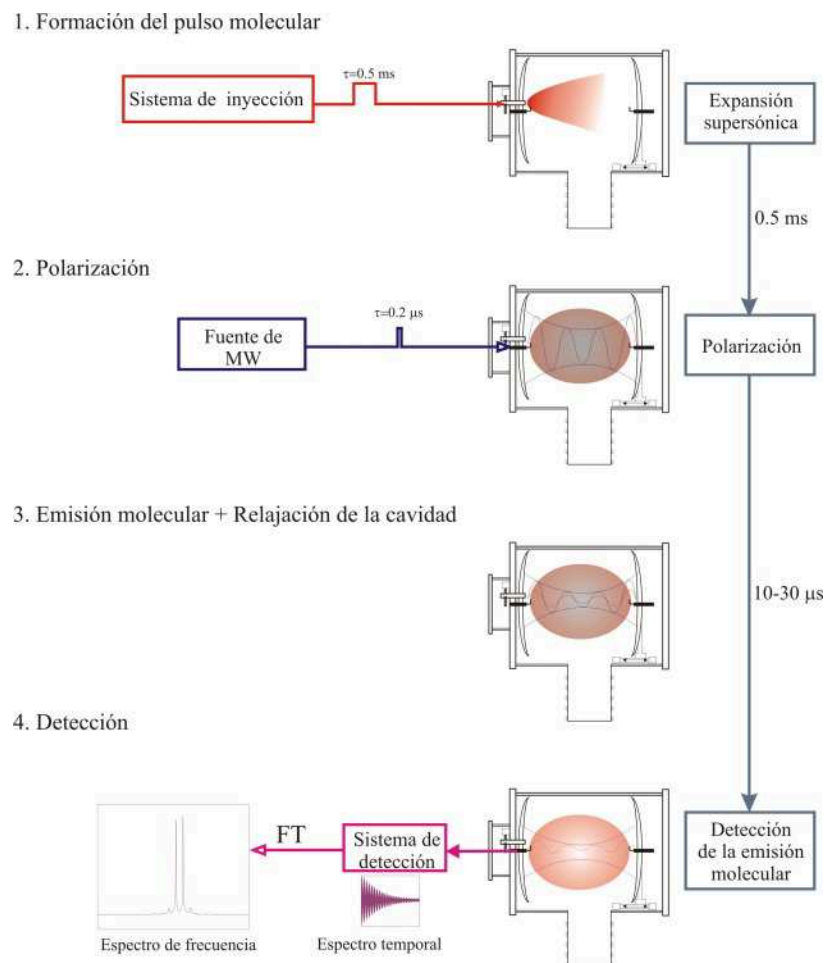


**Figura III.15.** Componentes y secuencia de funcionamiento del espectrómetro FTMW.

La señal centrada en 160 MHz se amplifica, filtra y convierte a una frecuencia de menor, entre 1 y 12.5 MHz. Para ello se utiliza un sintetizador de radiofrecuencia como oscilador local. La señal resultante es dirigida a un registrador de transitorios, instalado en una computadora compatible, cuya frecuencia de muestreo es de 25 MHz y su resolución de 16 k puntos de datos por muestra. La secuencia de pulsos del espectrómetro se controla por un generador-secuenciador de pulsos, estando todas las frecuencias en fase con un patrón de rubidio de 10 MHz. La velocidad de repetición de la secuencia de operación del instrumento puede alcanzar los 30 Hz.

La secuencia de operación cíclica del instrumento se muestra en la figura III.16 y consta de 4 etapas fundamentales:

- 1. Formación del pulso molecular.** Se realiza la apertura de la válvula de inyección durante un tiempo que oscila entre 0.1 y 1 ms para formar un *jet* supersónico paralelo al eje de la cavidad.
- 2. Polarización.** Se produce al aplicar un pulso de microondas resonante en la cavidad *Fabry-Pérot*. Esto provoca la polarización macroscópica de la muestra en la expansión supersónica.



**Figura III.16.** Secuencia general de operación del instrumento LA-MB-FTMW.

**3. Emisión molecular y relajación.** Cuando cesa el pulso de polarización, las moléculas emiten espontáneamente radiación coherente a las frecuencias de resonancia. Igualmente, se produce la relajación de la cavidad, pero mucho más rápida que la relajación molecular.

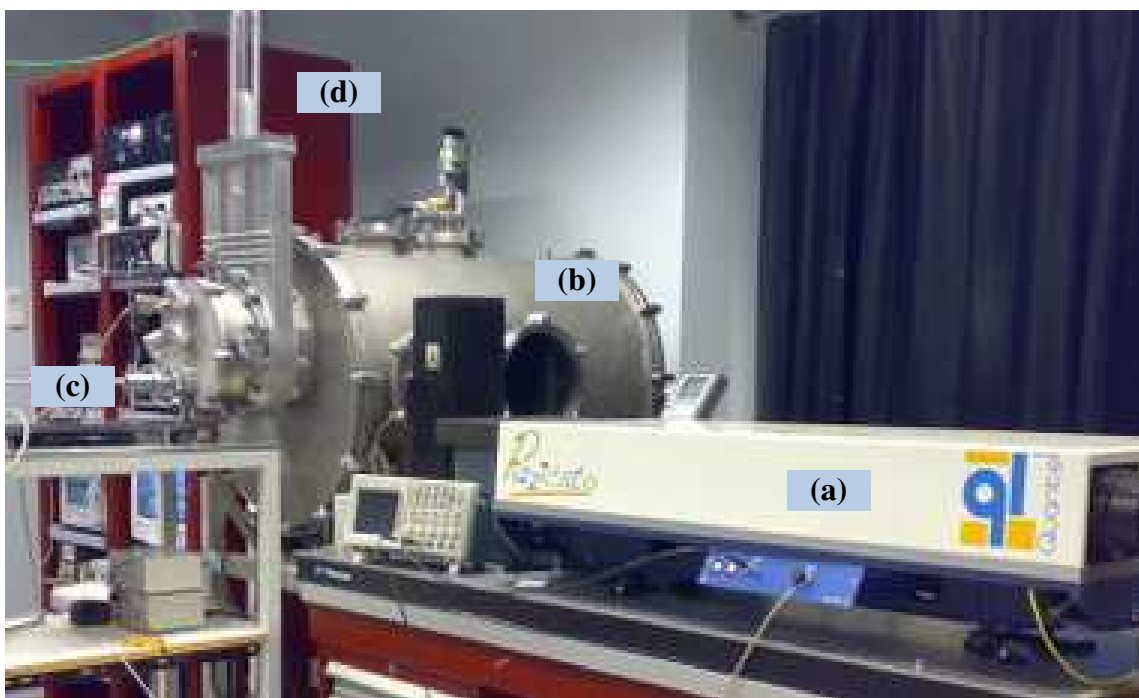
**4. Detección.** Tras un retardo necesario para que se extinga la energía acumulada en la cavidad, se registra la señal de emisión molecular en el dominio del tiempo. Posteriormente, mediante transformada de Fourier, se obtiene la señal en el dominio de frecuencias. Debido a la configuración coaxial del jet supersónico y el eje del resonador todas las señales están desdobladas por efecto Doppler (Hollas, 2004). Esto significa que en lugar de un solo pico en el espectro de rotación, la señal se ve partida al medio. El programa de visualización del instrumento FTMW++ desarrollado por la Compañía *National Instruments* posee una herramienta que permite medir exactamente el máximo de la señal.

### III.2.4.3 Diferentes configuraciones del espectrómetro

De las técnicas en tándem desarrolladas en el GEM, dos son las configuraciones experimentales que se han utilizado en los estudios realizados en el presente trabajo y que serán detalladas a continuación.

#### III.2.4.3.1 Espectrómetro LA-MB-FTMW

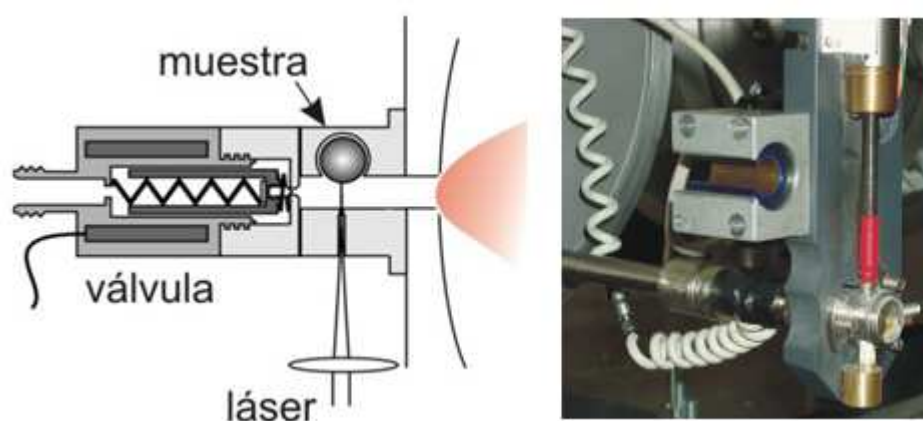
El espectrómetro LA-MB-FTMW (Lesarri y col., 2004) desarrollado y construido en el GEM está formado por la configuración que aloja en el interior de la cámara de vacío un resonador *Fabry-Pérot*. Las moléculas en estado sólido son ablacionadas con un LASER de picosegundos e ingresan mediante un jet supersónico a la cavidad resonante donde son irradiadas con microondas y caracterizadas mediante sus niveles rotacionales (figura III.17). El sistema de ablación LASER permite la vaporización de la muestra sólida sin exponer las moléculas a un aumento de temperatura. Esto facilita el estudio de moléculas termosensibles como son en general las biomoléculas. La vaporización sin afectar las propiedades estructurales y la brusca disminución de la temperatura en el jet supersónico, permiten la caracterización de moléculas en fase gas.



**Figura III.17.** Aspecto general del espectrómetro LA-MB-FTMW. (a) Módulo de ablación LASER -LA- (b) Cavidad resonante (c) Sistema de inyección Molecular Beam-MB- (d) Espectrómetro de rotación –FTMW-.

El resonador *Fabry-Pérot* está formado por dos espejos en disposición confocal que permiten la interacción entre la radiación de microondas y el jet supersónico. Uno de los espejos se encuentra fijo mientras que el otro se sitúa en un soporte móvil, accionado por un motor paso a paso (pasos de  $1,25 \mu\text{m}$ ) por lo que la distancia entre los espejos se puede ajustar permitiendo sintonizar la cavidad a la frecuencia de resonancia. En el centro de cada espejo se sitúa una antena de microondas en forma de L ( $\sim\lambda/4$ ) para introducir la radiación de microondas y recoger la señal de emisión molecular de la que se obtiene el espectro de rotación de las especies presentes en el jet mediante el espectrómetro FTMW que opera entre 5-18 GHz.

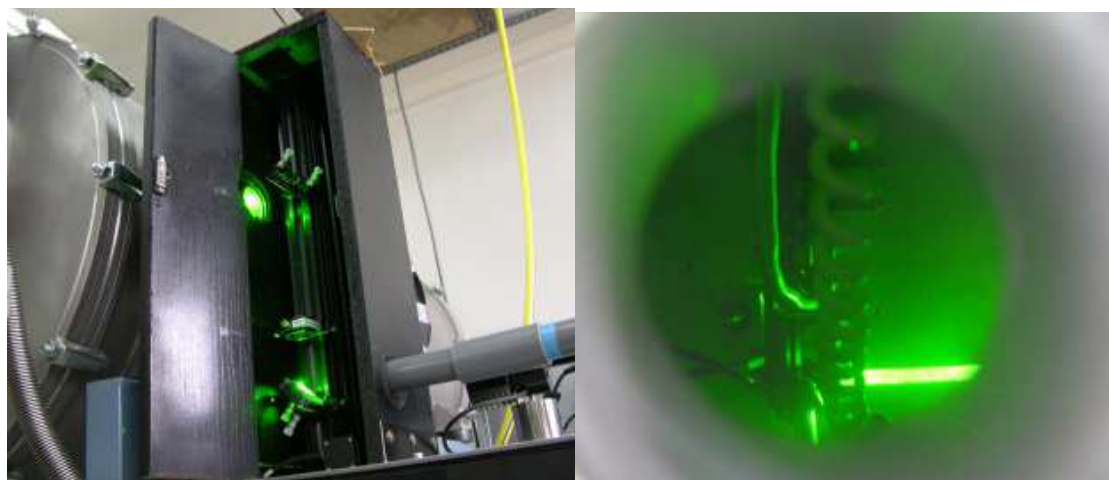
El módulo de ablación (figura III.18) está formado por una válvula de inyección y un soporte donde la barra sólida de muestra se sitúa verticalmente a la salida de la tobera. Un pulso láser de alta energía (Irradiancia =  $1\text{-}100 \text{ MW cm}^{-2}$ ) de un láser Nd:YAG de estado sólido, incide sobre la muestra sólida vaporizándola. Las moléculas erosionadas ingresan hacia el interior de la cavidad mediante un pulso de gas inerte que actúa como transportador, generando así la expansión supersónica. La muestra sólida se sitúa en un dispositivo motorizado que permite su rotación y traslación constante durante la medición. Con este dispositivo se asegura la calidad de la muestra vaporizada ya que el láser impacta en lugares diferentes de la barra. De ésta forma cada pulso láser incide sobre superficie que aún no ha sido ablacionada, haciendo más reproducible el experimento.



**Figura III.18.** Esquema y fotografía del inyector de ablación láser.

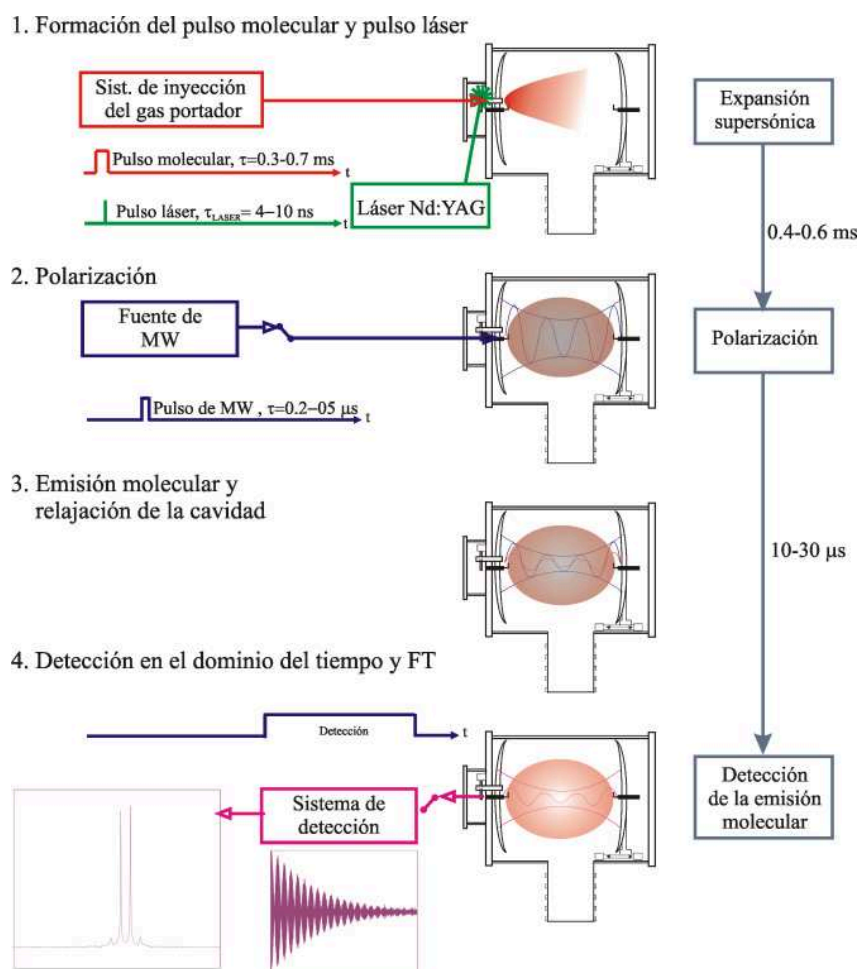
En este experimento es fundamental la focalización del haz láser en el módulo de ablación con la barra de muestra ubicada, mediante un dispositivo de espejos y lentes que conduce el haz dentro de la cavidad (figura III.19).





**Figura III.19.** Periscopio para dirigir el haz LASER dentro de la cavidad (izquierda) y haz LASER focalizado en el módulo de ablación (derecha).

La secuencia de operación del espectrómetro LA-MB-FTMW (figura III.20) incluye en este caso el pulso haz LASER para ablacionar la muestra. Este pulso tiene lugar tras un pequeño retardo respecto del pulso molecular (200-500  $\mu\text{s}$ ) y genera los productos de ablación.



**Figura III.20.** Secuencia de operación del espectrómetro LA-MB-FTMW.



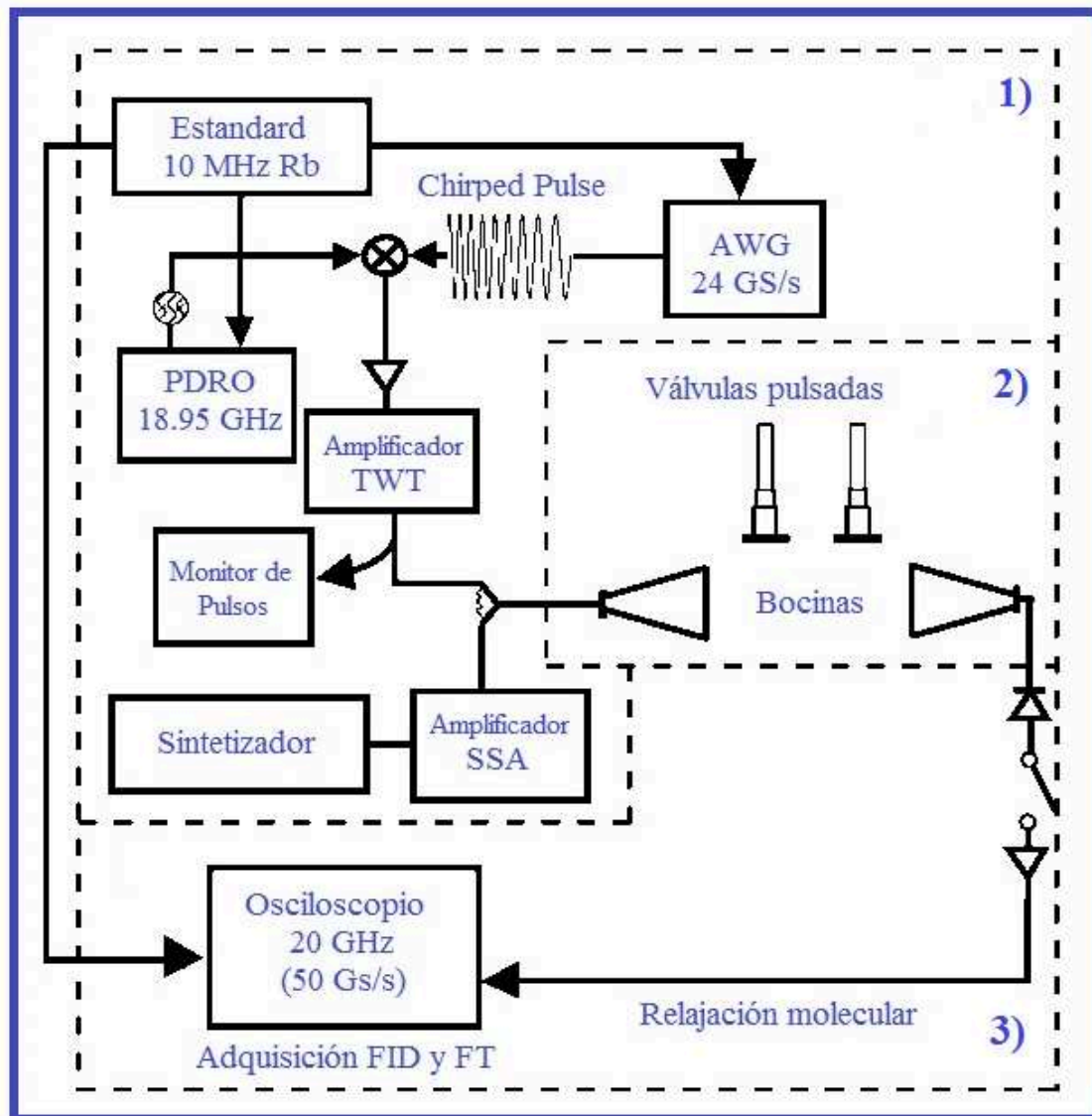
Desde el diseño original en 2002 (Lesarri y col., 2002), se han construido nuevas configuraciones incorporando sustanciales mejoras instrumentales. El ancho de pulso láser ha sido la mejora más significativa en las condiciones experimentales. Inicialmente, se utilizó un láser pulsado de estado sólido de Nd:YAG convencional de nanosegundos (5-10 ns). La utilización de pulsos láser más cortos minimiza los efectos de fotofragmentación incrementando la concentración de especies neutras en la pluma de ablación (Ashfold y col., 2004). En el año 2007 se incorporó el primer láser de Nd:YAG de pulso corto (100-200 ps), pudiéndose comprobar una mayor eficiencia en el proceso de ablación y una mejora importante de los experimentos espectroscópicos. Siguiendo con esta filosofía, se incorporó en el año 2009 un láser de picosegundos de pulso aún más corto (35 ps), constatando la tendencia positiva del experimento. El estudio de la forma neutral de prolina (Lesarri y col., 2002) y la posterior detección de dos nuevos conformeros constituye un resultado evidente de esta mejora (Mata y col., 2009).

#### **III.2.4.3.2 Espectrómetro CP-FTMW**

Como ya se ha mencionado al inicio de la sección III.2, el espectrómetro CP-FTMW (Chirped Pulse Fourier Transform Microwave) se basa en los mismos principios que el espectrómetro MB-FTMW. Sin embargo, existen dos diferencias claves que a continuación se describen y que tienen por objeto la generación de un pulso “chirped” esencial en la filosofía de funcionamiento. La primera radica en la sustitución del sintetizador de microondas que trabaja en el espectrómetro FTMW a frecuencia fija, por un generador arbitrario de onda digital que genera un ancho de banda de hasta 11 GHz mediante un rápido barrido lineal de la frecuencia (en un microsegundo). En segundo lugar y para no limitar el ancho de banda, se prescinde del resonador *Fabry-Pérot* y la polarización y detección se efectúa mediante un sistema de dos bocinas (antenas) de microondas de banda ancha.

El esquema del espectrómetro CP-FTMW con sistema de ablación LASER (figura III.21) diseñado y optimizado en el GEM (Mata y col., 2012) se basó en la idea original del grupo del Dr. Pate de la Universidad de Virginia, E.E.U.U. (Brown y col., 2008). El generador de onda arbitraria (AWG) de 24 GS/s produce un barrido lineal de la frecuencia de 0.5-12 GHz en 1  $\mu$ s (“chirped pulse”). Este pulso se lleva a un

mezclador (triple-balanced mixer) donde se une con una señal de 18.95 GHz generada por un oscilador dieléctrico resonante sincronizado en fase (PDRO).



**Figura III.21.** Esquema del espectrómetro CP-FTMW de 11 GHz. 1) El generador de onda arbitraria AWG genera un pulso de excitación (“chirped pulse”) que se convierte a alta frecuencia (7-18 GHz) y se amplifica. 2) El pulso se transmite dentro de la cámara de vacío donde interacciona con las moléculas en un jet pulsado. 3) La señal de relajación FID se amplifica, se mezcla y finalmente se digitaliza en un osciloscopio rápido.

El resultado es un pulso de señal que realiza un barrido entre 7 y 18 GHz en un único evento. La amplificación de potencia del pulso de excitación se desarrolla con un amplificador TWT (tubo de ondas progresivas) de 300 W. El pulso amplificado se lleva mediante guía de onda hasta una bocina de banda ancha situada en el interior de la cámara de alto vacío donde la radiación emitida por la antena interacciona con el jet supersónico pulsado. Una vez que cesa el pulso de polarización, las moléculas en el *jet* emiten radiación en todo el intervalo de frecuencias sondeado (7-18 GHz). Esta

radiación se recoge mediante otra antena idéntica a la anterior situada en la cámara de vacío. A la salida de esta antena está situado un diodo PIN que atenúa la señal de microondas cuando ésta excede de un determinado límite de potencia y un conmutador de microondas.

Esto permite proteger el detector cuando se emite el pulso de polarización de alta potencia. La señal resultante de relajación molecular (FID) se amplifica y se digitaliza directamente en un osciloscopio de 50 GS/s con un ancho de banda de hardware de 20 GHz.

Además, se han desarrollado dos estrategias para incrementar la sensibilidad y reducir el consumo de muestra.

La primera de ellas consiste en introducir la muestra en la cámara de vacío mediante dos válvulas pulsadas en lugar de una, ya que la relación señal/ruido se incrementa en proporción al cuadrado del número de toberas. A diferencia de los anteriores espectrómetros, la muestra se inyecta de forma perpendicular al eje de propagación de microondas, no existiendo en este caso efecto Doppler.

La segunda consiste en adquirir 10 espectros de rotación de banda ancha en cada ciclo de inyección de muestra de 500  $\mu$ s de duración, aprovechando una de las características del osciloscopio digital que segmenta la memoria y permite que los múltiples registros cortos se unan en un único registro largo. La reproducibilidad de la fase del experimento se logra referenciando todas las fuentes de radiación y el osciloscopio digital a un oscilador de Rb de 10 MHz.

Los dos instrumentos descritos se utilizaron en la caracterización espectroscópica de ácido picolínico y nicotinamida, ligandos de iones metálicos de interés biológico, como se detalla en el capítulo V.



## *Capítulo IV*

---

## IV. METALOPROTEÍNAS

### IV.1 Introducción

#### IV.1.1 Aspectos generales de metaloenzimas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones bioquímicas en células de todos los organismos. La maquinaria catalítica de una enzima está ubicada en un sitio activo relativamente pequeño donde se une el sustrato y es transformado químicamente en producto (Frey y Hegeman, 2007). La clasificación de las enzimas se realiza de acuerdo al Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB) en acuerdo con la Comisión Conjunta de Nomenclatura Bioquímica (*Joint Commission on Biochemical Nomenclature*, JCBN). Estas se agrupan de acuerdo a los cambios que producen sobre el sustrato en: Óxido-reductasas (EC1) Transferasas (EC2) Hidrolasas (EC3), Liasas (EC4), Isomerasas (EC5) y Ligasas (EC6).

Las proteínas se dividen en dos clases principales basándose en su composición: proteínas simples y proteínas conjugadas. Las proteínas simples son aquellas que por hidrólisis producen solamente aminoácidos, sin ningún otro producto principal, orgánico o inorgánico. Las proteínas conjugadas son aquellas que por hidrólisis producen no solamente aminoácidos, sino también otros componentes orgánicos o inorgánicos. La porción no aminoácida de una proteína conjugada se denomina grupo prostético (Nelson y Cox, 2001).

Las metaloproteínas son proteínas que contienen un centro metálico en su estructura por lo tanto, una enzima que contiene un ion metálico en su estructura recibe el nombre de *metaloenzima*. Las metaloenzimas se pueden dividir en dos grupos: i) aquellas en las que el metal está fuertemente unido a la proteína y que son las verdaderas metaloenzimas; ii) aquellas que contiene al metal en forma fácilmente disociable y que suelen llamarse enzimas activadas por metales. Las metaloenzimas pueden aislarse con el grupo prostético ligado a la proteína, mientras que el metal en general se disocia en las enzimas activadas por metales durante el proceso de purificación, lo que conduce a la pérdida de la actividad. Existen metaloenzimas donde

el sitio activo está formado por un cofactor orgánico no proteico como es el caso de las flavoenzimas (Nelson y Cox, 2001). La clasificación de estas proteínas como metaloenzimas es debido a que contienen además centros metálicos, que si bien no interactúan con el sustrato, participan activamente en la catálisis mediante reacciones de transferencia electrónica por ejemplo la enzima APSr. Existen otras metaloenzimas en los cuales el ion metálico no participa ni en la interacción con el sustrato ni en la catálisis, pero que su ausencia determina la pérdida parcial de la actividad enzimática. En estos casos el rol del ion metálico es meramente estructural, un ejemplo de ello es la enzima ATPs, que contiene en su estructura un ion Zn (II) y/o Co (II). Ambas enzimas, APSr y ATPs son objeto de estudio del presente trabajo de tesis.

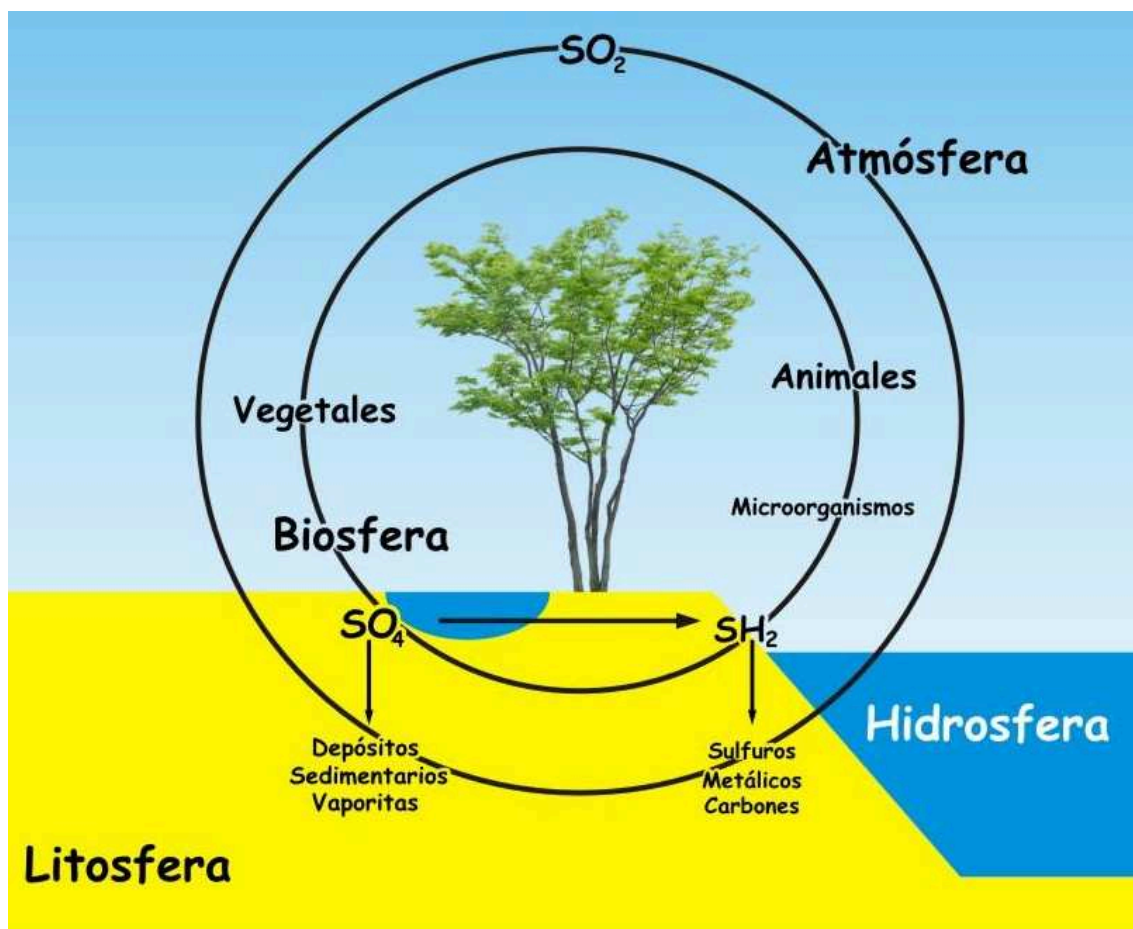
Las metaloenzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y en todos los niveles de organización y complejidad de los organismos por la importancia de la función que cumplen (Atkins y col., 2006). En particular, las metaloenzimas bacterianas constituyen un grupo de interés de estudio debido a que participan activamente en los distintos ciclos biogeoquímicos que ocurren en la naturaleza como ser los ciclos del nitrógeno, del carbono y del azufre, entre otros, sumado a su potencial uso en bioremediación como es el caso de las bacterias que se utilizan para eliminar y/o degradar elementos tóxicos para el medioambiente (Lovley, 2002). A continuación se describe el ciclo biogeoquímico del azufre dado que las dos metaloenzimas estudiadas en este trabajo participan en este ciclo.

#### **IV.1.2 Ciclo biogeoquímico del azufre**

El azufre, un componente esencial para la vida, es un elemento ubicuo de la Tierra que cicla entre los estados de oxidación (+VI) y (-II). Se presenta mayormente como azufre elemental, sulfuro y sales de sulfato (Klotz y col., 2011). Se encuentra en la atmósfera formando compuestos como SH<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub> o SO<sub>3</sub> y en la hidrosfera bajo la forma de ión SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> y compuestos orgánicos azufrados como por ejemplo (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S. En medios anaeróbicos la principal forma en que se encuentra el azufre es como SH<sub>2</sub>, SH<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-2</sup> o S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>, como también sulfuros metálicos, algunos de los cuales son hidrosolubles (Frausto da Silva y Williams, 2001). En la litósfera hay una amplia variedad de minerales que contienen azufre en la forma de sulfatos y sulfuros y en menor medida azufre elemental (Butcher y col., 1992).

De todo el azufre presente en la corteza terrestre, cerca del 75% del azufre es incorporado al llamado ciclo biogeoquímico del azufre que se resume en la figura IV.1. Como ocurre con todos los elementos que constituyen moléculas biológicas, el S es transformado y trasladado hacia y desde la biósfera por medio de una combinación de eventos biológicos y químicos.

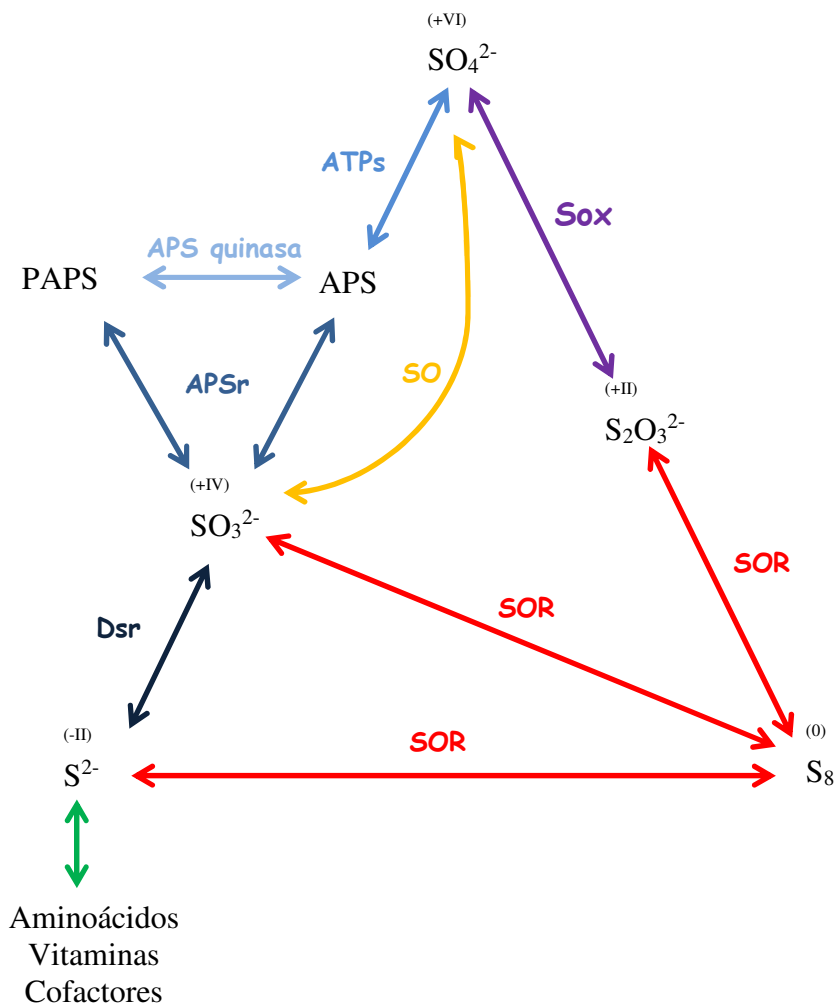
La principal fuente natural de  $\text{SO}_2$  proviene de la actividad volcánica. Otra fuente importante es la industrial, factor introducido por las actividades económicas del hombre y que tiene un alto impacto en los niveles de concentración en la atmósfera. La combustión de compuestos sulfurados (principalmente derivados del petróleo) provoca la liberación de óxidos de azufre y sulfuro de hidrógeno hacia la atmósfera. Los compuestos de azufre liberados se depositan sobre árboles y construcciones bajo la forma de sulfuros y ácido sulfúrico y llegan al suelo bajo la forma de sulfatos por efecto de la lluvia (Butcher y col., 1992).



**Figura IV.1.** Ciclo biogeoquímico del azufre. La circulación del elemento en diferentes estados de oxidación se produce entre atmósfera, biosfera, litósfera e hidrosfera. En la recirculación del elemento presente en la atmósfera (círculo exterior) intervienen procesos fisicoquímicos. El reciclado desde la biosfera (círculo interior) se realiza con activa participación de microorganismos.

Una vez en el suelo, una fracción percola hasta las aguas de río y finalmente llegan hasta el mar, por lo que el traslado por evaporación de estas aguas sobre la tierra provoca el movimiento del azufre hacia la biósfera. El azufre que queda retenido en el suelo, es tomado por microorganismos de diferentes géneros que lo oxidan o reducen de acuerdo a sus posibilidades metabólicas permitiendo su fijación en compuestos orgánicos o inorgánicos mediante la vía asimilativa o generando sulfuro de hidrógeno a través de la vía desasimilativa que retorna a la atmósfera.

Varias de las transformaciones reductivas y oxidativas que experimenta el azufre en el ciclo son llevadas a cabo por microorganismos procariontas y en menor medida por eucariotas (Leyh, 1993; Friedrich y col., 2001).

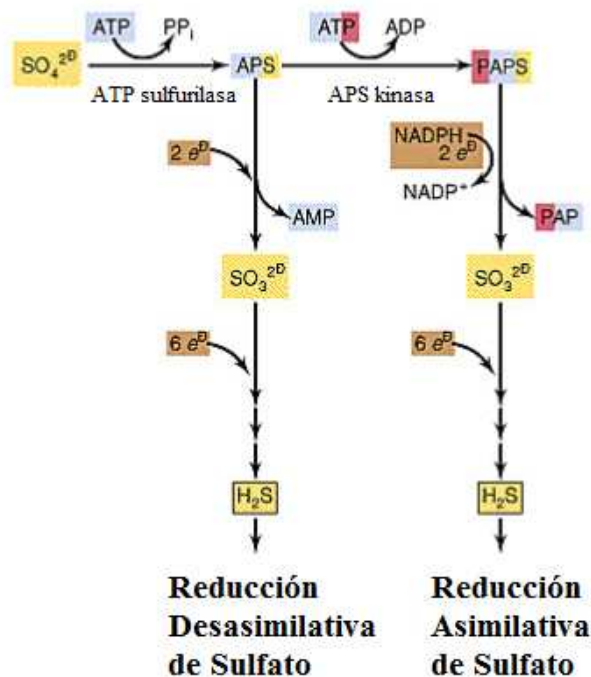


**Figura IV.2.** Cambios de estado de oxidación del azufre durante el ciclo biogeoquímico realizado por bacterias. En cada paso está indicada la enzima que cataliza la reacción.

Todos los procesos de óxido-reducción realizados por microorganismos son resumidos en la figura IV.2 junto con las enzimas que participan. Tal como se presenta en la figura IV.2 el azufre es oxidado o reducido a diferentes especies químicas de



acuerdo al sistema enzimático que posee cada organismo. La archaia termoacidófila *Acidianus ambivalens* puede metabolizar azufre elemental ( $S_8$ ) en una reacción catalizada por la enzima Sulfuro Oxigenasa Reductasa (SOR), lo que lleva a su desproporción en sulfuro ( $S^{2-}$ ), sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) y tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) (Urich y col., 2004) (figura IV.2, flechas rojas). El tiosulfato puede ser posteriormente oxidado a sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) por el sistema multienzimático Sox (flecha violeta), una enzima que fue aislada de microorganismos tales como *Paracoccus pantotrophus* (Rother y col., 2008) y bacterias azufradas verdes (Gregersen y col., 2011). El sulfito puede ser oxidado a sulfato a través de distintas vías. Una es catalizada por la enzima Sulfito Oxidasa (SO) (Schrader y col., 2003). Esta es una enzima que contiene un grupo hemo y pertenece a la familia de las enzimas mononucleares de Mo y que cataliza la oxidación de sulfito a sulfato (figura IV.2, flecha amarilla). La otra vía posible no involucra una oxidación directa (flechas celestes y azules) e involucra las enzimas ATP sulfurilasa (ATPs), Adenosín 5'-fosfosulfato reductasa (APSR) y APS quinasa. El sulfito puede también ser reducido a sulfuro en una reacción catalizada por la enzima sulfito reductasa desasimilatoria (figura IV.2, flechas azul oscura) (Dsr) en los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfurubidium*, *Desulfosulfidum*. Como se indica en la figura mediante dobles flechas, todos estos procesos enzimáticos son reversibles.



**Figura IV.3** Vías de reducción de sulfato: desasimilativa y asimilativa. El sulfato es activado mediante una molécula de ATP y puede continuar su vía de reducción por dos caminos enzimáticos diferentes dependiendo el sistema enzimático que posea el microorganismo que interviene en la metabolización.

La figura IV.3 muestra más en detalle las dos vías por las que el ión sulfato se reduce a sulfuro (camino azul-celeste en la figura IV.2). Dado que el sulfato es una molécula con baja reactividad, el paso inicial de la reducción es la activación del sulfato con ATP (Adenosine Triphosphate) en una reacción catalizada por la enzima ATP sulfurilasa (ATPs). Se inicia con la formación de APS (Adenosine 5'-phosphosulphate). En este punto la vía puede continuar con la reducción a sulfito mediante la acción de APSr (vía desasimilativa del sulfato) o bien pasar por un intermediario, PAPS (3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate) generado por la acción de APS quinasa (vía asimilativa).

En el proceso de fijación del azufre participan, además de los microorganismos ya mencionados, una amplia variedad de microorganismos que son capaces de utilizar las especies reducidas del azufre (sulfuro, azufre elemental y tiosulfato) para generar electrones con fines energéticos y producir sulfato como principal producto final. Entre estos se destacan varios linajes de bacterias, entre los que se incluyen bacterias *gram-positivas* (*Desulfotomaculum*) y bacterias *gram-negativas* reductoras del sulfato (BRS) de los géneros *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus* y *Desulfosarcina* y el archaea *Archaeoglobus fulgidus* (Stetter, 1988). Estos organismos pueden utilizar el ión sulfato para sintetizar aminoácidos, vitaminas y cofactores entre otros.

Las BRS son capaces de utilizar una variedad de dadores de electrones y acoplar la oxidación de compuestos con la reducción de sulfato utilizándolo como aceptor final de electrones en la respiración. Las mismas, generan cantidades suficientes de SH<sub>2</sub> como para mantener el crecimiento de las bacterias oxidantes del azufre y de sulfuro y de esta manera generar un ecosistema microambiental consistente de bacterias interdependientes el cual recibe el nombre de *sulfuretum* (Postgate, 1968). Además, los géneros *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* y *Desulfovibrio* utilizan al sulfato como aceptor de los equivalentes de reducción generados durante el metabolismo.

Las BRS son significativos reguladores de una variedad de procesos en suelos, incluyendo la remoción de materia orgánica y la biodegradación de poluentes aromáticos clorados en suelos anaerobios, entre otros.

Uno de los efectos nocivos de las BRS es la Corrosión Inducida Microbiológicamente (MIC) favoreciendo procesos corrosivos de tuberías y equipos de acero al carbono causando un gran impacto económico y ambiental (Devanathan y Stachurski, 1962).

Por otra parte, las BRS son capaces de reducir varios metales y por lo tanto proveer una medida efectiva para la *bioremediación* de metales tóxicos como el uranio (Lovley, 2003). Particularmente, el género *Desulfovibrio* es uno de los encontrados con mayor frecuencia en los casos de Corrosión Inducida Microbiológicamente (MIC) y por ende, uno de los más estudiados.

Aproximadamente 60 especies han sido identificadas y los genomas de *D. vulgaris*, *D. Hildenboroughy*, *D. desulfuricans* G20 (a ser reclasificado como *D. alaskensis*) ya han sido publicados.

### **IV.1.3 ATP sulfurilasa y APS reductasa**

Como se explicó en la sección anterior dos enzimas claves de la vía reductiva del azufre son ATP sulfurilasa y APS reductasa. En este trabajo de tesis se estudiaron estas dos enzimas aisladas del organismo reductor de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* (*DdATPs* y *DdAPSr*, en adelante).

El objetivo general es contribuir al conocimiento de metaloproteínas que participan en el ciclo biogeoquímico del azufre a nivel molecular, específicamente de los procesos catalíticos en los que participan estas dos enzimas, con especial énfasis en su caracterización fisicoquímica. La concreción de este objetivo implicó distintos pasos experimentales: a) crecimiento de la cepa y obtención de biomasa, b) purificación a grado electroforético de las enzimas, c) determinación de las propiedades moleculares, d) caracterización cinética y e) caracterización espectroscópica.

Dado que los centros metálicos y/o cofactores orgánicos son paramagnéticos en ciertos estados redox de las dos metaloenzimas, se hace un exhaustivo uso de la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR). Los puntos (a) y (b) son tratados en conjunto para ambas enzimas. Los demás serán tratados en las secciones siguientes para cada metaloproteína en particular.

## **IV.2 Aislamiento de *DdATPs* y *DdAPSr***

### **IV.2.1 Microorganismo**

Las metaloproteínas que se estudiaron fueron obtenidas a partir de la cepa *Desulfovibrio desulfuricans* subespecie *desulfuricans*, LMG 7529<sup>T</sup>, adquirida al *Belgian*

*Coordinated Collections of Microorganisms Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent*. Esta cepa es equivalente a la clasificada como *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577. Las células de *D. desulfuricans* se cultivaron a 30°C en condiciones de cultivo estático, en anaerobiosis bajo atmósfera de nitrógeno por un período de 7-10 días. Las bacterias se cultivaron con el medio de cultivo descrito en Anexo I. La condición de anaerobiosis se controló con el color del medio de cultivo que vira de rosado intenso a gris en ausencia de oxígeno. La atmósfera libre de oxígeno se logró mediante un sistema de conexión a gas nitrógeno envasado.

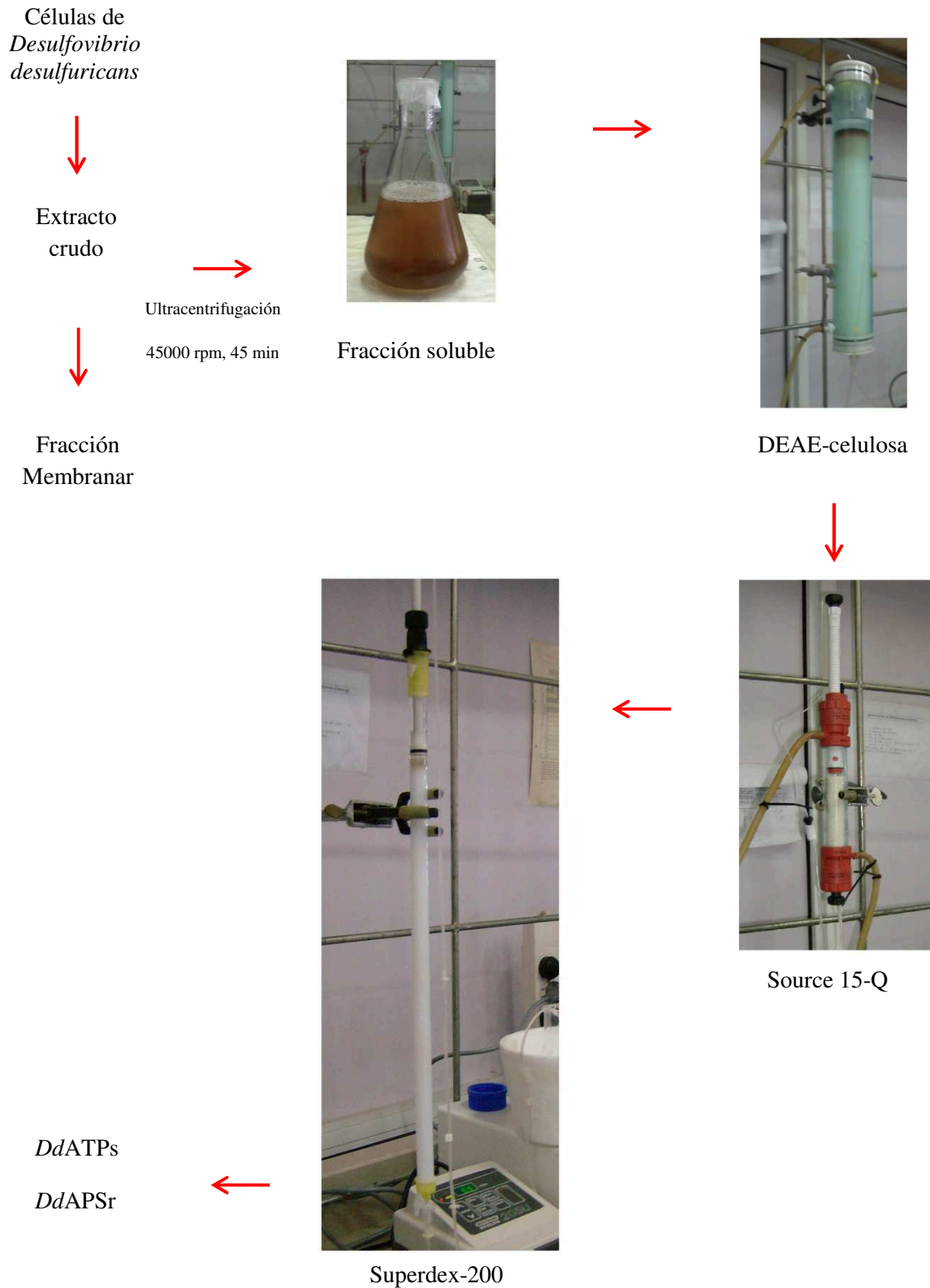
#### IV.2.2 Purificación de las enzimas

Se cultivó y recolectó biomasa suficiente para realizar la purificación. La masa de células obtenidas (169,7 g) se separó del medio de cultivo mediante centrifugación a 6000 rpm y 4°C.

El *pellet* celular fue lavado con *buffer* 100 mM TRIS-HCl (tris-hidroximetilaminometano) pH 7.6 y se centrifugó nuevamente. Las células se resuspendieron con 500 mL de *buffer* Tris-HCl 10 mM pH 7,6. Esta suspensión celular fue tratada con ultrasonido durante 1 h utilizando un sonicador de punta (SONICS) provisto con una sonda de 25 mm de diámetro. Se aplicó una potencia 300 W (40%) en intervalos de 4 tiempos (40 s) de pulsos y 4 tiempos (40 s) de espera en baño de hielo.

El extracto crudo obtenido se centrifugó a 45000 rpm y 4°C durante 10 minutos en ultracentrífuga Beckman Coulter Optima LE-80K (rotor 90Ti) en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario; para separar la fracción soluble (periplasmática + citoplasmática) del *pellet* compuesto de membranas. La fracción soluble (sobrenadante de la ultracentrifugación) fue transferida a cintas de diálisis, las cuales fueron sumergidas durante *ca.* 16 h (*overnight*) en 5 L de *buffer* 10 mM Tris-HCl pH 7,6 + 10  $\mu$ M  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  con agitación constante a 4°C, ésta acción se realizó para sustituir por iones  $\text{Co}^{2+}$  los cationes de  $\text{Zn}^{2+}$  presentes en *DdATPs* (Latt y Vallee, 1971). Se centrifugó el contenido de las cintas para eliminar precipitados que interfirieran durante la purificación mediante cromatografía líquida.

La purificación de *DdATPs* y *DdAPSr* hasta grado electroforético se realizó a 4°C en condiciones aeróbicas mediante un protocolo de 3 pasos resumidos en la figura IV.4.



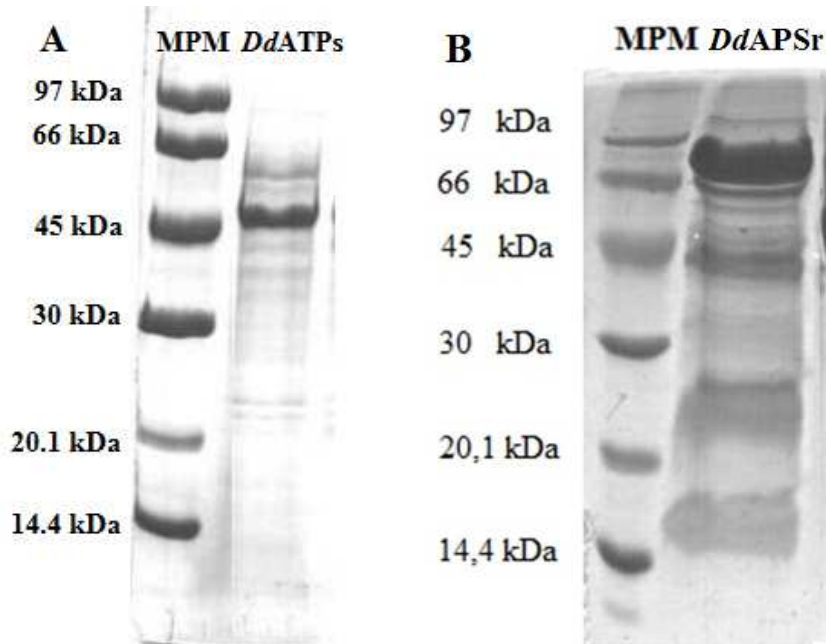
**Figura IV.4** Protocolo de aislamiento de *DdATPs* y *DdAPSr*. Las células cultivadas fueron sonicadas y ultracentrifugadas. Se almacenó el pellet conteniendo membranas. Se procedió con la purificación de las metaloproteínas de interés presentes en la fracción soluble. Se sembraron las muestras en el siguiente orden: Columna *DEAE-Celulosa* (A), Columna *Source 15Q* (B) y Columna *Superdex 200* (C).

El extracto soluble se sembró en una columna de intercambio iónico débil *DEAE-Celulosa* (dietilaminoetil) *Amersham Pharmacia Biotech AB* equilibrada con *buffer* 10 mM Tris-HCl pH 7,6.

Durante el proceso de purificación se identificaron además de las proteínas de interés otras proteínas que no fueron caracterizadas. El citocromo  $c_3$  (tetrahémico) y el  $c_{553}$  (monohémico) no se unen y eluyen juntos (Aubert y col., 1998). A una molaridad de *buffer* entre 75 y 100 mM, eluye una banda rojo intenso. Ésta fracción contiene Adenilato quinasa, una proteína de Co y distintos tipos de proteínas hémicas (ver Anexo II). Las fracciones que contienen *DdATPs* fueron colectadas alrededor de 100 mM, la cual fue detectada a través de ensayos de actividad enzimática específica (ver sección IV.3.3.5).

Alrededor de 250-300 mM se obtienen las fracciones que contienen *DdAPSr*, la cual fue identificada por su espectro UV-vis característico (ver figura IV.22 en sección IV.4.5). Todas las fracciones con mayor concentración de las enzimas de interés, se identificaron a partir de ensayos cinéticos, espectroscopia UV-vis y SDS-PAGE. Se mezclaron y concentraron por centrifugación en unidades de ultrafiltración 30K Amicon© Ultra a 4 °C. Cada una de las fracciones se inyectaron en una segunda columna de intercambio aniónico fuerte, *Source 15Q* (1,6 × 13 cm, *Amersham Pharmacia Biotech AB*), previamente equilibrada en 20 mM Tris-HCl pH 7,6. La elusión se llevó a cabo con un gradiente lineal de 20-600 mM Tris-HCl pH 7,6. Este segundo paso de purificación permitió mejorar el grado de pureza de las fracciones que contenían las proteínas a caracterizar. El *buffer* de las fracciones con mayor pureza en las enzimas se cambió a un *buffer* 20 mM Tris-HCl pH 7,6 + 200 mM NaCl, y se concentraron por ultrafiltración, obteniéndose *DdATPs* de color azul claro y *DdAPSr* de color rojizo-amarronado. Finalmente, estas muestras se sembraron en una columna *Superdex 200* (1,5 × 42 cm, *Amersham Pharmacia Biotech AB*), con lo que se obtuvieron las proteínas con una pureza a grado electroforético (figura IV.4 A y B) usando como eluyente 200 mM en Tris-HCl 20 mM pH 7,6.

La figura IV.5 muestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 12% de las proteínas obtenidas en el último paso de purificación. *DdATPs* es un homotrímero que en el gel se observa como una única banda de 47 kDa. *DdAPSr* es un heterodímero, la cadena  $\alpha$  de 75 kDa se observa como una banda muy intensa y la subunidad  $\beta$  más débil de 18 kDa.

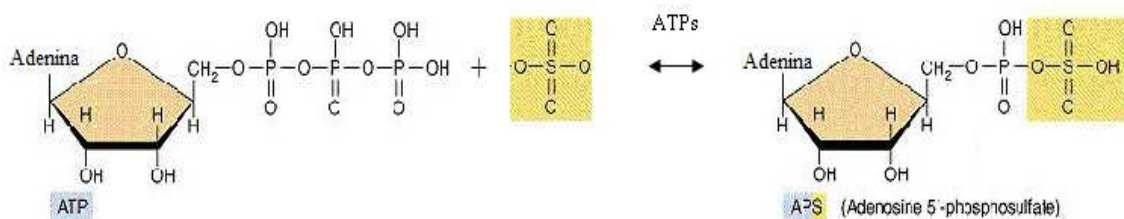


**Figura IV.5.** Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE) al 12%. MPM, Marcador de Peso Molecular. A) *DdATPs*: Se observa una única banda de ~ 47 kDa. B) *DdAPSR*: Se observa una banda muy intensa de ~ 75 kDa.

### IV.3 ATP sulfurilasa

#### IV.3.1 Clasificación de la enzima

Como se explicó en la introducción, el sulfato es una molécula no reactiva que debe ser activada (Furusaka, 1961), proceso que es realizado por la enzima ATPs (Wilson y col., 1961; Robbins, 1958). Esta enzima cataliza la transferencia y el acoplamiento del motivo adenosina 5'-fosforil del ATP con sulfato de acuerdo con la reacción presentada en la figura IV.6 (Bandurski y col., 1956; renosto y col., 1990). ATP sulfurilasa se clasifica con el código EC 2.7.7.4: 2, “transferasas”; 7, “transferencia de grupos funcionales”; 7, “nucleotidiltransferasas”; 4, “sulfato adenililtransferasa”.



**Figura IV.6.** Reacción catalizada por ATPs. El ATP es clivado en un fosfato, lugar que ocupa la molécula de sulfato permitiendo su activación.

Las enzimas que catalizan esta reacción están ampliamente distribuidas en la naturaleza, son muy heterogéneas y han sido encontradas en organismos con diferentes niveles de organización.

### IV.3.2 Comparación de *DdATPs* con *ATPs* de diferentes organismos

En general *ATPs* ha sido aislada a partir de bacterias, hongos, levaduras y plantas.

Estas enzimas se encuentran en animales formando parte de un complejo enzimático bifuncional denominado PAPS sintasa con actividad de *ATPs* y *APS* quinasa (Gay y col, 2009). La región N-terminal del aminoácido-268 de la PAPS sintasa humana, se asemeja a *APS* quinasa de varios organismos, sobre la base de la homología de secuencia de aminoácidos observada entre organismos inferiores (Venkatachalam, 2003).

La enzima *ATP* sulfurilasa ha sido purificada de diversas fuentes existiendo en algunos casos estructura cristalina reportada. La tabla IV.1 muestra un resumen de las distintas *ATPs* obtenidas de organismos eucariotas y procariotas incluyendo el contenido de metales y tipo de estructura cuaternaria.

Tal como se observa en la tabla IV.1, las *ATPs* tanto de eucariotas como procariotas pueden formar agregados con diferente número de subunidades, como ser monómeros, dímeros, trímeros y/o hexámeros. Además algunas han sido cristalizadas por lo que en la tabla aparece el código pdb (código perteneciente a la base de datos Protein Data Bank).

En el caso de eucariotas, específicamente para *H. sapiens*, la enzima que cataliza la reacción es un complejo multienzimático. Aproximadamente la mitad de las *ATPs* son metaloproteínas y cuatro de ellas contienen iones metálicos de transición en su estructura: Zn, Co y Cd. Particularmente la *ATPs* de *S. cerevisiae* (*ScATPs*) ha sido ampliamente estudiada (Hawes y Nicholas, 1973; Ullrich y col., 2001; Lalor y col., 2003) y es un monómero que contiene Co. La *ATPs* de *T. thermophilus* (*TtATPs*), es un homodímero que contiene Zn en su estructura (Taguchi y col., 2004).

Dado que *DdATPs* contiene Zn o Co presumiblemente en el sitio de coordinación (Gavel y col, 1998) y no se dispone de la estructura cristalina de la misma, se realizó una comparación de las secuencias primarias de las proteínas con estructura cristalina reportada (*ScATPs* y *TtATPs*).



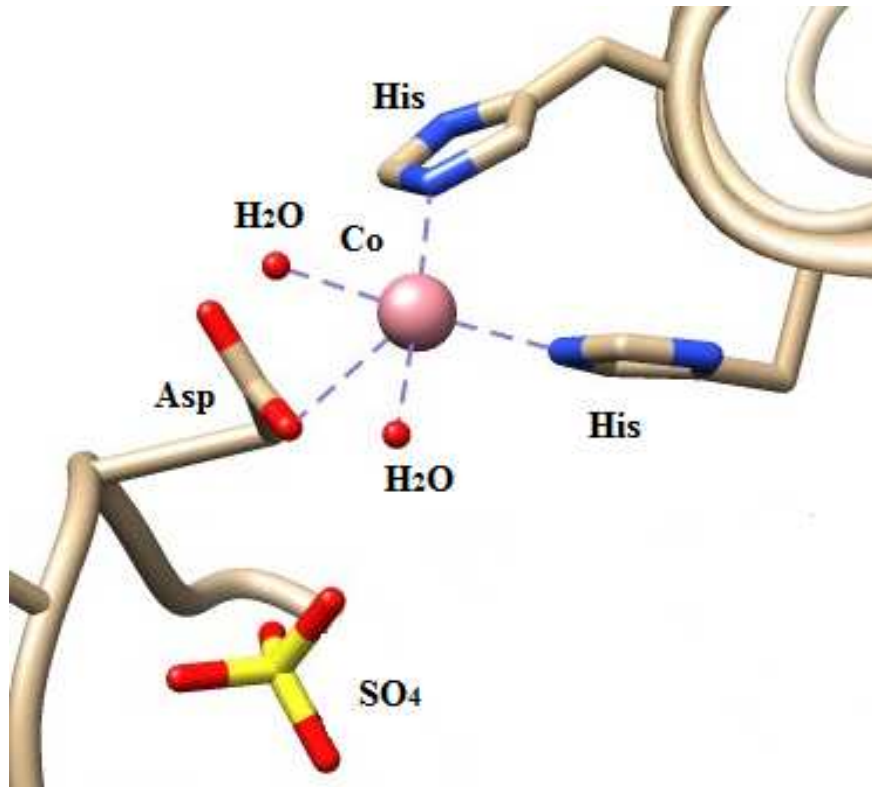
**Tabla IV.1.** Características de ATPs de distintos organismos. Se observa la heterogeneidad de la enzima distribuida tanto en organismos eucariotas (en celeste) como procariotas (en lavanda).

Organismo	Código PDB	Metal	Composición	Referencia
<i>Homo sapiens</i>	2QJF	K <sup>+</sup>	Dímero	Sekulic y col. (2007)
<i>Homo sapiens</i>	1XNJ 1XJQ 1X6V	-	Dímero	Harjes y col. (2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1G8F/G/H	Na,Ca,Mg, Cd	Hexámero	Ullrich y col. (2001)
	1R6X	Co	Monómero	Lalor y col., 2003
	1J70	Na	Hexámero	Lalor y col., 2003
<i>Penicillium chrisogenum</i>	1I2D	-	Trímero	Renosto y col. (1985) MacRae y col. (2002)
<i>Penicillium duponti</i>	-	-	Trímero	Renosto y col. (1985)
Hígado de <i>Mus musculus</i>	-	-	Monómero	Yu y col. (1989)
<i>Spinacia oleracea</i>	-	-	Monómero	Lunn y col. (1990) Renosto y col. (1993)
<i>Brassica oleracea</i> <i>L. var. capitata L.</i>	-	-	Monómero	Osslund y col. (1982)
<i>Escherichia coli</i> K12	-	-	Dímero	Leyh y col. (1988)
<i>Pseudomonas syringae</i>	1ZUN	Mg, Na	Monómero	Mougous y col. (2006)
<i>Allochromatium vinosum</i>	4DNX	-	Dímero	Parey y col. (2012)
<i>Thermus termophilus</i> HB8	1V47	Zn	Dímero	Taguchi y col. (2004)
<i>Riftia pachyptila</i>	1JHD	-	Monómero	Beynon y col. (2001)
<i>Desulfovibrio gigas</i> <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 277	-	Co, Zn	Trímero	Gavel y col. (1998)
<i>Aquifex aeolicus</i>	2GKS	-	Dímero	Yu y col. (2007)
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	3CR8	-	Trímero	Gay y col. (2009)

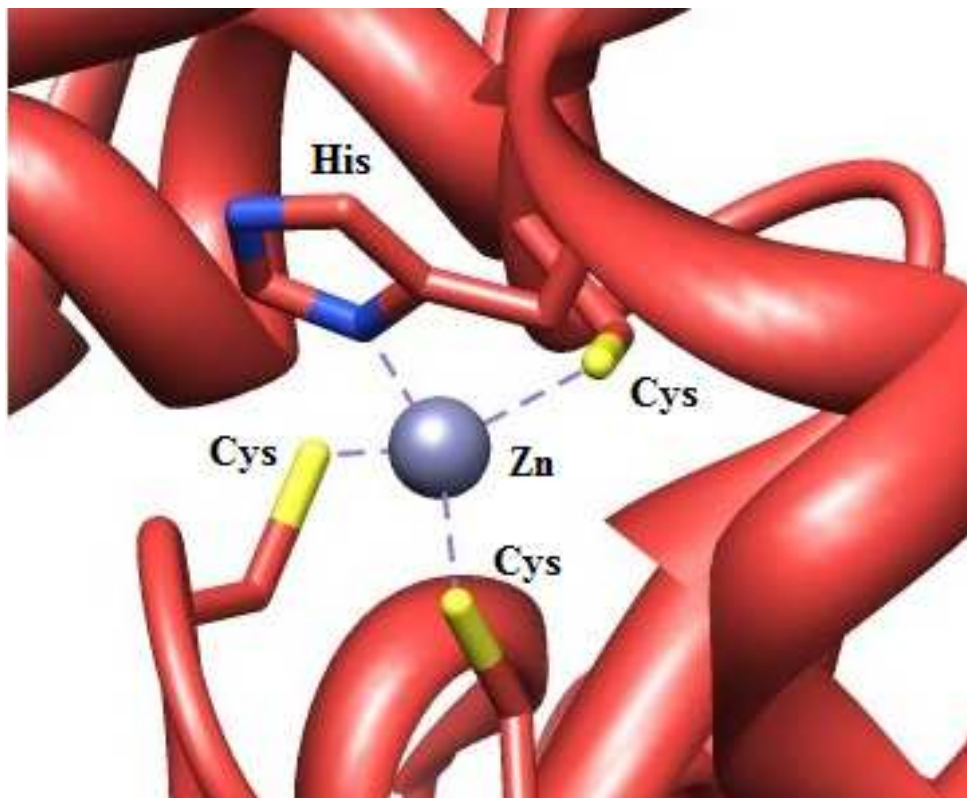
La comparación de las secuencias primarias de *Sc*ATPs con *Tt*ATPs (figura IV.7) resultó en una elevada homología entre las dos metaloproteínas en la composición de la cadena polipeptídica.

La cadena de *Sc*ATPs (Código PDB: 1R6X) está formada por 395 residuos y la cadena de *Tt*ATPs (Código PDB:1V47) por 349 residuos, presentando ambas estructuras 36% de residuos idénticos y 51% de residuos similares lo que resulta en un 87% de residuos homólogos.





**Figura IV.8.** Sitio activo de ATP sulfúrilasa de *S. cerevisiae* (Protein Data Bank, 1R6X). Se observa el átomo de Co en un entorno pentacoordinado ligado a dos átomos de nitrógeno pertenecientes a histidinas y a tres átomos de oxígeno pertenecientes a una molécula de ácido aspártico y a dos moléculas de agua. La figura se generó utilizando *UCSF Chimera alpha 1.6*.



**Figura IV.9.** Sitio activo de ATP sulfúrilasa de *T. thermophilus* (Protein Data Bank, 1V47). Se observa el átomo de Zn en un entorno tetracoordinado ligado a un átomo de nitrógeno perteneciente a histidina y a tres átomos de azufre pertenecientes a cisteínas. La figura se generó utilizando *UCSF Chimera alpha 1.6*.

La cristalografía de *Tt*ATPs (figura IV.9) muestra una esfera de coordinación para el átomo de Zn con cuatro ligandos, tres cisteínas y una histidina. En contraste, la estructura de *Sc*ATPs muestra un ion Co (II) coordinado a dos histidinas, dos moléculas de agua y un ácido aspártico.

La coordinación determinada para el átomo de Zn en *Tt*ATPs concuerda con estudios de EXAFS realizados para *Dg*ATPs y *Dd*ATPs donde se propuso que el sitio de Zn o Co exhibe coordinación tetraédrica en el cual el ion metálico está coordinado a tres átomos de azufre y un átomo de nitrógeno (Gavel y col., 1998), pero no para el sitio de Co de *Sc*ATPs, que muestra profundas diferencias pese a la alta homología que presentan estas dos enzimas. El otro aspecto que se ha investigado es el rol de estos iones metálicos en el mecanismo de reacción, y si bien no ha habido resultados concluyentes, todas las evidencias apuntan a un rol meramente estructural. Este aspecto no será abordado en esta tesis.

### **IV.3.3 Propiedades moleculares**

#### **IV.3.3.1 Masa molecular**

La masa molecular de *Dd*ATPs fue estimada mediante una cromatografía de filtración en gel usando una columna *prepacked* Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) acoplada a un equipo HPLC. Para la calibración se emplearon marcadores de alto peso molecular: Ferritina (440 kDa), conalbúmina (75 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13.7 kDa) Este procedimiento arrojó un resultado de 141 kDa. Dado que la masa molecular determinada en un gel desnaturizante fue 47 kDa (figura IV.5), se concluyó que la proteína purificada es un homotrímero, tal como fuera publicado por otros autores (Foster y col., 1994).

#### **IV.3.3.2 Cuantificación de metales**

La concentración de metales de metales fue determinada mediante espectrometría de absorción atómica en un espectrómetro Perkin Elmer Analyst 800. Estos estudios identificaron 0,5(1) mol de Zn/mol de proteína y 0,3(1) mol Co/ mol de proteína, valores que se corresponden con lo reportado (Gavel y col, 1998).

### IV.3.3.3 Caracterización cinética

#### IV.3.3.3.1 Fundamento

El método estándar para la caracterización cinética de enzimas con actividad ATPs, se basa en dos reacciones: la molibdólisis y la síntesis de ATP (Segel y col, 1987; Yu y col, 1989; Dahl y Trüper, 1994). La molibdólisis,



se evalúa en una reacción acoplada a otra reacción con Pirofosfata inorgánica. La estequiometría es 2 moles de fosfato formado por mol de pirofosfato producido. La reacción se inicia con la enzima, se incuba 30 minutos y se detiene por la adición de ácido acético. El fosfato producido es coloreado por adición de molibdato de amonio, ascorbato de sodio y ácido sulfúrico. Se incuba esta mezcla 20 minutos a temperatura ambiente y luego se cuantifica el fosfato a 660 nm (Segel y col, 1987).

Otra forma de evaluar la molibdólisis es cuantificando la formación de AMP acoplado ésta reacción a la oxidación de NADH. La estequiometría es de 2 moles de NADH oxidado por mol de AMP formado. La mezcla de incubación contiene MgATP, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, KCl, PEP, NADH, Pirofosfata, Miokinasa, Piruvato kinasa y Lactato dehidrogenasa. La reacción se inicia con molibdato (Yu y col, 1989). La síntesis de ATP,



se cuantifica mediante unas reacciones acopladas a Hexoquinasa y Glucosa-6-fosfato Dehidrogenasa. La reacción se inicia con la adición de APS. La cantidad de NADH es medido continuamente por absorbancia a 340 nm. La estequiometría es 1 mol de NAD<sup>+</sup> reducido por mol de ATP formado.

La complejidad instrumental y la necesidad de varias enzimas comerciales para la realización del ensayo cinético, derivó en la adaptación de una técnica analítica basada en un método colorimétrico utilizado para la enzima *ADP-Glucosa Pirofosforilasa* (Fusari y col., 2006).

La enzima ATP sulfurilasa cataliza la reacción:



mediante Pirofosfata alcalina inorgánica se obtiene Pi:



donde PPi es pirofosfato y Pi es fósforo inorgánico.

El método para la cuantificación de la actividad enzimática es un método colorimétrico discontinuo que mide la cantidad de fósforo inorgánico generado mediante la formación de un complejo con molibdato de amonio y verde de malaquita que presenta absorbancia a 650 nm. A partir de una curva de calibración de Pi se obtienen los parámetros de la recta para la cuantificación del Pi formado durante la reacción cinética.

En el anexo III se describe paso a paso el procedimiento analítico y los ensayos de validación de la técnica. La preparación de las soluciones utilizadas se realizó como se detalla en la tabla 1 de dicho anexo. La curva de calibrado de fosfato utilizada en la cuantificación de P<sub>i</sub> se describe en la tabla 2 del mismo. Para la preparación de la muestra se adicionaron los volúmenes de cada solución siguiendo el orden de la tabla 3. Se debe tener especial consideración en el acondicionamiento del material de vidrio, ya que es fundamental para evitar la cuantificación de fosfatos contaminantes. Se evaluó la linealidad en la respuesta a la concentración de P<sub>i</sub>, la concentración de enzima óptima para que no resulten falsos positivos, el tiempo de reacción, la estequiometría y la estabilidad de las soluciones.

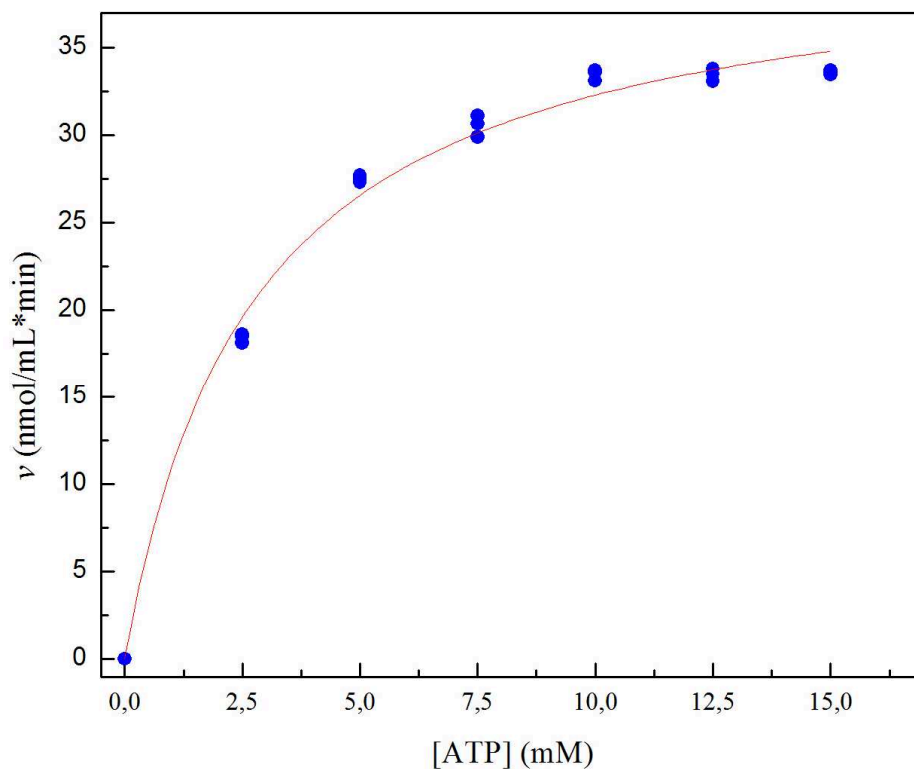
#### IV.3.3.3.2 Cinética enzimática

Una vez optimizado el ensayo de actividad, se procedió a caracterizar la cinética de la reacción catalizada por DdATPs siguiendo procedimientos estándares en cinética enzimática (Nelson y Cox, 2001).

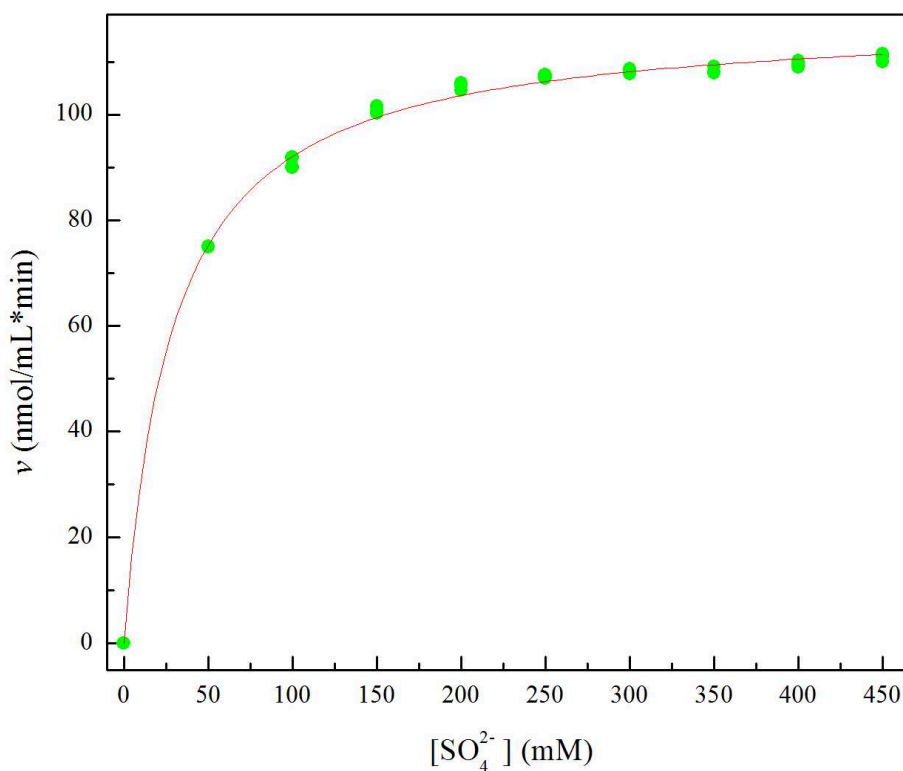
Los resultados obtenidos variando uno de los sustratos y manteniendo la concentración del otro constante durante el ensayo, se refleja en las figuras IV.10 y IV.11. Éstas, muestran la variación de la velocidad de la reacción en función de la concentración de los sustratos de la reacción, ATP y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, respectivamente. La velocidad de reacción (*v*) se expresa en nmol/mL\*min y las concentraciones de sustrato [S] en mM. Estos datos fueron ajustados mediante regresión no lineal asumiendo un modelo de Michaelis-Menten (ec. IV.3):

$$v = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{IV.3})$$

siendo *V<sub>m</sub>* la velocidad máxima, [S] la concentración de sustrato y *K<sub>m</sub>* la constante de Michaelis-Menten.



**Figura IV.10.** Evaluación de la cinética de la reacción. Variación de la concentración del sustrato ATP creciente a concentración constante de sulfato y enzima ( $[E]=3,1$  nmol/mL).



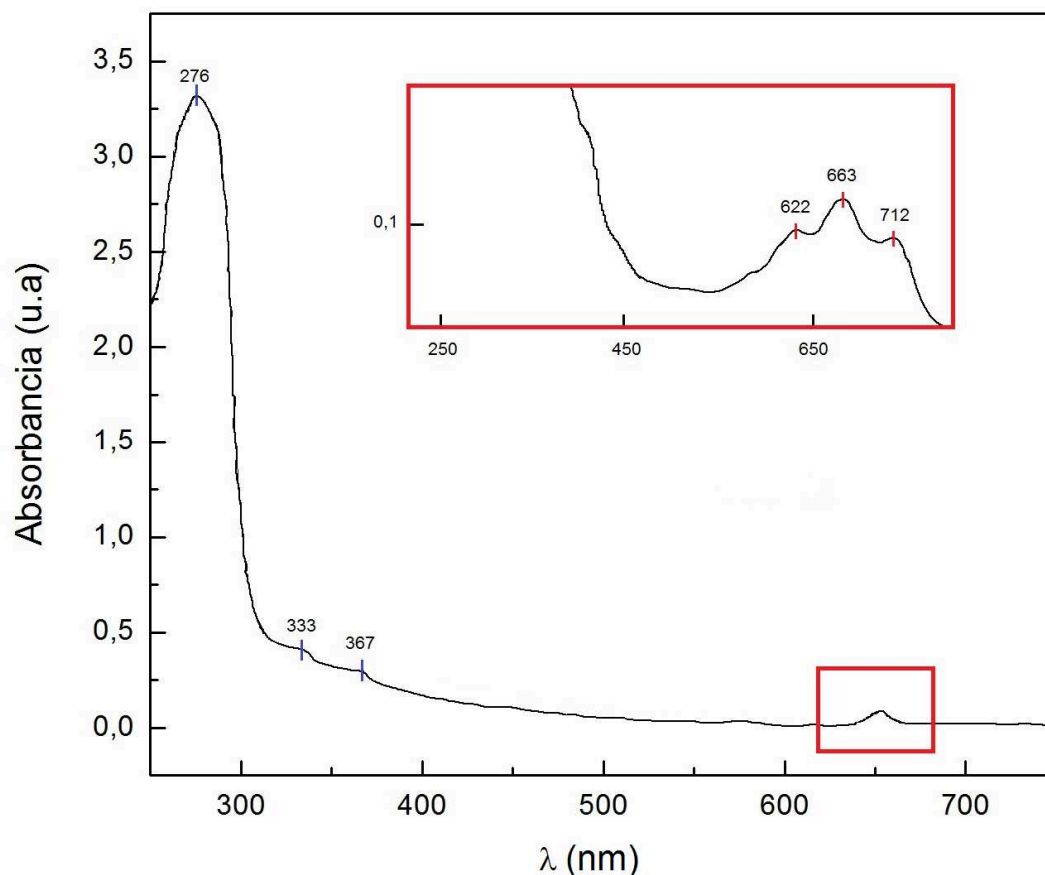
**Figura IV.11.** Evaluación de la cinética de la reacción. Variación de la concentración del sustrato sulfato a concentración constante de ATP y enzima ( $[E]=3,1$  nmol/mL).

**Tabla IV.2.** Parámetros cinéticos de *DdATPS*.

Sustrato	ATP	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
$V_M$ ( nmol/mL*min)	41,2 ± 0,9	118,4 ± 0,5
$K_M$ (mM)	2,7 ± 0,2	28,6 ± 0,8
$k_{cat}$ (1/min)	13,2 ± 0,1	38,0 ± 0,1
$k_{cat}/K_M$ (mM/min)	4,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1

Los parámetros cinéticos obtenidos se presentan en la tabla IV.2. El valor de la constante específica definida como  $k_{cat} / K_M$  para cada sustrato, permite una comparación cuantitativa de la eficiencia de la enzima para convertir en productos dichos sustratos (Nelson y Cox, 2001). Por lo tanto, de acuerdo a la tabla IV.2 la enzima posee mayor eficiencia de reacción con ATP, molécula que es transferida al sulfato para activarlo y comenzar la vía desasimilativa. Esto está en consonancia con la reacción global.

#### IV.3.3.4 Caracterización espectroscópica mediante UV-vis



**Figura IV.12.** Espectro UV-vis de ATP sulfurilasa purificada de *Desulfovibrio desulfuricans*. Se encuentra ampliada la región alrededor de ~ 660 nm, lo que permite identificar las 3 bandas típicas de absorción de Co (II) en configuración tetraédrica.



El ion Co (II) en configuración de alto espín adopta usualmente coordinaciones tetraédricas u octaédricas (Cotton y Wilkinson, 1988). El tipo de coordinación se ve reflejado en las transiciones d-d en el espectro de absorción electrónico, mientras que las bandas de transferencia de carga son asociadas a ligandos específicos como tiolatos (Adrait y col., 1999) lo cual permite obtener información sobre el tipo de coordinación y sus ligandos. En los sistemas tetraédricos la transición en el visible es generalmente un orden de magnitud más intensa y desplazada a bajas energías, en comparación con los complejos octaédricos (~ 650 nm vs 550 nm, respectivamente).

La figura IV.12 muestra el espectro UV-vis de la enzima purificada. El espectro UV-vis asociado con el ion Co (II) en *DdATPs*, puede ser interpretado a partir de la estructura electrónica del ion Co (II). Las propiedades electrónicas del ion Co (II) son muy dependientes de la simetría de su entorno y de la intervención del acoplamiento espín-órbita (Maret y Vallee, 1993). En el espectro se analizan con especial énfasis las bandas de absorción relacionadas con el ion Co (II), las cuales están centradas alrededor de 663 nm. Esta región de absorción muestra una estructura de 3 bandas (622, 663 y 712 nm, respectivamente) típica de iones Co (II) de alto espín ( $S=3/2$ ) en coordinación tetraédrica y que es responsable del color celeste de la proteína (Gavel y col, 1998).

El espectro muestra también una banda a 367 nm que se superpone parcialmente con la banda típica de absorción de proteínas a 276 nm (relación de intensidades  $A_{276}/A_{367} = 4.76$ ). La banda a 367 nm es observada habitualmente en complejos de metales de transición con ligandos azufre, que han sido identificadas como bandas de transferencia de carga metal $\leftrightarrow$ ligando (Adrait y col., 1999). Del análisis del espectro UV-vis de *DdATPs* se puede concluir que el ion Co (II) coordina en un entorno tetraédrico (transiciones d-d a ~ 660 nm) y que probablemente use ligandos azufres (bandas de transferencia de carga a 333 y 367 nm).

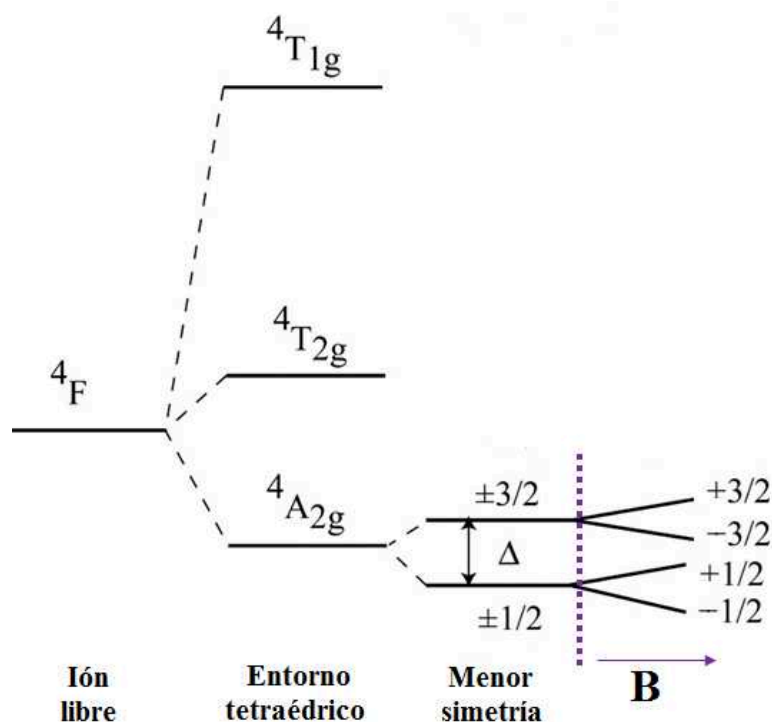
#### **IV.3.3.5 Caracterización espectroscópica mediante EPR**

##### **IV.3.3.5.1 Estructura electrónica del ión Co (II) en configuración de alto espín**

El ión Co (II) libre tiene una configuración electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3d^7$ . Considerando la última capa de valencia, configuración  $3d^7$  y rotulando los niveles de acuerdo con el esquema de acoplamiento Russell-Saunders o **L-S** (**L** y **S** son los momentos angulares totales orbital y de espín, respectivamente), el término

espectroscópico fundamental de menor energía para el ión libre en configuración de alto espín es el  $^4F$  ( $L=3, S=3/2$ ) (Ballhausen, 1962) (figura IV.13).

El estado fundamental que determina las propiedades de EPR, es un multiplete con 28 estados ( $(2L+1) \times (2S+1)$ ) degenerados en ausencia de un campo magnético exterior.



**Figura IV.13.** Niveles energéticos para un ión Co (II) de alto espín en coordinación tetraédrica. Oh representa la simetría de grupo puntual para un campo tetraédrico u octaédrico. Los niveles de energía para un campo octaédrico son iguales pero invertidos.

Cuando un ión de transición forma un complejo, se une a ligandos que generalmente son iones negativos o moléculas neutras. Los electrones del ión metálico en el complejo están sometidos al campo eléctrico originado por el entorno de los ligandos. Ese “campo cristalino” (CC) rompe la simetría esférica de un ión libre. En este modelo los electrones de los ligandos se consideran cargas eléctricas puntuales negativas, que proveen un potencial que posee la simetría del entorno de ligandos.

Esta teoría es una herramienta potente para la determinación de la simetría, ya que el análisis de las diferentes situaciones permite separar en grupos los orbitales con distinta simetría, produciendo un esquema cualitativo de las configuraciones y niveles de energía. Sin embargo, la teoría no predice las magnitudes de los desdoblamientos de

energía, y por lo tanto en los casos en que es útil siempre se deben determinar experimentalmente sus parámetros relevantes (Ballhausen, 1962).

Cuando el ión libre  $3d^7$  se encuentra en un campo cristalino tetraédrico ( $O_h$ ) se puede demostrar usando teoría de grupos de simetría puntual que el estado fundamental  $^4F$  ( $L=3$ ) se desdobra en dos tripletes ( $T_{1g}$  y  $T_{2g}$ ) y un singlete ( $A_{2g}$ ), siendo este último el de menor energía (figura IV.13). Los niveles de energía que se obtienen para el caso de un entorno octaédrico son los mismo pero con el orden invertido.

Dado que el desdoblamiento resultante entre éstos estados orbitales usualmente es del orden de  $10.000$  a  $15.000 \text{ cm}^{-1}$  tanto para iones Co (II) de alto espín en entornos tetraédricos u octaédrico (Adrait y col., 1999; Brown y col., 2001; El-Sonbati y col., 2001) y mucho más grande que  $kT$  ( $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$  a T ambiente), en principio se puede considerar que solamente está térmicamente poblado el estado fundamental (estado  $A_{2g}$  en el caso de un complejo tetraédrico) (figura IV.13). Este estado corresponde a un singlete orbital, por lo que el descenso de la simetría de coordinación no produce desdoblamientos adicionales si uno considera únicamente la componente orbital del estado.

No obstante, la interacción espín-órbita y distorsiones de baja simetría del campo cristalino ocasionan que el singlete orbital fundamental  $^4A_{2g}$  se desdoble en dos dobletes Kramers  $\pm 1/2$  y  $\pm 3/2$ , siendo  $\Delta$  la separación entre estos dos dobletes.

El estado de menor energía corresponde al doblete  $\pm 1/2$  para  $\Delta$  positivos y al doblete  $\pm 3/2$  para negativos. Es importante mencionar que la degeneración de espín de los dobletes Kramers sólo puede romperse con la aplicación de un campo magnético B. Cuando  $\Delta$  es mucho mayor que el término Zeeman, solo el doblete fundamental está poblado y es el doblete en que se producen las transiciones de EPR. Los estados  $\pm 1/2$  y  $\pm 3/2$  pueden sufrir mezclas adicionales por distorsiones del campo cristalino e interacción espín-órbita (interacción ente el espín electrónico S y el momento angular L del ion Co (II),  $\lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$ ), por lo que la nomenclatura para los estados rotulados como  $\pm 1/2$  y  $\pm 3/2$  sería completamente correcta; no obstante conservaremos esta nomenclatura por simplicidad.

La interpretación de las propiedades de EPR y magnéticas de los iones Co (II) de alto espín se analiza usualmente con un Hamiltoniano de espín del tipo:

$$H = \mu_B \mathbf{S} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{B} + D \left( S_z^2 - \frac{S(S+1)}{3} \right) + E (S_x^2 - S_y^2) \quad (\text{IV.4})$$

donde  $\mathbf{g}$  es el tensor  $\mathbf{g}$  real del ion Co (II) y  $S = 3/2$ . Los términos  $D$  y  $E$  son denominados desdoblamientos de campo cero axiales y rómbicos, respectivamente (ZFS, Zero Field Splitting).  $D$  y  $E$  tienen contribuciones del campo cristalino de los ligandos y de la interacción espín-orbita. En esta ecuación se asume que el eje de cuantificación para el espín electrónico está a lo largo del eje de la distorsión axial del ZFS. En principio, los ejes principales del tensor  $\mathbf{g}$  no tienen que coincidir con los del ZFS, pero dado que este término es mucho mayor que el término *Zeeman*, se puede asumir que ZFS y  $\mathbf{g}$  tienen direcciones coincidentes.

Los datos de EPR del ion Co (II) pueden ser analizados aún de una manera más simple que la propuesta a través de la ecuación IV.5 mediante el método que consiste en definir un espín efectivo. En un experimento de EPR en banda X la energía de la microonda es generalmente mucho menor que la separación  $\Delta$  entre los dobletes de espín (figura IV.13), lo que impide que haya transiciones de EPR entre estados con distintos espín ( $\pm 1/2 \leftrightarrow \pm 3/2$ ). A su vez, la señal de EPR del ion Co (II) en configuración de alto espín se detecta usualmente a temperaturas menores a 20 K, ya que el tiempo de relajación espín-red ( $T_1$ ) a temperaturas superiores de 20 K es muy corto y por lo tanto no se detecta la señal de EPR por ensanchamiento (ver Capítulo III).

Esos dos motivos determinan que las transiciones de EPR en un ion Co(II) de alto espín se deben a transiciones dentro del doblete fundamental, por lo que el sistema pueda ser tratado como un espín efectivo  $S' = 1/2$  en el que la posición de la línea de resonancia está caracterizada por un nuevo tensor  $\mathbf{g}$  identificado como  $\mathbf{g}'$ .

$$H = \mu_B \mathbf{S}' \cdot \mathbf{g}' \cdot \mathbf{B} \quad (\text{IV.5})$$

Los valores de  $\mathbf{g}'$  asociados con estas transiciones son muy anisotrópicos, muy diferentes del valor  $g_e$  del electrón libre y como se verá abajo, contiene información no solo del tensor  $\mathbf{g}$  definido en ecuación IV.4, sino que también de los términos  $D$  y  $E$ .

Dado que las ecuaciones IV.4 y IV.5 describen el mismo fenómeno físico pero con un diferente modelo, es posible establecer un paralelismo entre ambas. Asumiendo que el tensor real  $\mathbf{g}$  y el ZFS tienen direcciones coincidentes (ec. IV.4) es posible

resolver analíticamente la relación entre el tensor  $\mathbf{g}'$ , el tensor  $\mathbf{g}$  y el ZFS. La expresión analítica (Pilbrow, 1978) para los valores de  $g'$  efectivos a partir de los parámetros definidos en el Hamiltoniano de la ecuación IV.5 asumiendo coincidencia del tensor  $\mathbf{g}$  (real) y  $\mathbf{D}$  está dada por (Werth y col., 1995; Rosa y col., 2006):

$$g'_{x'} = g_x \left( 1 \pm \frac{1+3\left(\frac{E}{D}\right)}{\sqrt{1+3\left(\frac{E}{D}\right)^2}} \right) \quad g'_{y'} = g_y \left( 1 \pm \frac{1-3\left(\frac{E}{D}\right)}{\sqrt{1+3\left(\frac{E}{D}\right)^2}} \right) \quad g'_{z'} = g_z \left( 1 \mp \frac{2}{\sqrt{1+3\left(\frac{E}{D}\right)^2}} \right) \quad (\text{IV.6})$$

siendo la separación  $\Delta$  entre los dos dobletes fundamentales

$$\Delta = 2D\sqrt{1+3\left(\frac{E}{D}\right)^2} \quad (\text{IV.7})$$

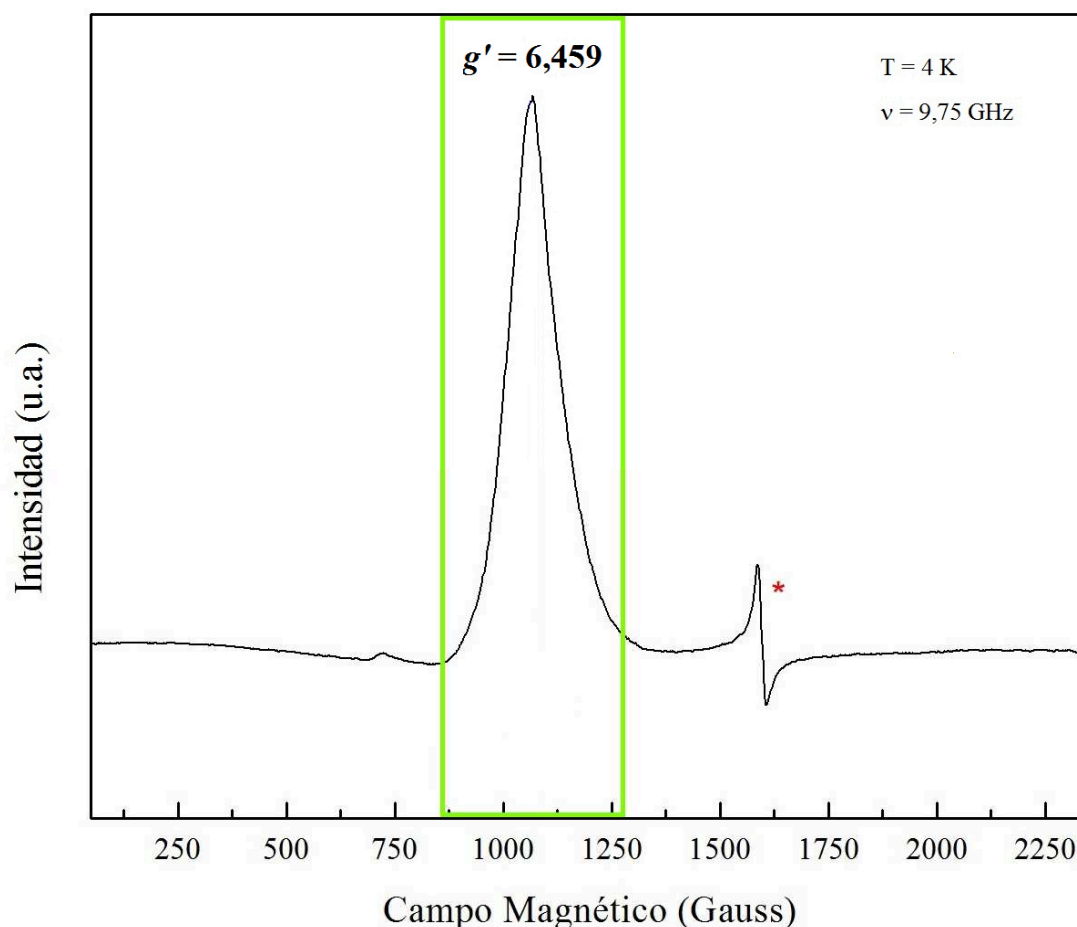
Estas expresiones (ec. III.6 y III.7) permiten predecir que en el caso de ZFS con simetría axial ( $E=0$ ), se obtienen señales de EPR con simetría axial en los dos casos analizados. También permiten concluir que el signo de  $\Delta$  está determinado por el valor de  $D$ . En el caso con  $\Delta$  positivo, el estado fundamental corresponde a  $S=1/2$  y la señal de EPR es axial ( $g'_{\perp} > g'_{\parallel}$ ) con los dos valores de  $g' > 2$ . Cuando  $\Delta$  es negativo el estado fundamental es  $S=3/2$ , y también se obtiene una señal de EPR con simetría axial pero con  $g'_{\parallel} > g'_{\perp}$ .

La diferencia fundamental con la anterior es que este caso  $g'_{\parallel}$  es  $> 2$  pero  $g'_{\perp} = 0$ , por lo que la resonancia asociada con  $g'_{\perp}$  es indetectable en un experimento de EPR. Este hecho sumado a que las transiciones dentro del doblete  $S=3/2$  están prohibidas ( $\Delta M_S=2$ ) permite identificar el signo del  $\Delta$  ya que corresponden a transiciones muy débiles y solo detectables en el caso que la simetría del ion Co (II) no sea perfectamente cúbica.

#### IV.3.3.5.2 Espectros

En la figura IV.14 se observa un espectro de EPR asociado con el ion Co (II) presente en *DdATPs*. Las señales del ion Co (II) fueron detectados a temperaturas menores de 20 K. Como se observa en la figura a 4 K, solo se detectó una única línea de

resonancia con  $g = 6,459$ . Es importante notar que el ion Co (II) presenta espín nuclear  $I = 7/2$ . Dado que en los espectros de EPR no se detectó ninguna evidencia de estructura hiperfina, esta interacción será omitida en el análisis.



**Figura IV.14.** Espectro de EPR en banda X de ATPs. Solo se observa una línea de resonancia con  $g' = 6,459$ . La línea de resonancia indicada con (\*) corresponde a una impureza de Fe (III) en configuración de alto espín que recibe el nombre de Fe adventicio (Carvalho y col., 1996).

La interpretación de la señal mostrada en la figura IV.14 fue realizada mediante la teoría presentada en la sección anterior. En primer lugar se determinó que la señal de EPR corresponde a la de un ión Co (II) en configuración de alto espín ( $S=3/2$ ). Esto es debido a que el ion Co (II) se puede presentar en dos configuraciones paramagnéticas, alto ( $S=3/2$ ) y bajo ( $S=1/2$ ) espín. La configuración de bajo espín presenta señales de EPR axiales con valores de  $g_{\perp} \sim 2.3$  y  $g_{\parallel} \sim 2$  y que pueden ser detectadas a temperaturas relativamente altas ( $\sim 100$  K), lo que excluyó esta posibilidad debido al tipo del espectro de EPR mostrado en la figura IV.14.

El siguiente paso fue determinar si la señal de EPR observada se corresponde a un sitio de Co (II) con  $\Delta$  positivo o negativo, concluyéndose que el sitio del ion Co (II) de DdATPs presenta un  $\Delta$  negativo. Esto se fundamenta en que no se detectó la típica

señal axial ( $E = 0$ , ec. IV.7) o rómbica ( $E/D \neq 0$ , ec. IV.7) con todos los valores  $g' > 2$  (Werth y col., 1995) y en que la resonancia a  $g' = 6.459$  (ec. IV.6) no presenta una componente negativa, hechos que son observables en iones Co (II) con  $\Delta > 0$ . Otro resultado que da un soporte adicional a esta interpretación es la baja intensidad de la señal de EPR, ya que para obtener señales como la mostrada fue necesario utilizar concentraciones de proteína del orden de 1 mM, aproximadamente 10 veces más que las requeridas para obtener una señal comparable con iones Co (II) con  $\Delta > 0$  (estado fundamental  $S = 1/2$ ). La baja intensidad de la señal de EPR está en línea con el hecho de que la transición dentro del doblete  $S = 3/2$  corresponde a una transición prohibida ( $\Delta M_s = 2$ ). El hecho que la misma se observe es indicativo además que los estados identificados como  $S = 1/2$  y  $3/2$  no son estados puros, ya que esta transición adquiere cierta probabilidad en estados fundamentales que corresponden a una mezcla de los estados  $S = 1/2$  y  $S = 3/2$ .

En este contexto la señal de EPR de la figura IV.14 corresponde a un complejo de Co (II) con  $\Delta < 0$ , en el cual la resonancia a  $g' = 6.459$  corresponde al  $g_{\parallel}$  de la señal axial que predicen las ec. IV.7 para un doblete fundamental correspondiente a  $S = 3/2$ .

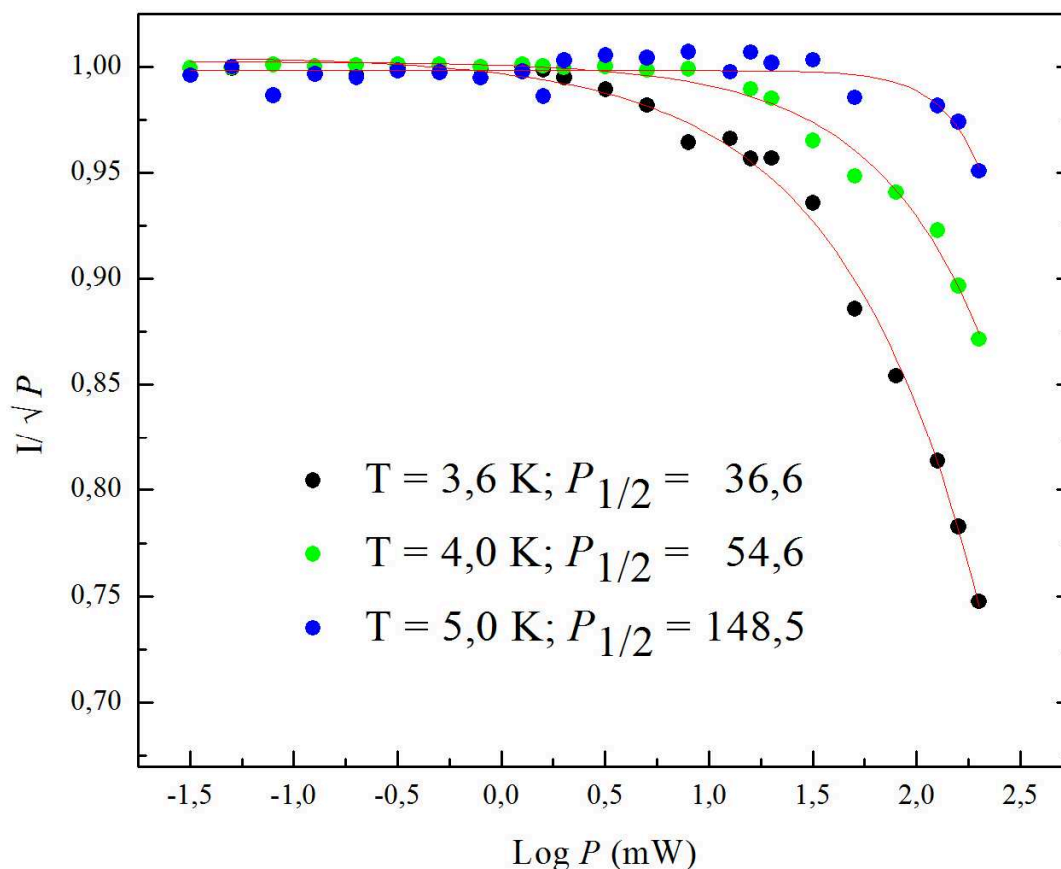
#### IV.3.3.5.3 Determinación del ZFS

La caracterización del entorno de coordinación del ion Co (II) de *DdATPs* se realizó en este trabajo de tesis, mediante espectroscopia UV-vis (sección IV.3.3.4) y espectroscopia EPR a fin de complementar la información estructural sugerida por EXAFS (Gavel y col., 1998) debido a la falta de datos cristalográficos estructurales de la metaloproteína. Para ello se realizó el estudio de saturación de la señal de EPR en función de la potencia de microondas que incide sobre la enzima a 3 temperaturas diferentes (descripción en capítulo III), mediante el cual se pudo estimar el número de ligandos unidos al ion metálico y así obtener información sobre su entorno de coordinación (Kuo y Makinen, 1985).

La metodología de saturación de la señal de EPR permite evaluar el ZFS cuando el ZFS es mucho mayor que el cuanto de microondas de EPR,  $h\nu$ , y cuando la forma de línea del espectro se mantiene constante a distintas temperaturas y potencias de microondas, hecho que se verificó en *DdATPs*.

La figura IV.15 muestra el estudio de saturación para *DdATPs* en donde se grafica la intensidad de la señal ( $I$ ), dividida por la raíz cuadrada de la potencia que

incide sobre la muestra en función de logaritmo de la potencia de microondas incidente, a 3 temperaturas diferentes.



**Figura IV.15.** Curvas de saturación de DdATPs a 3 temperaturas. Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación IV.8. La intensidad  $I$  fue evaluada a partir de la altura máxima de la línea de resonancia mostrada en figura IV.14 (recuadrada en verde en concordancia con la temperatura a la que se registró el espectro)

Como se observa en la figura IV.15, a potencias de microondas bajas, se obtiene una recta paralela al eje de las  $x$ , confirmando que la señal se encuentra en condiciones de no saturación (capítulo III). Por el contrario, a potencias altas se produce un desvío de este comportamiento indicando que la señal comienza a estar saturada: a mayor desviación, mayor saturación.

Los datos experimentales de la figura IV.15 fueron ajustados mediante la ecuación III.6 (pág. 30). La asunción básica para interpretar los datos es que la línea de resonancia de ion magnético está dada por una ecuación similar a la de Bloch, pero con una intensidad proporcional a la  $\sqrt{P}$  en condiciones de no saturación y con denominador elevado a  $b/2$ , un número real relacionado con los distintos mecanismos



de relajación espín-red (Pilbrow, 1991) y que bajo la condición de resonancia ( $\omega = \omega_0$ ) se reduce a (Makinen y Yim, 1981):

$$I \propto \frac{\sqrt{P}}{(1 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2)^{b/2}} \quad (\text{IV.8})$$

De la comparación entre las ecuaciones III.6 y IV.8 resulta que en condiciones de saturación  $P_{1/2} \propto 1/\gamma^2 T_1 T_2$ , lo cual provee un método para evaluar  $T_1$  en función de la temperatura, ya que  $T_2$  es, como se discutió en el capítulo III, independiente de temperatura.

Si bien no hay ningún modelo teórico que de soporte a esta ecuación, su uso es confiable cuando el factor  $b/2$ , es constante en todos los experimentos a distintas temperaturas.

El ajuste de los datos de la figura IV.15 con la ecuación III.6 permitió evaluar las  $P_{1/2}$  a distintas temperaturas (figura IV.16), y estos resultados fueron ajustados asumiendo un mecanismo de relajación tipo Orbach,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{A}{(e^{\Delta/kT} - 1)} \approx A e^{-\Delta/kT} \quad (\text{IV.9})$$

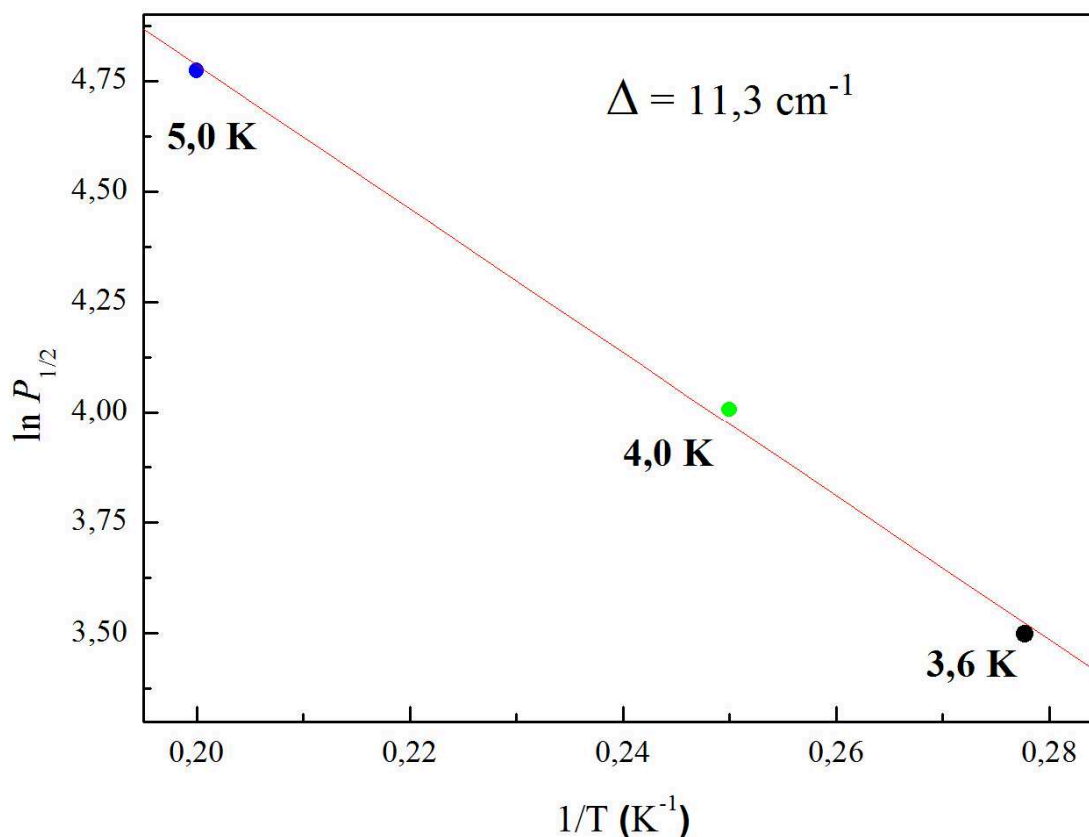
donde  $A$  es una constante característica del proceso de relajación de Orbach (Pilbrow, 1991). Aplicando  $\ln$  a la ec. IV.9,

$$\ln \frac{1}{T_1} = \ln A - \frac{\Delta}{k} \frac{1}{T} \quad (\text{IV.10})$$

y graficando  $\ln 1/T_1$  vs  $1/T$  se pudo determinar de la pendiente la separación en energía  $\Delta$  entre el estado fundamental ( $S = 3/2$ ) y el primer estado excitado ( $S = 1/2$ ).

Los valores de  $\Delta$  han sido empíricamente relacionado con el número de coordinación (Kuo y Makinen, 1985; Makinen y col., 1985). Estos autores encontraron una correlación el cual los sistemas con ZFS con  $\Delta < 13 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a sitios tetracoordinados,  $20 < \Delta < 50 \text{ cm}^{-1}$  a sitios penta-coordinados de geometría piramidal-cuadrada o bipiramidal-trigonal y  $\Delta \geq 50 \text{ cm}^{-1}$  en sitios hexa-coordinados, y si bien se

han reportado algunas excepciones ha demostrado ser confiable en muchos casos (Larrabee y col., 1997).



**Figura IV.16.** Dependencia de  $P_{1/2}$  con la temperatura, realizada por el método continuo de saturación con potencia de microondas. La pendiente de la recta provee una estimación directa de la constante de ZFS.

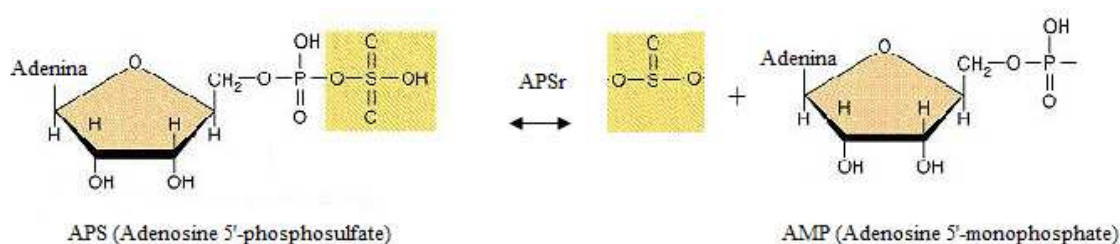
El valor  $\Delta = 11,3(6) \text{ cm}^{-1}$  para el sitio del ion  $\text{Co}(\text{II})$  en ATPs, sobre la base de la correlación de Makinen que el mismo corresponde a un sitio tetracoordinado, en coincidencia con la estructura sugerida mediante EXAFS (Gavel y col, 1998).

## IV.4 APS reductasa

### IV.4.1 Clasificación de la enzima

La molécula APS, el producto de la reacción catalizada por ATPs, es el sustrato de la enzima APS reductasa. Ésta enzima interviene en dos vías catalíticas del ciclo del azufre con funciones diferentes: la vía asimilativa que provee sulfuro para la biosíntesis de aminoácidos y cofactores (figura IV.2) y la vía desasimilativa mediante la cual el

sulfato sirve como un aceptor de electrones en la cadena de transferencia electrónica en bacterias y archaea (Baker y Banfield, 2003). Ésta enzima cataliza la reducción de APS a AMP (Adenosine MonoPhosphate) y sulfito (figura IV.17). El clivaje hidrolítico de la unión S-O-P en APS produce  $\sim 80$  kJ/mol, energía que está entre las más altas reportadas para una unión X-O-P en una molécula biológica (Robbins y Lipmann, 1958). APS reductasa se clasifica con el código E.C. 1.8.99.2: 1, “oxidoreductasa”; 8, “actúa sobre un grupo de azufre del donante”, 99; “con aceptores fisiológicos desconocidos; 2, “sulfato adenilil reductasa”.



**Figura IV.17.** Reacción catalizada por APSr en la vía desasimilativa. El producto de la reacción de ATPs es el sustrato para APSr.

Si bien las APSr de las dos vías incluyen los mismos intermediarios, estos procesos son llevados a cabo por dos enzimas diferentes. La APSr asimilatoria es una enzima homodimérica de 100 kDa que contiene en su estructura dos centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  (Fritz y col., 2000; Kopriva y col., 2002; Carrol y col., 2005), mientras que las APSr desasimilatorias son enzimas heterodiméricas que contienen dos centros FeS del tipo  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  y una molécula de flavina (Lampreia y col., 1990; Lampreia y col., 1994; Fritz y col., 2002). Las flavoproteínas contienen nucleótidos de flavina covalentemente unidos. Son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción utilizando nucleótido de flavina (FMN) o dinucleótido de flavina y adenina (FAD) como cofactor. Estas coenzimas provienen de la vitamina riboflavina (Nelson y Cox, 2001).

#### IV.4.2 Características de APSr desasimilatorias de diferentes especies de *Desulfovibrio*

La enzima APSr desasimilatoria ha sido estudiada en diferentes especies del género *Desulfovibrio*. En la tabla IV.6 se presentan las características estructurales de APSr de las siguientes especies: *D. desulfuricans* (Peck Jr. y col., 1965); *Desulfovibrio*

sp. (Lampreia y col., 1994); *D. desulfuricans* Essex (ATCC 29577) (Fritz y col., 2000); *D. aminophilus* DSM 12254 (López-Cortés y col., 2005); *D. vulgaris* Miyazaki F (Ogata y col., 2008) y *D. gigas* (Chiang y col., 2009; Fang y col., 2011). Tal como puede observarse en la tabla, en términos generales, APSr presenta dos subunidades, dos centros FeS y un cofactor flavina tal como se mencionara anteriormente.

**Tabla IV.6.** Comparativa de características estructurales de APS reductasa de diferentes especies de *Desulfovibrio*.

Organismo	Año	PM (kDa)	Número de monómeros	Subunidad $\alpha$ (kDa)	FAD	Subunidad $\beta$ (kDa)	Centros FeS	EPR	X-ray
<i>D. desulfuricans</i> <sup>(1)</sup>	1965	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	x	-
<i>Desulfovibrio</i> <sup>(2)</sup>	1994	150-180	$\alpha\beta$	70	1	23	2	X	-
<i>D. desulfuricans</i> Essex (ATCC 29577) <sup>(3)</sup>	2000	95	$\alpha\beta$	75	1	20	2	-	X
<i>D. aminophilus</i> DSM 12254 <sup>(4)</sup>	2005	~93	$\alpha\beta$	75	1	18	2	X	-
<i>D. vulgaris</i> Miyazaki F <sup>(5)</sup>	2008	186	$\alpha_2\beta_2$	75	1	18	2	-	X
<i>D. gigas</i> <sup>(6)</sup>	2009	~360	6 $\alpha\beta$	70	1	20	2	-	X
<i>D. gigas</i> <sup>(7)</sup>	2011	190 380 570	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_4\beta_4$ $\alpha_6\beta_6$	75	1	20	2	X	X

(1) PeckJr y col., 1965

(2) Lampreia y col., 1994

(3) Fritz, y col., 2000

(4) López-Cortés y col., 2005

(5) Ogata y col., 2008

(6) Chiang y col., 2009

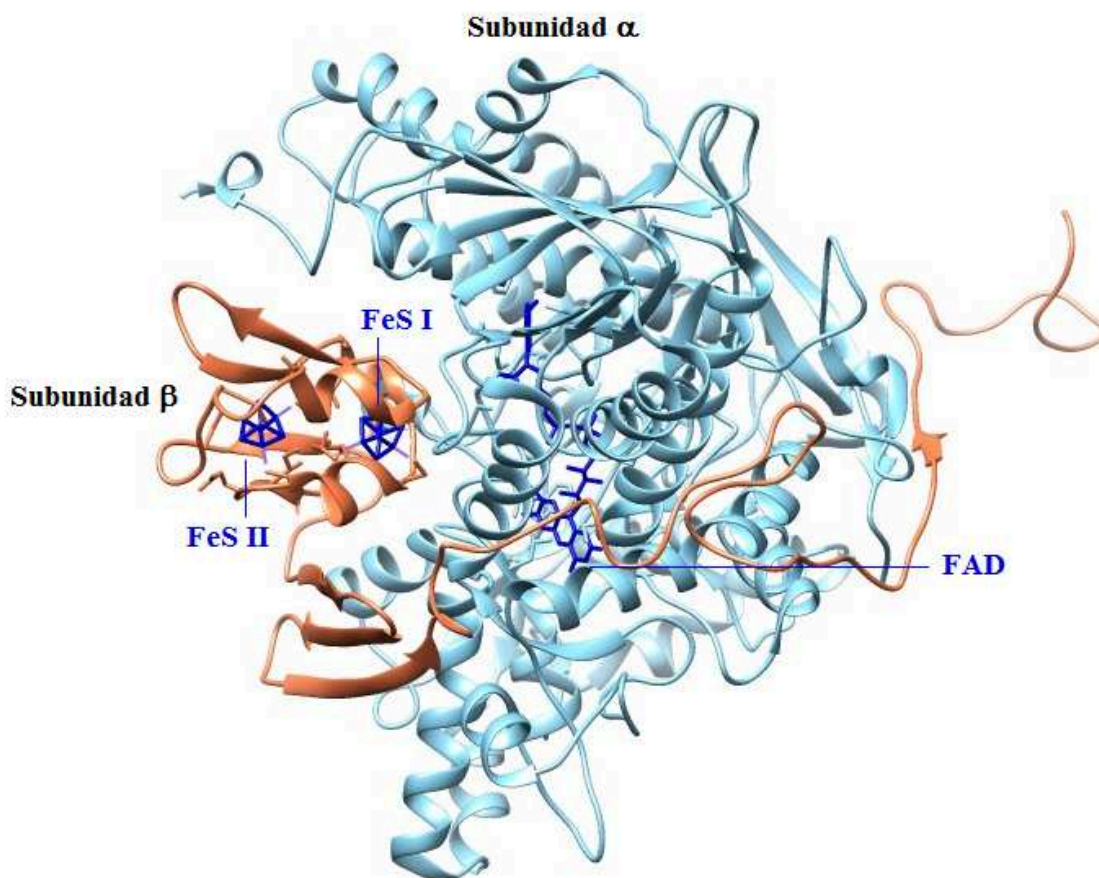
(7) Fang y col., 2011

(n.d.) no determinado

La enzima activa se presenta como heterodímero, pero puede asociarse formando tetrámeros, hexámeros o incluso oligómeros, inactivos, desde el punto de vista catalítico. Si se pone en contacto con una solución de sustrato, se disocian estas estructuras restaurando la forma dimérica activa (Fang y col., 2011).

En todas las especies se ha reportado la presencia de un cofactor flavina y dos centros FeS del tipo  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ . Estos centros están formados por 4 átomos de hierro no hémico acoplados antiferromagnéticamente (Lampreia y col., 1990) y puenteados por 4 átomos de azufre formando una estructura cerrada tipo cubano que se pueden encontrar en distintos estados de oxidación. De los dos estados de oxidación que aparecen en el sistema, uno es paramagnético correspondiente a la configuración  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$  con un estado fundamental con  $S = 1/2$  y el otro es diamagnético donde el centro se encuentra como  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$  con  $S = 0$  (Johnson, 1998).

#### IV.4.3 Propiedades moleculares de APSr desasimilatoria

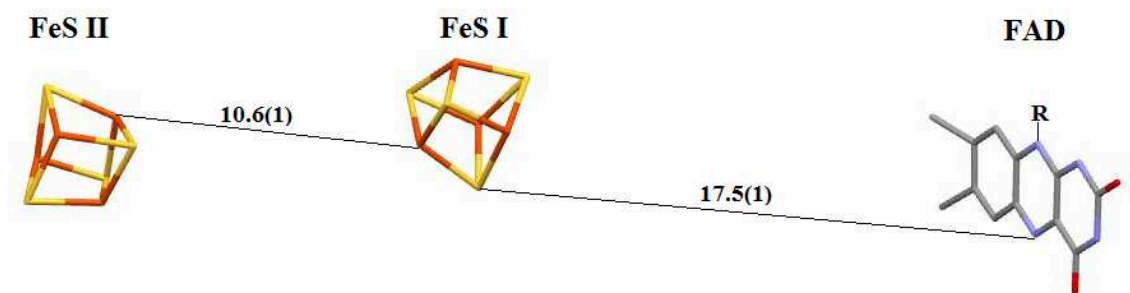


**Figura IV.18.** APS reductasa de *Desulfovibrio gigas* (Protein Data Bank, 3GYX). Se observa la subunidad  $\alpha$  (celeste), en cuyo interior se aloja la flavina (FAD) y la subunidad  $\beta$  (naranja) que contiene los dos centros FeS. La figura se generó utilizando *UCSF Chimera alpha 1.6*.

La determinación de las propiedades moleculares y espectroscópicas de APSr de distintas especies del género *Desulfovibrio* demuestra que todas estas enzimas presentan una alta homología (Peck Jr. y col., 1965; Lampreia y col., 1994; Fritz y col., 2000; López-Cortés y col., 2005; Ogata y col., 2008; Chiang y col., 2009; Fang y col., 2011).

La única estructura cristalina reportada para una APSr pertenece a la especie *Desulfovibrio gigas* (figura IV.18). *Dd*APSr, al igual que *Dg*APSr, es una flavometaloenzima heterodimérica de 93 kDa. La subunidad- $\alpha$  de 75 kDa une covalentemente al cofactor (flavina) y la subunidad- $\beta$  de 18 kDa contiene los dos centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  (Chiang y col., 2009). Los centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  se identifican como FeS I y FeS II, siendo el FeS I el que se encuentra en el interior de la proteína y el FeS II el más cercano a la superficie y parcialmente expuesto al disolvente (figura IV.18). La distancia entre los dos centros es de 10.6(1) Å, tomada desde los átomos de hierro más próximos. La distancia desde el FeS I al átomo de N-5 de la flavina es de 17.5(1) Å

(figura IV.19). Los valores de las distancias entre los centros FeS y entre el N-5 de la flavina con el FeS I, se encuentran dentro de los hallados para otras APS reductasas, y son apropiados para la transferencia electrónica efectiva (Fritz y col., 2002).



**Figura IV.19.** Distancias entre los sitios paramagnéticos de APSr. Los valores son medidos en Å y se corresponden con los hallados para otras APSr de *Desulfovibrio*. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

La estructura de la subunidad- $\alpha$  está formada por tres partes: un dominio de unión a FAD, un dominio “capping” y otro helicoidal. El dominio de unión a FAD está cubierto parcialmente por el dominio “capping” que permite la exposición de APS. Hay un canal de diámetro aproximado de 13 Å que está formado por el dominio de unión a FAD y el dominio “capping” a través del cual, aparentemente, es transportado el sustrato. Los dominios helicoidal y de unión a FAD forman un hueco poco profundo en que se encuentra incrustada la subunidad- $\beta$ . La comparación estructural con otras enzimas indica que la subunidad- $\alpha$  de APSr podría ser homóloga con las estructuras de antecesores de flavoenzimas debido a la cercanía aparente del metabolismo anaeróbico del azufre en su evolución (Chiang y col., 2009).

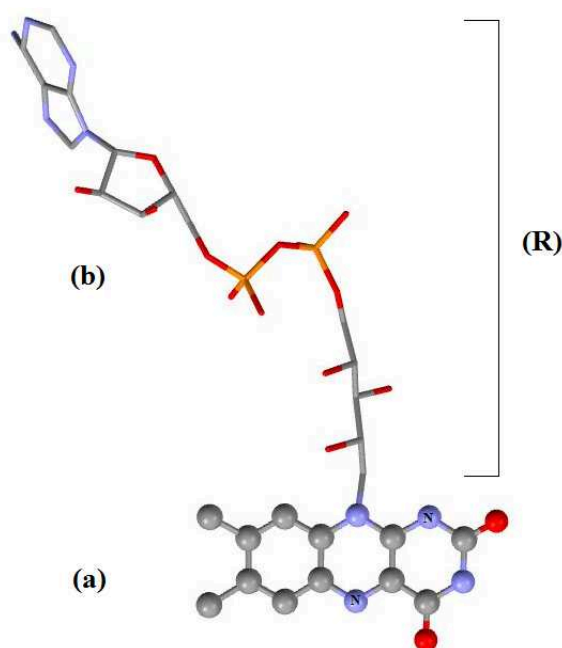
La subunidad- $\beta$  -de menor peso molecular- pertenece a la familia de las ferredoxinas. La misma se encuentra dividida en tres segmentos: dominio de unión a los centros [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>], lámina  $\beta$  y dominio C-terminal. La estructura del dominio de unión a los centros puede ser superpuesta sobre la ferredoxina II de *D. gigas* y ferredoxina de *C. vinosum* con una desviación de 3.2 Å y 3.4 Å de los átomos de la cadena principal, respectivamente por lo que se la considera similar a la estructura de dichas metaloproteínas. Ésta envuelve los dos centros [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]. El dominio de unión a los centros FeS, se encuentra inmerso en una hendidura poco profunda de la subunidad- $\alpha$ ,

con los otros dos dominios interactuando con la subunidad- $\alpha$  para estabilizar el heterodímero (Chiang y col., 2009).

#### IV.4.4 Mecanismo cinético

APSr transfiere dos electrones al sulfato activado por ATPs, reduciéndolo a sulfito *in vivo*. La reducción requiere que los dos electrones que tienen que ser transferidos a la flavina, pasen desde el FeS II en contacto con la superficie de la proteína hacia el FeS I y finalmente al cofactor flavina, que se los transfiere al sustrato (Chiang y col, 2009).

El cofactor redox flavina permite la transferencia de hasta 2 electrones. Estructuralmente está formado por el nucleótido adenina unido a una molécula de riboflavina mediante dos grupos fosfato (figura IV.20).

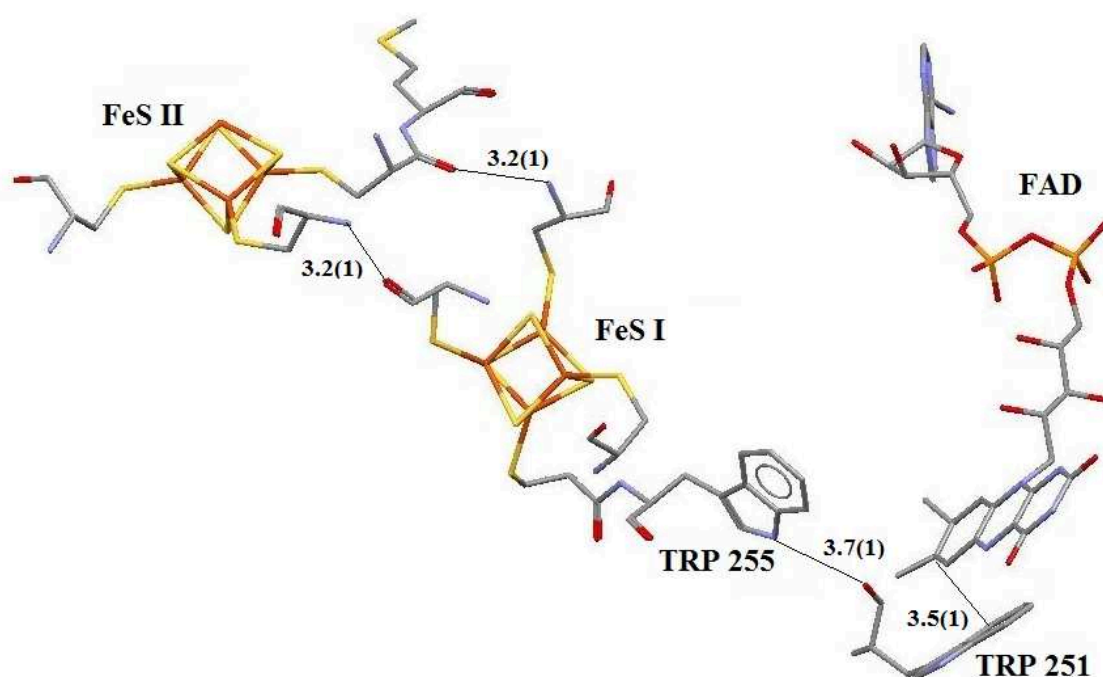


**Figura IV.20.** Estructura de la flavina presente en APSr. El cofactor se encuentra formado por: (a) Riboflavina (anillo isoaloxazina + ribosa) y (b) Adenosina. Los nitrógenos marcados del anillo isoaloxazina son los involucrados en el intercambio electrónico. En adelante se denomina como R a las moléculas que acompañan el anillo. . La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

Los átomos que intervienen en el intercambio electrónico son los dos nitrógenos presentes en el centro de la estructura de anillos fusionados (isoaloxazina) aceptando cada uno un átomo de hidrógeno al ceder el electrón. Durante la transferencia, el cofactor oxidado o quinona ( $FAD^{2+}$ ) intercambia un electrón dejando a la flavina en estado de semireducido o semiquinona ( $FADH^+$ ). La transferencia electrónica completa



deja a la flavina en estado reducido o hidroquinona ( $\text{FADH}_2$ ). La reacción  $\text{FAD}^{2+} \leftrightarrow \text{FADH}^+ \leftrightarrow \text{FADH}_2$  es reversible (Nelson y Cox, 2001). La transferencia electrónica entre el dador electrónico fisiológico y el FeS II requiere el acoplamiento del mismo a la región de la proteína adyacente al FeS I. La comparación de secuencias indica que la región de interfaz potencial que incluye un bucle flexible se conserva en APSr de BSR pero no enzimas de *A. vinosum* oxidantes de azufre en que el bucle está ausente. Esta observación apoya la idea de que diferentes dadores electrónicos interactúan con APSr dependiendo de si se cataliza la reducción de APS o la oxidación de sulfito y AMP.

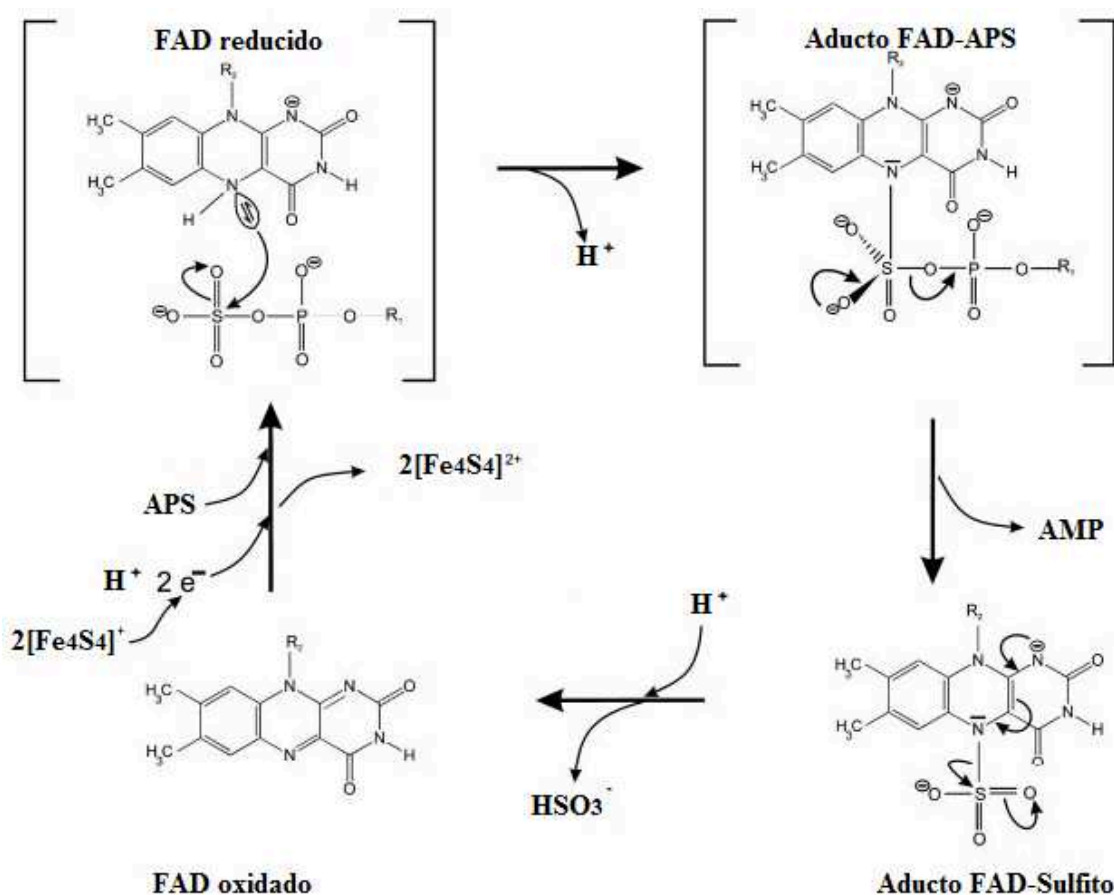


**Figura IV.21.** Camino químico propuesto involucrado en la transferencia electrónica desde el FeS II pasando a través del FeS I hasta el FAD (las líneas delgadas indican interacciones hidrofóbicas e interacciones puentes de hidrógeno). La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

El camino químico propuesto para realizar la transferencia electrónica  $\text{FeS II} \rightarrow \text{FeS I} \rightarrow \text{Flavina}$  en APSr involucra las uniones covalentes de distintos residuos de aminoácidos e interacciones hidrofóbicas y uniones puentes de hidrógeno. El residuo TRP 255 está estrictamente conservado (figura IV.21). El anillo indol de TRP 255 es bloqueado en su posición por un enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de TRP 251. Los residuos TRP entre los centros redox se adaptan para la transferencia de electrones, tal como se documenta en el centro de reacción fotosintética (Deisenhofer y Michel, 1989) y el complejo citocromo peroxidasa-citocromo *c* (Pelletier y Kraut, 1992). El sitio activo de APS reductasa está en el interior de la proteína y es accesible



sólo desde el exterior a través de un canal de 17 Å de largo con un diámetro de aproximadamente 10 Å. El canal está formado en la interfaz entre el dominio de unión al FAD y el dominio “capping”. La apertura del canal está ligada a un exceso de residuos cargados positivamente (Arg-,Lys) que pueden proporcionar una selección para aniones tales como sulfito, AMP o APS. La parte inferior del canal aloja el bolsillo de unión del anillo isoaloxazina.

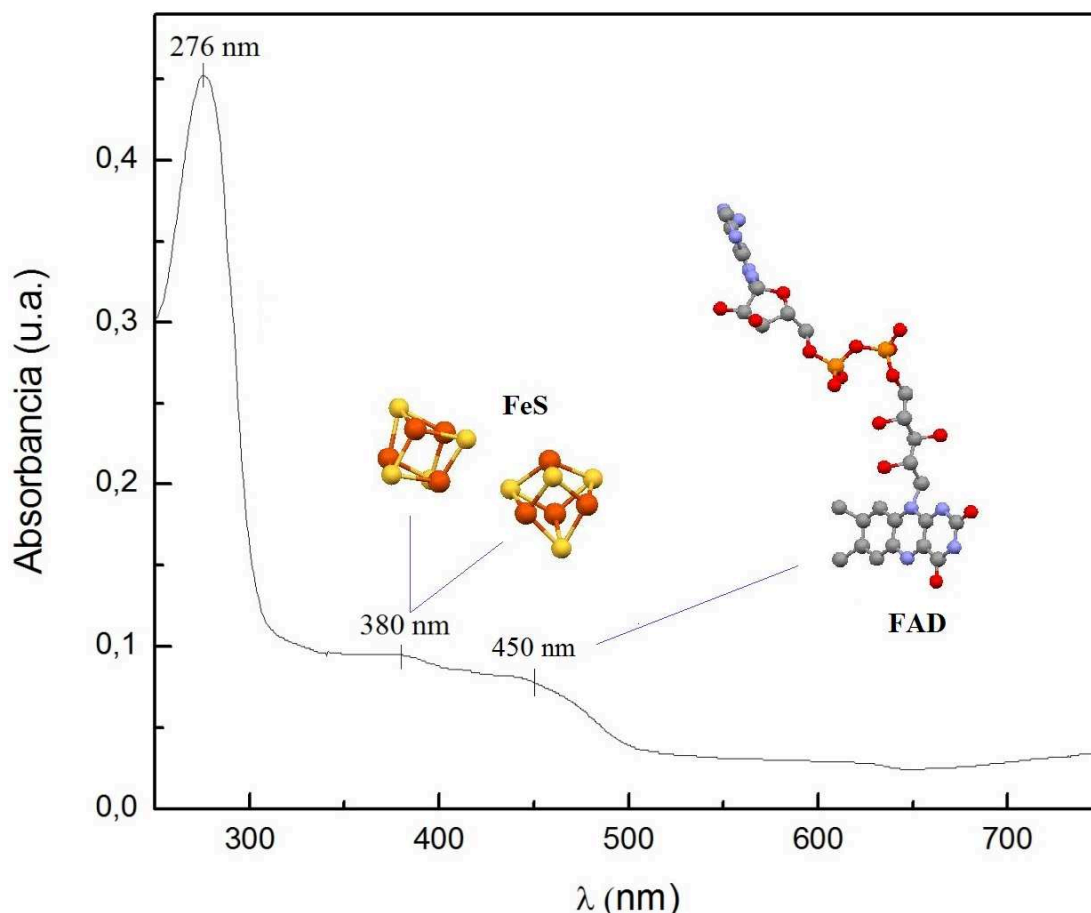


**Figura IV.22.** Mecanismo propuesto de reducción de APS por APSr (modificado de Fritz y col., 2002).

El ciclo de reacción se inicia mediante la reducción de  $\text{FAD}^{2+}$  a  $\text{FADH}_2$  y la posterior unión de APS (figura IV.22). El átomo N-5 del  $\text{FADH}_2$  ataca el azufre del APS para formar un aducto de FAD-APS. El intermedio propuesto se descompone espontáneamente a AMP y el APSR-sulfito, luego el sulfito se libera. Presumiblemente, el paso clave en el ciclo de reacción es la formación del intermediario FAD-APS que sería más fácil si el átomo N5 del FAD se vuelve más nucleofílico y el azufre se convierte en sulfato más electrofílico. (Fritz y col., 2002; Chiang y col, 2009).

#### IV.4.5. Caracterización espectroscópica mediante UV-vis

La figura IV.23 muestra el espectro UV-vis de la enzima purificada a partir de *D. desulfuricans* (ver técnica de purificación en sección.2.2). En este se observan dos bandas, una alrededor de 380 nm y otra en 450 nm además de un pico de absorción proteico a 276 nm ( $A_{276}/A_{380} = 4.76$ ).



**Figura IV.23.** Espectro UV-vis de APSr purificada de *Desulfovibrio desulfuricans*. La enzima nativa se encuentra en estado oxidado.

El espectro entre 340 y 400 nm es característico de la presencia de centros FeS. La banda centrada en 450 nm es típica de la presencia del radical flavina. El perfil espectroscópico es similar a los reportados para *D. vulgaris* con máximos de absorción a 372 nm y a 278 nm (Bramlett y Peck Jr., 1975) y para *D. gigas* con máximos de absorción a 392 y a 278 nm (Lampreia y col., 1990) también presentes para *D. aminophilus* (López-Cortés y col., 2005). El hecho que los espectros UV-vis en APSr de distintas fuentes sea esencialmente idéntico, confirma que a pesar de las diferentes secuencias de amino ácidos de estas proteínas, el tipo y estructura de los cofactores

redox son los mismos, lo cual también puede ser verificado por otras técnicas espectroscópicas como espectroscopia Mossbauer y EPR (Lampreaia y col., 1994).

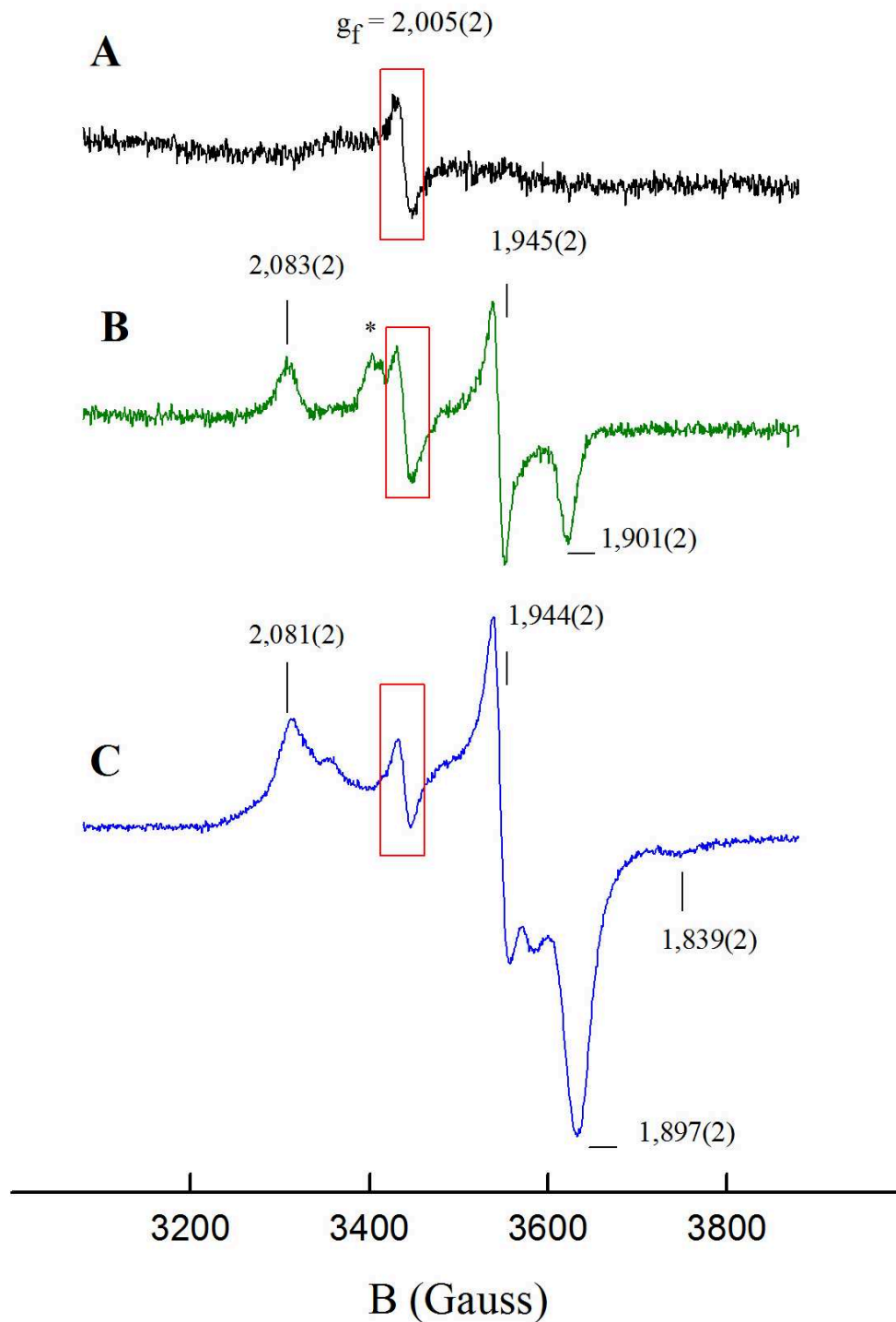
#### IV.4.6 Caracterización espectroscópica mediante EPR

##### IV.4.6.1 Centros paramagnéticos

Las señales de EPR asociadas con los sitios paramagnéticos de *DdAPSR* fueron obtenidas a partir de la enzima nativa purificada en aerobiosis (sección 2.2) y tratada con el reductor ditionito de sodio en dos tiempos: una reducción corta de aproximadamente 15 segundos y una larga durante 30 minutos, ambas en condiciones de anaerobiosis.

La gráfica IV.24 muestra los espectros de EPR asociados con los tres sitios obtenidos en estas tres condiciones (*as-purified*, reducida 15 segundos y 30 minutos). Satisfaciendo la condición de resonancia, se obtiene la señal de la flavina (espectro A en gráfica IV.24) a partir de la metaloproteína purificada en condiciones aeróbicas que corresponde al radical en el estado semiquinona y se calcula el valor de  $g$  mediante la ec. III.1. Esta señal presenta simetría casi axial con  $g = 2,005(2)$  y ancho de línea pico a pico de  $16,7(1)$  Gauss. Esta señal fue detectada en el rango de temperaturas de 4 a 200 K indicando que presenta tiempos de relajación largos, lo cual es característico de señales asociadas con radicales libres.

Es importante notar también que la señal de EPR de la flavina no cambia de intensidad bajo condiciones de oxidación/reducción, indicando que agentes oxidantes/reductores externos como el ditionito y el ferrocianuro no interactúan directamente con la molécula de flavina. Los estados paramagnéticos de los centros FeS se obtienen en el estado  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$  (configuración electrónica:  $1 \text{ Fe}^{3+}$ ,  $3 \text{ Fe}^{2+}$ ) (gráfica IV.24, espectros A y B). El espectro B en la gráfica IV.24 muestra en adición a la señal de la flavina, la correspondiente al centro FeS I. Es importante notar que esta designación no necesariamente corresponde al FeS I determinado cristalográficamente. La señal FeS I presenta simetría rómbica con parámetros  $g_1 = 2,083(2)$ ,  $g_2 = 1,945(2)$  y  $g_3 = 1,901(2)$ . Esta señal es detectada a temperaturas menores de 50 K (variación con temperatura de los espectros, ver Anexo IV) indicando que presenta una velocidad de relajación mayor que la del radical flavina.



**Figura IV.24.** Espectros de EPR de *DdAPSr* tomados a  $T = 60$  K y  $\nu = 9,75$  GHz. **Espectro A:** *DdAPSr* nativa. **Espectro B:** *DdAPSr* reducida con ditionito de sodio durante 15 segundos en condiciones de anaerobiosis. **Espectro C:** *DdAPSr* reducida con ditionito de sodio durante 30 minutos. En todos los espectros es detectable la señal de la flavina  $g_f = 2.005 \pm 0.002$ . Las distintas condiciones de los espectros no cambian significativamente ni la posición ni la forma de línea del radical flavina. La señal indicada con un (\*) en el espectro **B** corresponde a un centro  $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$  que se produce como una degradación mínima de uno de los centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ .

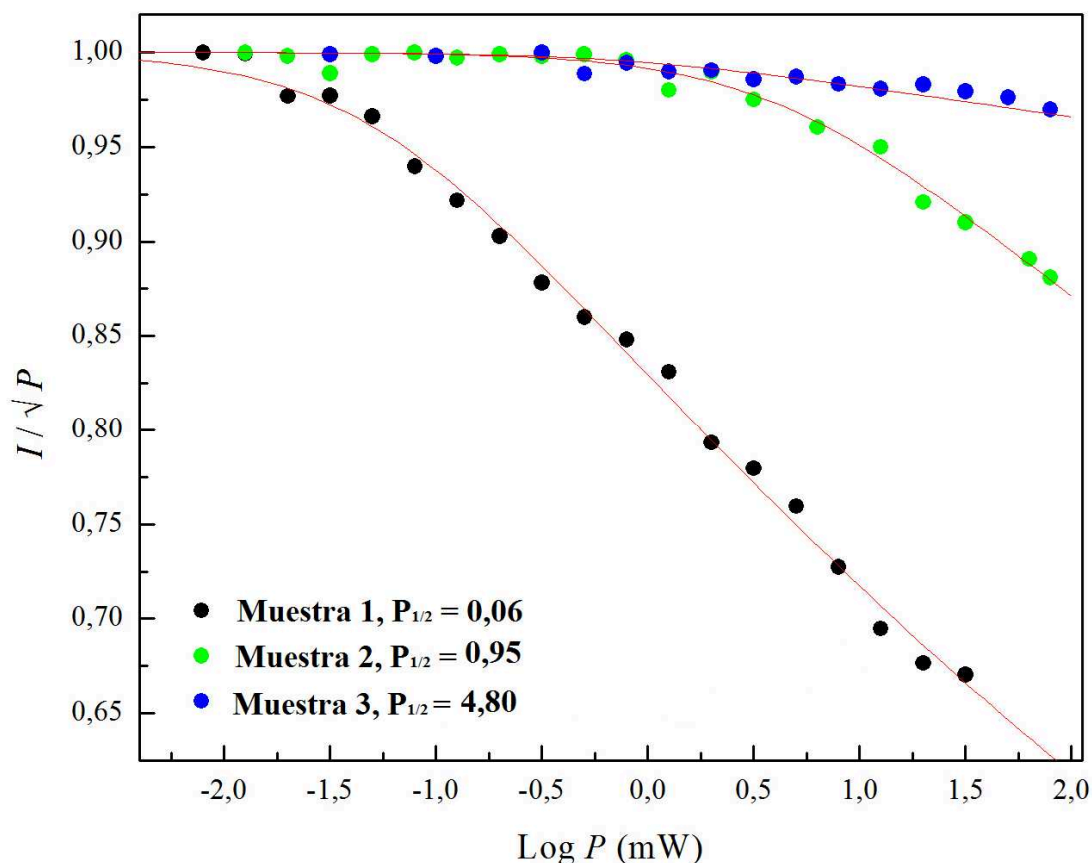
La señal correspondiente al FeS II se observa en la muestra reducida con ditionito por media hora (espectro C en gráfica IV.24). Esta es detectada a temperaturas aún menores a 20 K-indicando que su velocidad de relajación es aún mayor a la del FeS I. La señal del FeS II presenta valores de  $g$  en el rango 1,839-2,081. Su forma no se puede determinar precisamente debido a que esta superpuesta a la del FeS I. Además la presencia de esta señal produce cambios en la forma de línea y corrimientos de los picos característicos de la señal del FeS I, indicando la presencia de acoplamientos magnéticos entre estos centros. Este aspecto será tenido en cuenta en la asignación de los centros detectados por EPR con los centros FeS identificados cristalográficamente.

#### IV.4.6.2 Acoplamiento magnético

Como se analizó anteriormente, los cambios experimentados por la señal del FeS I en presencia de la del FeS II indican la existencia de acoplamientos magnéticos entre ambos centros. Esto fue analizado en un trabajo anterior a partir del estudio de las resonancias de EPR asociadas con los centros FeS y mediante estudios de saturación de la señal de EPR del FeS I realizados en la muestra reducida por 15 s y la muestra reducida por 30 minutos (Lamprea y col., 1990) por lo cual no será analizado en este trabajo.

Si bien el acoplamiento magnético entre el FeS I y el FeS II está claramente puesto de manifiesto por los cambios en las señales de EPR y los estudios de saturación (Lamprea y col., 1990), en ninguno de estos trabajos previos se evaluó si existía acoplamiento magnético entre la flavina y los centros FeS. El hecho que la forma de línea de la señal de la flavina no se modifica en la muestra reducida durante 30 min (espectro C en la figura IV.24) con respecto a la obtenida en el espectro A indica que el acoplamiento magnético entre la flavina y los centros FeS es muy débil para ser detectado por EPR a partir de la simple observación de los espectros. Por ello, se procedió a evaluar las propiedades de saturación de la señal de la flavina en distintas condiciones experimentales de la proteína para poder detectar cambios en sus propiedades de relajación, y así indirectamente confirmar o descartar la presencia de acoplamiento magnéticos Flavina-FeS (sección III.1.4).

Los estudios de saturación de la señal de EPR de la flavina se efectuaron a la temperatura de 60 K con la muestra de APSr en diferentes estados paramagnéticos identificadas como muestras 1, 2, y 3 (figura IV.25).



**Figura IV.25.** Saturación de la señal de EPR de la flavina efectuada a 60 K en tres condiciones diferentes. Negro (muestra 1): *DdAPSr* en condiciones *as-purified*. Verde (muestra 2): FeS I paramagnético,  $S=1/2$  ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ :  $1\text{Fe}^{3+}$ ,  $3\text{Fe}^{2+}$ ), FeS II diamagnético,  $S=0$  ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ :  $2\text{Fe}^{3+}$ ,  $2\text{Fe}^{2+}$ ). Azul (muestra 3) FeS I y FeS II paramagnético,  $S=1/2$  ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ :  $1\text{Fe}^{3+}$ ,  $3\text{Fe}^{2+}$ ). La señal de la flavina fue detectada en los tres tipos de muestras en una relación de  $\sim 10\%$  respecto de la intensidad de las señales de los centros FeS.

La muestra 1 corresponde a la enzima *as-purified* y su único centro paramagnético es la flavina (espectro A en la Figura IV.24). La muestra 2 se obtuvo titulado “in situ” con ditionito de sodio donde se fue reduciendo la metaloenzima hasta llegar a un estado con un FeS I completamente reducido ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$ :  $1\text{Fe}^{3+}$  +  $3\text{Fe}^{2+}$ ) permaneciendo el FeS II en un estado diamagnético ( $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ :  $2\text{Fe}^{3+}$  +  $2\text{Fe}^{2+}$ ). El espectro que se obtuvo en ese caso es similar al espectro B en la Figura IV.24. La muestra 3 fue obtenida mediante la reducción por 30 min de la APSr y corresponde a un estado donde los dos centros FeS están completamente en su estado paramagnético  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+$  (espectro C en la figura IV.23).

Como se observa en la figura IV.25 la saturación de la señal de la flavina en la muestra 2 se alcanza a potencias de microondas mayores que en la muestra 1, indicando un aumento en la velocidad de relajación del radical flavina en presencia del FeS I en estado paramagnético. Esto confirma indirectamente la existencia de acoplamiento

magnético entre el FeS I y la flavina (sección III.1.4). Más interesante aún es que la velocidad de relajación de la flavina es todavía mayor en la muestra 3, lo cual es puesto de manifiesto por la mayor potencia de microondas que es necesaria para saturar la señal en las condiciones en que los dos centros FeS se encuentran en su estado paramagnético.

El acoplamiento magnético entre los tres centros paramagnéticos de APSr y en metaloproteínas en general con distancias entre los centros mayores a 10 Å, está determinado principalmente por las interacciones de intercambio isotrópica y/o interacción dipolar magnética (Andrade y col, 2000; Brondino y col, 2006a; González y col, 2009). La interacción de intercambio isotrópica está caracterizada por el parámetro de intercambio  $J$  mediante la ecuación:

$$H_{ex} = -J S_1 S_2 \quad (\text{IV.10})$$

donde,  $S_1$  y  $S_2$  son los espines asociados con los centros interactuantes ( $S = 1/2$  para APSr). Esta interacción está relacionada con el camino químico que conecta a los dos centros. La determinación del parámetro  $J$  es importante porque se ha demostrado que su magnitud es proporcional a la velocidad de transferencia electrónica entre dos centros de transferencia electrónica paramagnéticos a través del camino químico que los vincula (González y col, 2009).

El otro tipo de acoplamiento magnético es la interacción dipolar magnética entre dos dipolos magnéticos puntuales, aproximación que es válida en el caso que los dos centros interactuantes estén a distancias mayores que 6 Å:

$$H_{\text{dip}} = \frac{3\mu_0 g^2 \beta_e^2}{16\pi r_{12}^3} (1 - 3\cos^2 \theta) \quad (\text{IV.11})$$

donde  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ N/A}^2$  es la permitividad en el vacío,  $\beta_e$  es el magnetón de Bohr y  $r_{12}$  es la distancia intercentros. Esta interacción es solo dependiente de la distancia entre sitios y puede ser despreciada en el caso de la APSr debido a que la distancia entre centros determina que su valor es aproximadamente  $7,5 \times 10^{-22} \text{ cm}^{-1}$ .

En este contexto, el acoplamiento entre la flavina y los centros FeS puede darse únicamente a través de la interacción de intercambio, la cual debe estar necesariamente relacionada con los caminos químicos descrito en la figura IV.21.

Por otro lado la posibilidad de una interacción de la flavina simultánea con los dos centros es excluida por la topología ya que la interacción flavina-FeS II se daría a través de un camino químico muy largo (figura IV.19). Esto se basa en correlaciones magneto-estructurales en sistemas modelo que muestran que para los caminos químicos descritos en la figura IV.21 la interacción de intercambio es despreciable (Hoffman y col, 1988).

Sobre la base de estas consideraciones, los estudios de saturación muestran que los mayores cambios en las propiedades de saturación de la flavina están dados por el centro FeS I indicando que este es el centro proximal a la flavina. Esto permite además asignar a este centro como el centro I determinado cristalográficamente, siendo trivial en consecuencia asignar al centro II como el distal. Es importante notar que éste efecto entre el radical y el centro FeS I se transmite a través de enlaces puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Este tipo de camino químico típico de metaloproteínas se presentará más en detalle en el capítulo V.

Como se analizó anteriormente sobre la base de los datos cristalográficos (Hoffman y col, 1988) el camino químico flavina-FeS II tiene una topología y extensión no apropiada para transmitir interacciones de intercambio apreciables, lo que de alguna manera estaría en contradicción con los estudios de saturación en la muestra 3 (figura IV.25), ya que la velocidad de la relajación de la flavina es influenciada por el FeS II cuando este se encuentra en su estado paramagnético.

Existen dos posibles hipótesis para explicar el comportamiento de saturación de la muestra 3. Una es una interacción de intercambio directa Flavina-FeS II. La otra sería un comportamiento en cascada, en el cual la interacción FeS II-FeS I provoca un incremento en la velocidad de relajación del FeS I, y este incremento se traduce en un aumento de la velocidad de relajación de la flavina.

La primera de las hipótesis es poco probable debido a que los caminos químicos con topologías similares al camino Flavina-FeS II muestran constantes de intercambio despreciables (Hoffman y col., 1988). En cambio, la segunda hipótesis tiene de alguna manera soporte experimental, ya que, como se discutió con anterioridad (Lampreia y col, 1990) la velocidad de relajación del FeS I se incrementa a partir del acoplamiento magnético con el FeS II.

Independientemente de cual de las dos hipótesis sea válida, los datos presentados muestran que a pesar de la gran distancia y topologías diversas de los caminos químicos entre centros rédox en metaloproteínas de transferencia electrónica, los sitios no se



comportan como centros aislados, y un cambio en el estado paramagnético en uno de los centros puede ser “sentido” por un centro distante.

Por lo tanto, estos cambios de alguna manera sutiles en la configuración electrónica en uno de los centros, pueden actuar como disparadores para producir el proceso de transferencia electrónica.



## *Capítulo V*

---

## V. MODELADO EN METALOPROTEÍNAS

### V.1 Introducción

Los estudios de *DdAPSr* plantearon varios interrogantes respecto de la eficiencia de los caminos químicos en producir transferencia electrónica entre el sitio activo donde se encuentra unida covalentemente la flavina y el centro FeS próximo. Como se muestra en la figura IV.21 el camino químico de la APSr incluye caminos químicos covalentes, la interacción hidrofóbica entre los anillos de isoaloxazina de la flavina y del triptófano 251 y distintos tipos de uniones puentes hidrógeno.

El rol de las interacciones hidrofóbicas como caminos de intercambio es aún materia de discusión. Si bien está establecido que pueden transmitir interacciones de intercambio débiles, el número de casos reportados no es concluyente. Además, los valores reportados no son obtenidos a partir de una única metodología general, lo cual ha impedido hasta el momento establecer una clara correlación magneto estructural.

Con el fin de dilucidar las cuestiones planteadas en un sistema complejo, como lo es una metaloenzima, se sintetizó y caracterizó estructural y espectroscópicamente en fase condensada un complejo mixto de Cu (II) con el aminoácido ácido glutámico y la amina aromática fenantrolina, Cu(glu)phen, que contiene posibles caminos de intercambio entre iones Cu que incluyen a la amina aromática utilizando para el análisis de EPR una metodología desarrollada en el grupo. Es importante notar que el objetivo final de estos estudios es poder concluir acerca de la eficiencia de estas interacciones en mediar procesos de transferencia electrónica entre dos centros (Brondino y col, 1995), ya que la velocidad de transferencia electrónica entre dos centros paramagnéticos a través del camino químico que los une es proporcional a la constante de intercambio  $J$  en condiciones de máxima velocidad (Neuman y col, 2010).

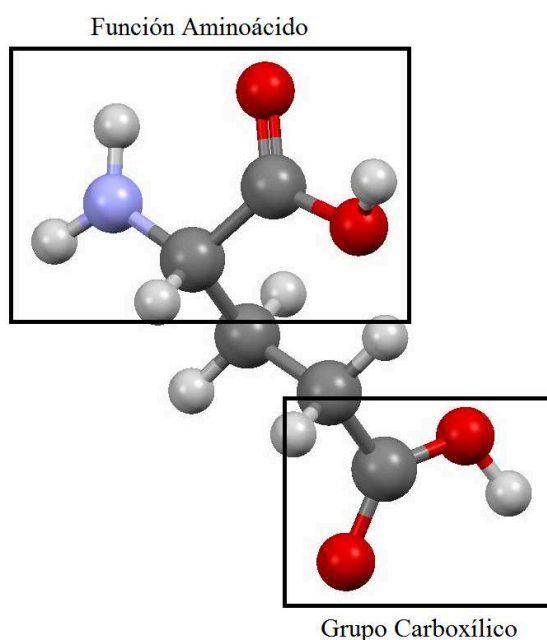
Otro aspecto investigado dentro de la problemática global de transferencia electrónica en proteínas, que cumplen dicha función, es el rol que cumplen los puentes de hidrógeno. Al igual que para las interacciones hidrofóbicas, está demostrado que los puentes de hidrógeno pueden transmitir interacciones de intercambio (González y col., 2009), pero no existe hasta la fecha una clara correlación entre magnetismo y estructura. En particular un aspecto a tener en cuenta dentro de la problemática de interacciones puentes de hidrógeno es como éstas pueden efectivamente contribuir al proceso de

transferencia electrónica intraproteína. Las interacciones puente de hidrógeno son muy flexibles y en moléculas que involucran tanto átomos aceptores como donores se pueden dar básicamente dos situaciones extremas, una en la que la unión puente de hidrógeno se de intramolecular, y otra en la que adopte una configuración que establezca interacciones intermoleculares. Evidentemente, esta última posibilidad es la que a priori permitiría maximizar el proceso de transferencia electrónica, tal como se plantea en el camino químico para la transferencia electrónica donde interviene APSr (figura IV.21). Sobre la base de este análisis, y con el objetivo de incorporar una nueva metodología que permita generar conocimiento en esta área, se caracterizaron además en fase gas mediante espectroscopia de rotación los ligandos de iones metálicos, ácido picolínico y nicotinamida, que permitieron modelar las dos situaciones planteadas.

## V.2 Fase condensada: Sistema Modelo

### V.2.1 Cu(glu)phen: Sistema modelo del camino químico FAD-FeS I

El ácido L-glutámico es un aminoácido cuya estructura tiene la particularidad de acomplejar dos iones Cu (II) para dar origen a estructuras poliméricas del tipo -Cu-glu-Cu-glu-Cu- (Brondino y col., 1993).



**Figura V.1.** Estructura del ácido L-glutámico. La presencia del grupo carboxílico adicional en la cadena lateral posibilita la formación de complejos con metales de transición con diversas posibilidades estructurales. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

Estas estructuras se establecen debido que el aminoácido puede coordinar un ion Cu (II) a través de la función aminoácido y otro mediante el grupo carboxilato de la cadena lateral (Rizzi y col., 2000a; Schweigkardt y col., 2002) como se aprecia en la figura V.1. La estructura polimérica puede ser interrumpida cuando el aminoácido compite por el sitio metálico con aminas aromáticas y de esta manera se originan estructuras donde la característica que las distingue del compuesto puro con el aminoácido es la formación de interacciones hidrofóbicas entre las aminas aromáticas (Brondino y col., 1997)

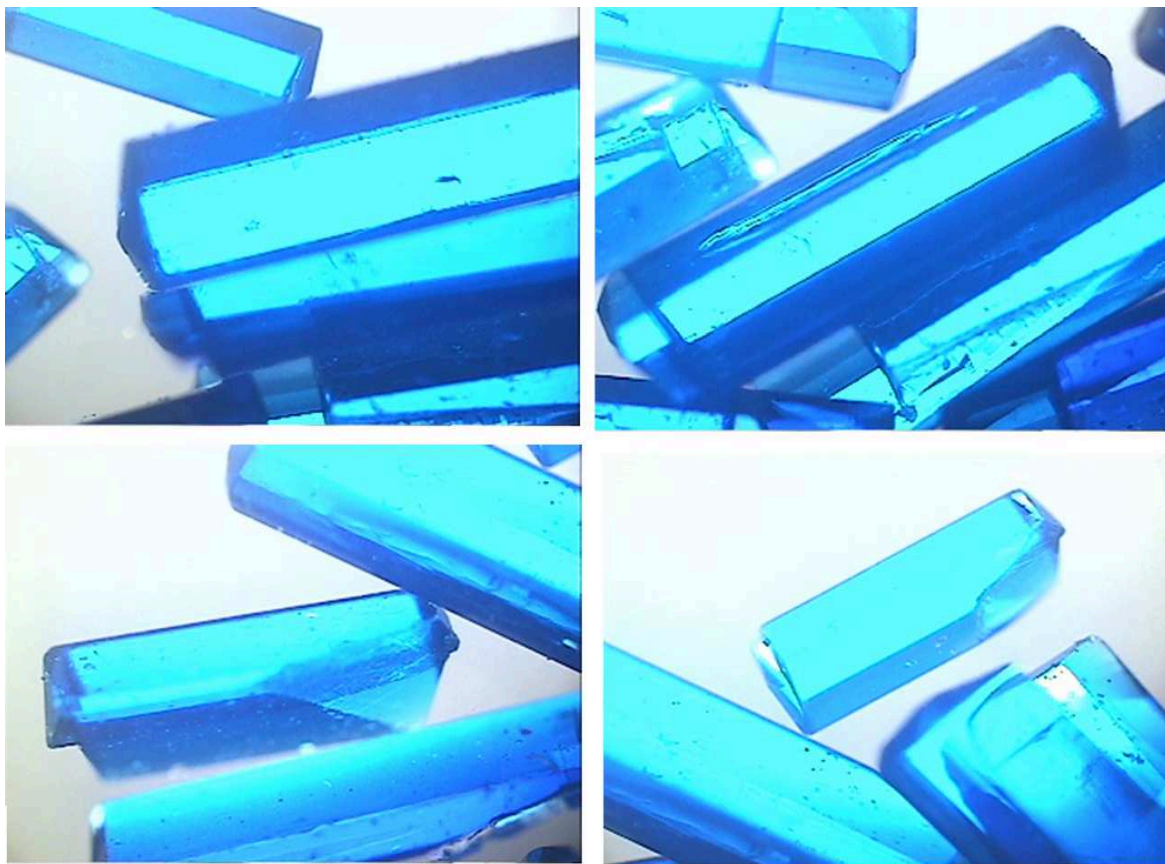
El objetivo de esta parte del trabajo fue obtener un compuesto previamente reportado por Antolini (Antolini y col., 1985), pero dado que en experiencias previas del grupo, utilizando los mismos ligandos se originan distintos tipos de compuestos (aún siguiendo protocolos ya reportados) se procedió a investigar variados procedimientos de cristalización. Las experiencias se realizaron con un diseño experimental sencillo, tomando los factores en forma independiente (condiciones de cristalización) y evaluando los efectos que la variación del rango de cada uno de ellos causó en la respuesta (formación de diferentes complejos). Si bien el compuesto obtenido fue diferente al reportado por Antolini y colaboradores, se pudo obtener un compuesto que se ajustaba a las condiciones requeridas para el estudio: un compuesto que tuviese un único centro por celda unidad desde el punto visto magnético y en el que las interacciones entre centros sean mediadas por interacciones hidrofóbicas. La síntesis, cristalización y caracterización de este compuesto se describe en las secciones siguientes.

### **V.2.2. Síntesis y cristalización del complejo**

Se probaron diferentes condiciones de cristalización utilizando distintas sales de cobre a pH diferentes pero solamente se obtuvieron resultados satisfactorios bajo las condiciones que se reportan a continuación: Se disolvieron 5 mmoles de  $\text{CuNO}_3$ , 7.5 mmoles de 1,10-fenantrolina y 5 mmoles de ácido L-glutámico en agua destilada a temperatura ambiente, obteniéndose una solución de color azul intenso.

La solución fue filtrada con filtro de acetato de celulosa con 0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore®). La solución resultante (pH 2.3) se mantuvo a temperatura constante (28°C) y al cabo de 4 días se obtuvieron monocristales de color azul intenso con forma de paralelepípedo (figura V.2).

Los monocristales obtenidos fueron lavados con agua fría y conservados en ambiente seco hasta su uso.



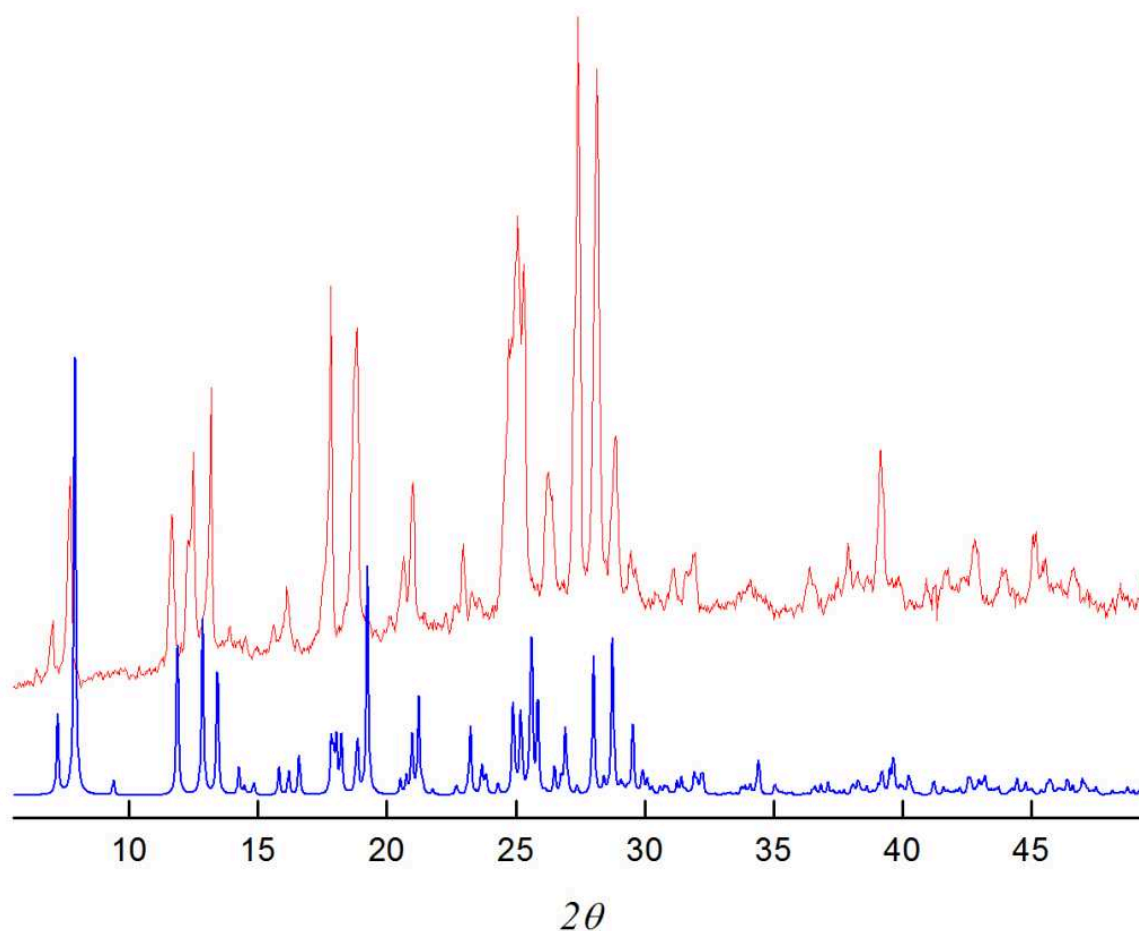
**Figura V.2.** Cristales sintetizados de Cu(glu)phen. El color azul que presentan es típico de los complejos de Cu(II).

### V.2.3 Difracción de Rayos X de polvo

El complejo obtenido se caracterizó mediante difracción de rayos X en polvo para verificar si el mismo se correspondía con uno previamente reportado por Antolini y col., 1985.

Con este fin, una muestra de polvo de Cu(glu)phen -obtenida pulverizando monocristales cuidadosamente en mortero de porcelana- fue analizada con un Difractómetro *Shimadzu XD-D1* perteneciente al Centro Nacional de Catálisis (CENACA) dependiente del Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (INCAPE) que funciona en la Facultad de Ingeniería Química de la UNL. El difractograma obtenido se utilizó para comparar con el difractograma simulado del compuesto de Cu (II) obtenido previamente con los mismos ligandos (Antolini y col., 1985). La simple comparación del difractograma obtenido para el compuesto sintetizado

con el del complejo reportado por Antolini y colaboradores (figura V.3) revela que el mismo es diferente.



**Figura V.3.** Diffractograma de polvo: en azul difractograma simulado para el compuesto reportado por Antolini y col. (Antolini y col., 1985); en rojo el complejo sintetizado. Claramente se observan las diferencias en la ubicación de los picos entre ambos compuestos y la presencia de otros.

#### V.2.4 Análisis Elemental

Debido a que los datos de rayos X de polvo, indicaron claramente que se trataba de un complejo diferente al complejo reportado por Antolini y colaboradores, se procedió a caracterizar por análisis elemental la composición en C, H, N y S del Cu(glu)phen. Este ensayo se realizó en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) con un equipo *Carlo Erba EA 1108*.

Los valores obtenidos se reportan en la tabla V.1 y se corresponden con los datos de difracción de rayos X en monocristal que se describen abajo.

A partir del análisis elemental se concluyó que era un compuesto de fórmula  $C_{17}H_{22}CuN_4O_{10}$  (PM = 505.93 g/mol), lo cual fue confirmado posteriormente mediante un estudio de difracción de rayos X en monocristal.

**Tabla V.1.** Composición elemental del complejo. Porcentaje teórico y experimental del Cu(glu)phen.

Composición	%N	%C	%H
Teórica	11.1	40.4	4.4
Experimental	10.8 ± 0.3	39.8 ± 0.3	4.9 ± 0.2
Antolini y col. 1985	9.1	44.3	5.0

### V.2.5 Difracción de Rayos X de monocristal

Ante la evidencia experimental de que el complejo sintetizado se trataba de un nuevo compuesto, se procedió a determinar su estructura mediante la técnica de Difracción de rayos X en monocristal. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Ricardo Baggio de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

**Tabla V.2.** Resumen de datos cristalinos, colección de intensidad y parámetros de refinamiento  $[Cu(glu)(phen)]H_2O]^+ \cdot NO_3^- \cdot 2H_2O$ .

Fórmula = $Cu \cdot (C_5H_8NO_4) \cdot (C_{12}H_8N_2) (H_2O) \cdot (NO_3) \cdot 2(H_2O)$	
PM (g/mol) = 505.93	$V = 999.12 (7) \text{ \AA}^3$
Triclínico, P1	$Z = 2$
$a = 7.1003 (3) \text{ \AA}$	Mo $K\alpha$
$b = 11.8608 (4) \text{ \AA}$	$\mu = 1.16 \text{ mm}^{-1}$
$c = 12.6016 (5) \text{ \AA}$	$T = 150 (2) \text{ K}$
$\alpha = 76.0890 (12)^\circ$	$0.54 \times 0.15 \times 0.08 \text{ mm}$
$\beta = 85.8081 (13)^\circ$	
$\gamma = 75.9362 (11)^\circ$	
Difractómetro Bruker CCD detector de área = 4831 reflexiones independientes	
Corrección de Absorción: multi-scan SADABS (Bruker, 2002) = 4695 reflexiones con $I > 2\sigma(I)$	
$T_{\min} = 0.79, T_{\max} = 0.91$	$R_{\text{int}} = 0.010$
Reflexiones medidas 5816	
<b>Refinamiento</b>	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.030$	Parámetros reducidos de átomos de H
$wR(F^2) = 0.082$	$\Delta\rho_{\max} = 0.45 \text{ e \AA}^{-3}$
$S = 1.08$	$\Delta\rho_{\min} = -0.32 \text{ e \AA}^{-3}$
4831 reflexiones	Estructura absoluta: Flack, 1983
579 parámetros	Parámetro Flack: $-0.005 (12)$
12 restricciones	



Las mediciones de Difracción de Rayos X, se realizaron con un difractor *Bruker* con detector de área inteligente utilizando radiación de Molibdeno Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ).

La estructura fue resuelta por el método directo (SHELXS-97) y refinado mediante matriz completa de cuadrados mínimos en *F2* (SHELXL-97). Los átomos de hidrógeno relevantes para la descripción de las uniones puente H (O-H y N-H) fueron detectados posteriormente mediante una síntesis de Fourier diferente y luego modelados; aquellos unidos a átomos de carbono fueron posicionados teóricamente. En todos los casos, a los átomos de H se les fue permitido variar durante el refinamiento con  $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2 / 1.5U_{\text{eq}}$ .

Un set completo de datos estructurales cristalográficos ha sido depositado en la Base de Datos Estructurales de Cambridge (Cambridge Structural Database, CSD) en formato .cif (depósito CCDC, N° 891324).

Un resumen de los datos cristalinos y parámetros obtenidos del refinamiento de la estructura además de las principales distancias de unión y ángulos se dan en las tablas V.2 y V.3, respectivamente.

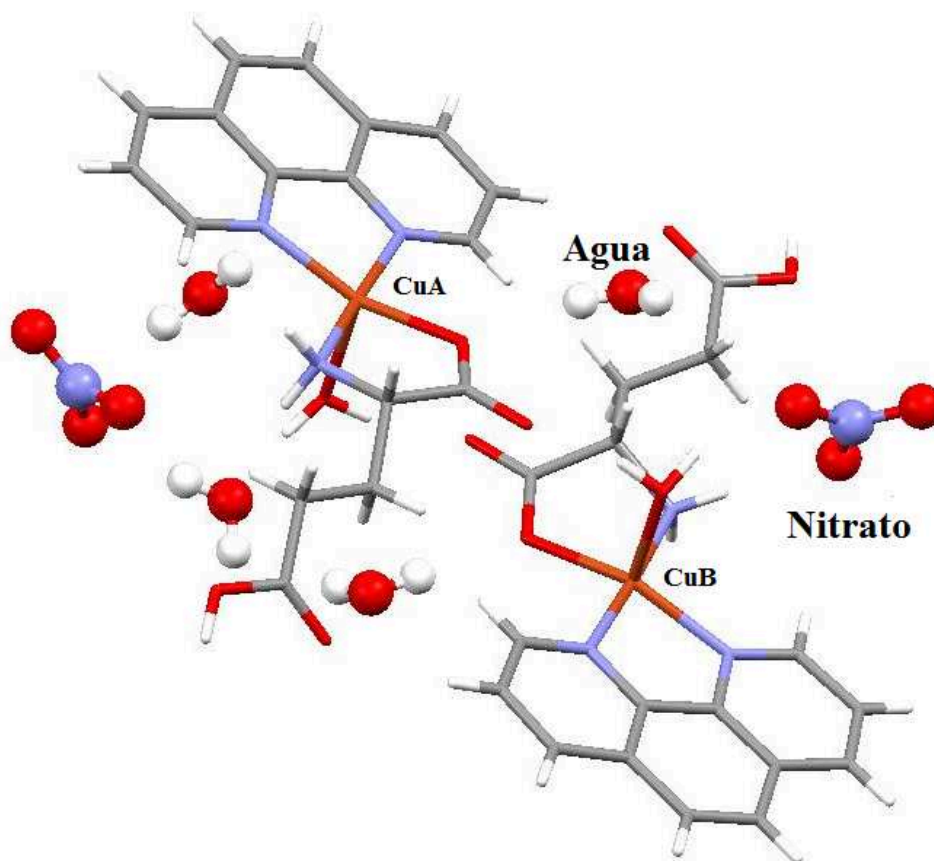
**Tabla V.3.** Distancias ( $\text{\AA}$ ) y ángulos ( $^\circ$ ) de enlaces alrededor de cada Cu(II) del complejo en la celda unitaria (en la figura V.6 se identifica cada átomo).

Distancias de enlace ( $\text{\AA}$ )			
CuA—O1A	1.948 (3)	CuB—O1B	1.972 (3)
CuA—N3A	1.994 (4)	CuB—N3B	1.993 (4)
CuA—N2A	2.003 (4)	CuB—N2B	2.010 (4)
CuA—N1A	2.008 (4)	CuB—N1B	2.024 (4)
CuA—O1W	2.282 (3)	CuB—O2W	2.236 (3)
Ángulos formados ( $^\circ$ )			
O1W-CuA-N1A	99.64(1)	O2W-CuB-N1B	98.17(1)
O1W-CuA-N2A	89.63(1)	O2W-CuB-N2B	85.76(1)
O1W-CuA-N3A	92.90(1)	O2W-CuB-N3B	93.59(1)
O1W-CuA-O1A	97.03(1)	O2W-CuB-O1B	99.21(1)

Durante el transcurso de esta tesis y luego de comprobar, que se trataba de un compuesto diferente al reportado por Antolini y colaboradores, otros autores reportaron otro sistema de cobre con los ligandos ácido glutámico y fenantrolina (Biswas y col., 2010). Los datos confirmaron que el compuesto obtenido es idéntico al reportado por Biswas y colaboradores oportunamente.

### V.2.6 Descripción de la estructura

El complejo Cu(glu)phen cristaliza en el grupo espacial triclínico  $P_1$ . Su estructura está compuesta por dos unidades independientes de fórmula  $[\text{Cu}(\text{glu})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]^+ \text{NO}_3^- \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$  que serán identificadas como CuA y CuB tal como se presenta en la figura V.4.



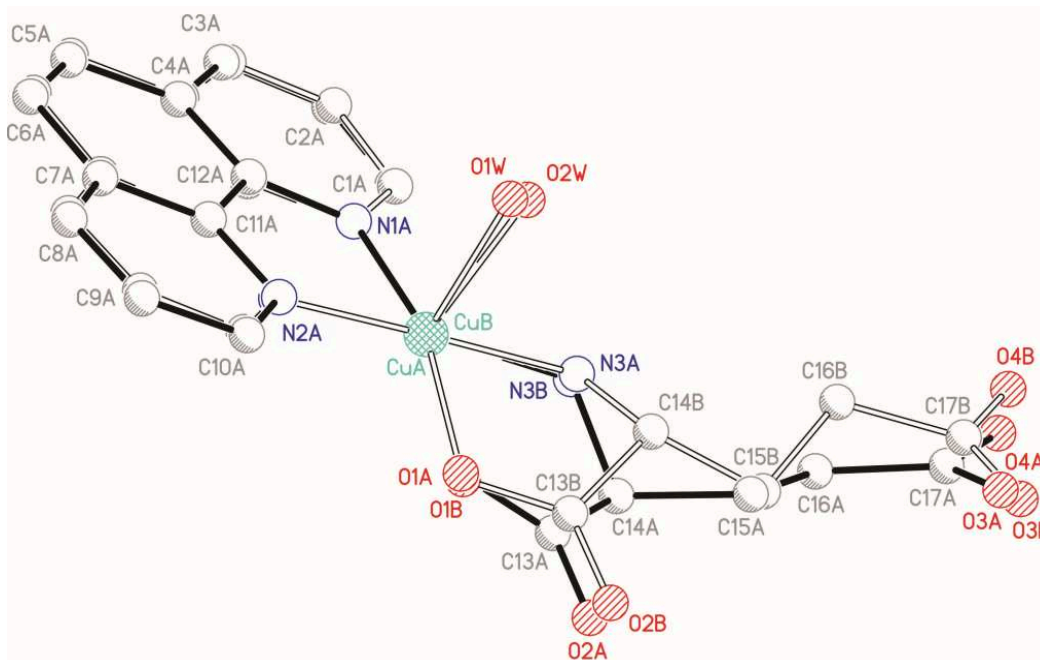
**Figura V.4.** Celda unitaria de Cu(glu)phen. Se destacan las moléculas de agua y nitratos asociadas a la estructura del complejo. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

Asociadas a la unidad estructural, se hallan 4 moléculas de agua y dos de nitrato. La presencia de dos complejos de Cu distintos químicamente (CuA y CuB) determina que la celda unitaria contiene dos moléculas independientes. Cada átomo de cobre está unido a una molécula de ácido L-glutámico, a una molécula de 1,10-fenantrolina y a una de agua (figura V.5).

La geometría de coordinación del ion cobre (II) es piramidal cuadrada distorsionada con dos átomos de N de un ligando phen y un O y un N de un anión glutamato, los dos ligandos como ecuatoriales y un oxígeno de una molécula de agua en posición apical (figura V.5). Debido a que los iones de glutamato se encuentran

protonados individualmente, la molécula principal posee una carga (+1) que se compensa con la externa del contra ión nitrato presente en la fórmula molecular.

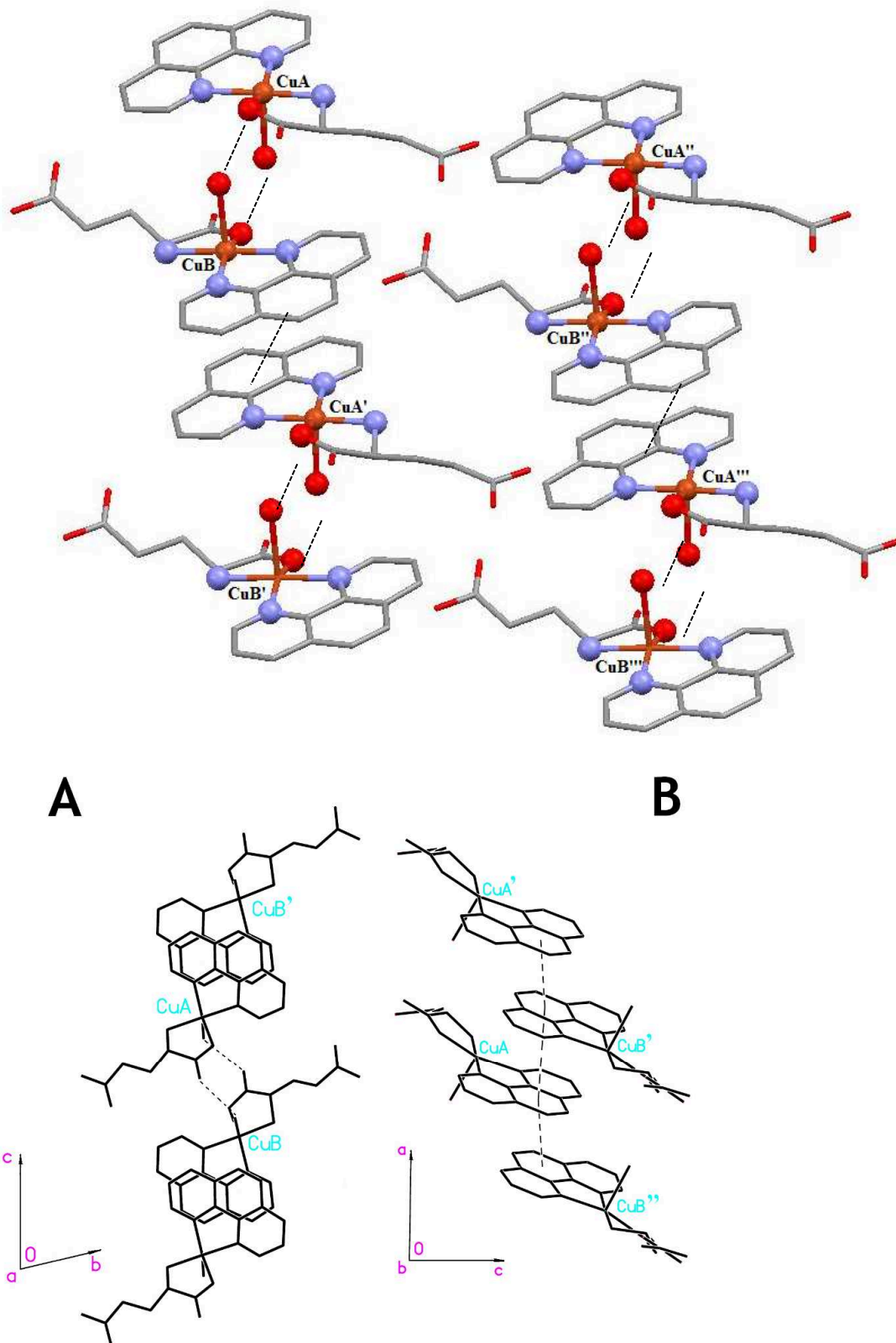
Dos moléculas de agua de hidratación por cada catión de cobre completan la fórmula tal como se observa en la figura V.4.



**Figura V.5.** Superposición de las dos moléculas de Cu(glu)phen, con sus átomos etiquetados, presentes en la celda unitaria a través de una pseudo operación de simetría 1-x, 1-y, 1-z. Se observa un pseudocentro de inversión debido a que la cadena carbonada de los ácidos glutámicos no coinciden. En posición ecuatorial los ligandos phen y glu, enlazados por dos átomos de N y un átomo de N y uno de O, respectivamente. En posición apical una molécula de agua unida al Cu mediante el átomo de O.

Los iones CuA y CuB están relacionados mediante una pseudo operación de simetría (figura V.5; las moléculas de nitrato y de agua ligadas a la estructura son omitidas para mayor claridad), aspecto que será importante para entender las propiedades de EPR del compuesto. El complejo es estabilizado mediante enlaces puente hidrógeno (figura V.6.A) e interacciones hidrofóbicas (figura V.6.B). En la figura V.6.A, se observa que las cadenas más cercanas interactúan a través de un camino químico mixto del tipo  $\text{CuA-O}_{\text{ap}}\text{H}\dots\text{O-C-O}_{\text{eq}}\text{-CuB}$  con una distancia entre átomos de Cu pertenecientes a la misma celda unidad apropiada para la efectividad de éste tipo de enlace ( $d_{\text{CuA-CuB}} = 6.610(5) \text{ \AA}$ ). La estructura cuenta además, con una red compleja de uniones puente de hidrogeno que involucran cadenas de iones Cu vecinos y moléculas del nitrato. Esto último no se muestra debido a que no es relevante en nuestro estudio. En adición, la estructura cristalina del Cu(glu)phen se estabiliza mediante interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de fenantrolina coordinadas a sitios de CuA y CuB ( $d_{\text{CuA-CuB}''} = 8.822(5) \text{ \AA}$ ) pertenecientes a diferentes celdas

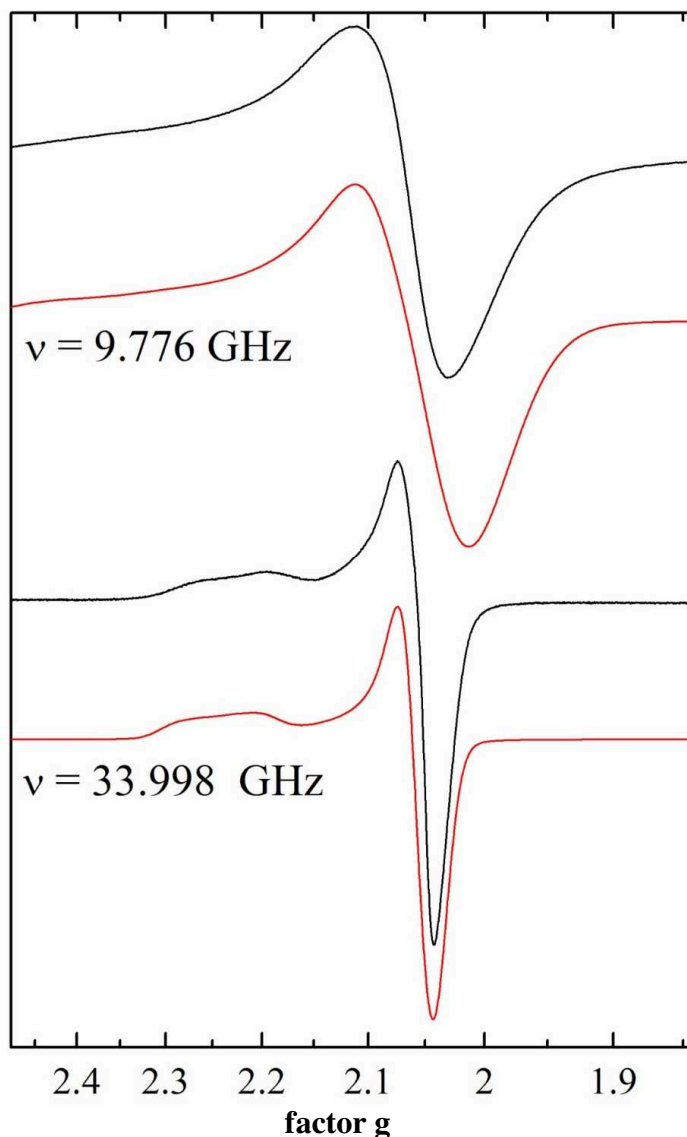
unitarias que se observan en la figura V.6 B. lo cual define cadenas de moléculas de Cu(glu)phen que corren a lo largo del eje cristalino *a*.



**Figura V.6.** Interacciones que estabilizan la estructura del complejo: A) Enlaces puente hidrógeno entre oxígenos de ácido glutámico (glu) de la misma celda. B) Interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre fenantrolinas (phen) de distintas celdas unitarias a lo largo del eje *a*.

### V.2.7 Mediciones de EPR en polvo

Se pulverizaron cristales de Cu(glu)phen en mortero de ágata hasta obtener una muestra policristalina. Se tomaron espectros de EPR en banda X ( $\nu \sim 9,8$  GHz) y en banda Q ( $\nu \sim 34$  GHz) de dicha muestra. En la figura V.7 se observan los espectros de polvo obtenidos de Cu(glu)phen a 298 K.



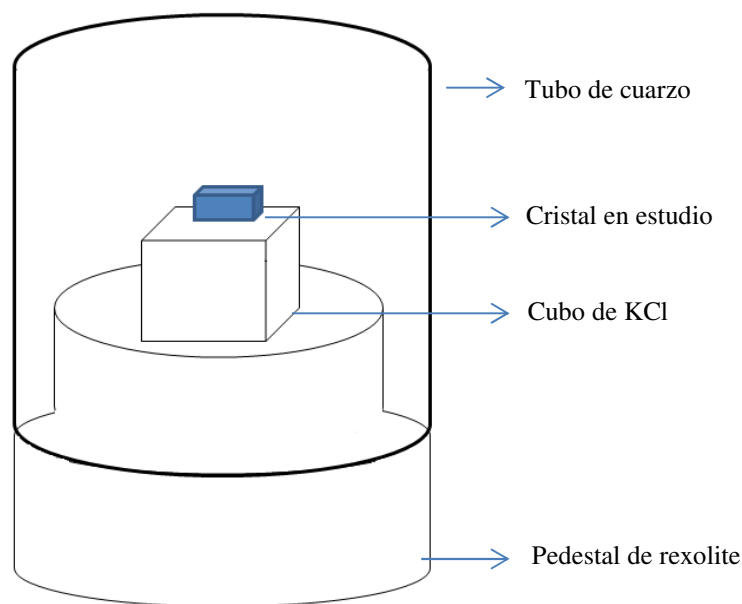
**Figura V.7.** Espectros experimentales en banda X y banda Q a temperatura ambiente de muestras policristalinas de Cu(glu)phen (negro) junto con la simulación de los mismos (rojo) realizada con el software *Easy Spin*. Los valores de  $g$  utilizados en la simulación fueron los obtenidos del experimento de EPR de monocristal (tabla V.4).

El espectro de banda X presenta una única línea asimétrica con posición  $g \sim 2.07$ , mientras que el espectro en banda Q es aproximadamente axial con estructura

hiperfina resuelta parcialmente en la región de  $g_{//}$ . La simulación de éstos espectros se realizó asumiendo un Hamiltoniano consistente de un término Zeeman e interacción hiperfina con un núcleo de cobre ( $I=3/2$ ), en el que los valores del tensor  $g$  se obtuvieron del experimento de EPR de monocristal (sección V.2.8).

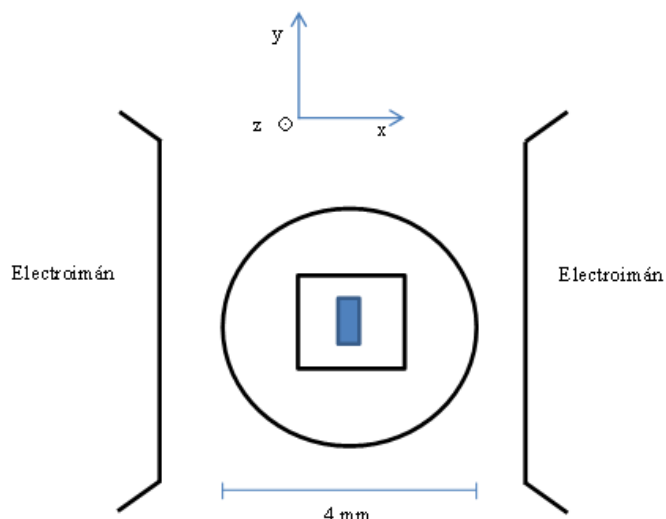
### V.2.8. Mediciones de EPR en monocristal

Para la medición se montó un monocristal de  $\text{Cu}(\text{glu})\text{phen}$  en un cubo de  $\text{KCl}$ , tal como se muestra en la figura V.8. Toda la operación se realizó bajo lupa. Una vez alineado el monocristal con uno de los lados del cubo, se procedió a centrarlo sobre un pedestal de “rexolite” que encastra justo en un tubo de EPR de cuarzo de  $\sim 4$  mm de diámetro interno en banda X y  $\sim 1$  mm en banda Q.



**Figura V.8.** Montaje del monocristal dentro del tubo de cuarzo que se introduce en la cavidad resonante del espectrómetro de EPR. El cristal se alinea tomando como referencia los lados de un cubo de  $\text{KCl}$ , ambos son adheridos al pedestal de rexolite.

Los espectros de EPR de monocristal fueron tomados en tres planos ortogonales  $xy$ ,  $zx$ ,  $zy$ . La dirección de los ejes cartesianos se determinó considerando la orientación con respecto a las piezas polares del electroimán tal como se presenta en la figura V.9. La medición implicó la rotación del sistema formado por cristal + cubo de  $\text{KCl}$  en los 3 planos. Cada plano fue medido de  $0$  a  $180^\circ$  en intervalos de  $10^\circ$  para obtener la variación angular correspondiente. Los espectros obtenidos se encuentran en el Anexo IV.



**Figura V.9.** Vista superior del tubo de cuarzo con el montaje de KCl y monocristal. La medición en la cavidad del espectrómetro de EPR se realizó rotando de 0 a 180° en cada plano considerando arbitrariamente los ejes cartesianos.

La figura V.10 presenta la variación angular en banda X y en banda Q del factor  $g^2$  en los 3 planos cristalinos obtenida midiendo los centros de gravedad de los espectros de monocristal. Estos datos fueron ajustados considerando un tensor de segundo orden:

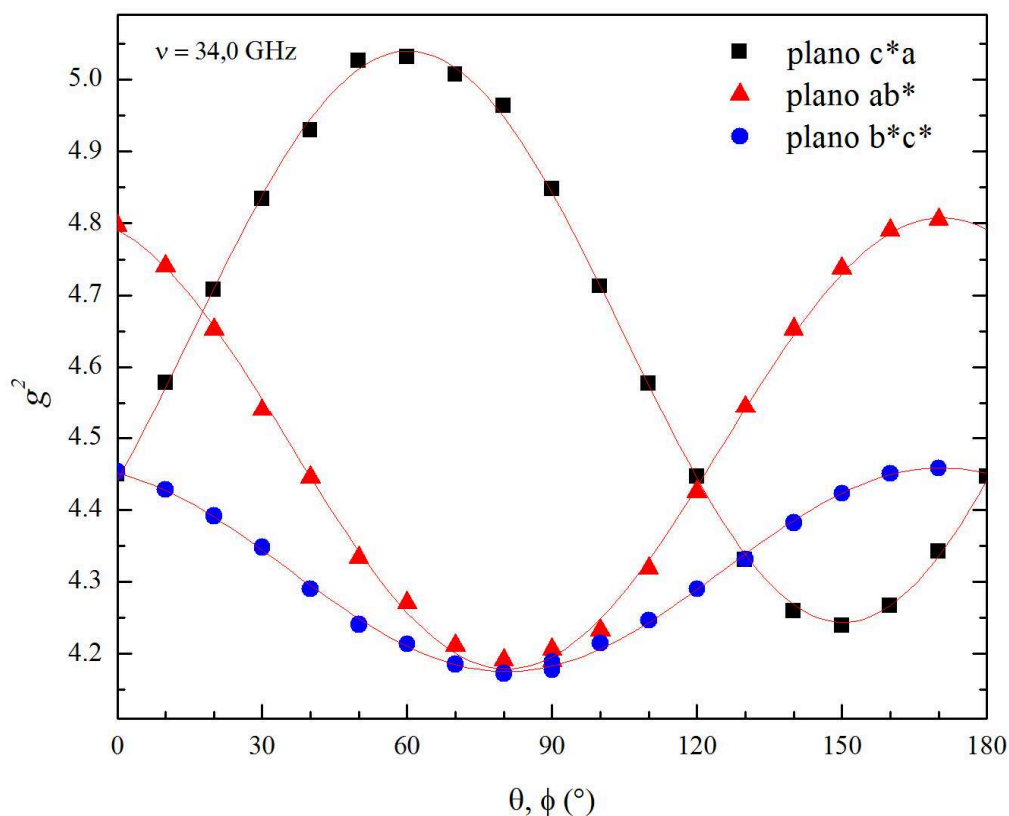
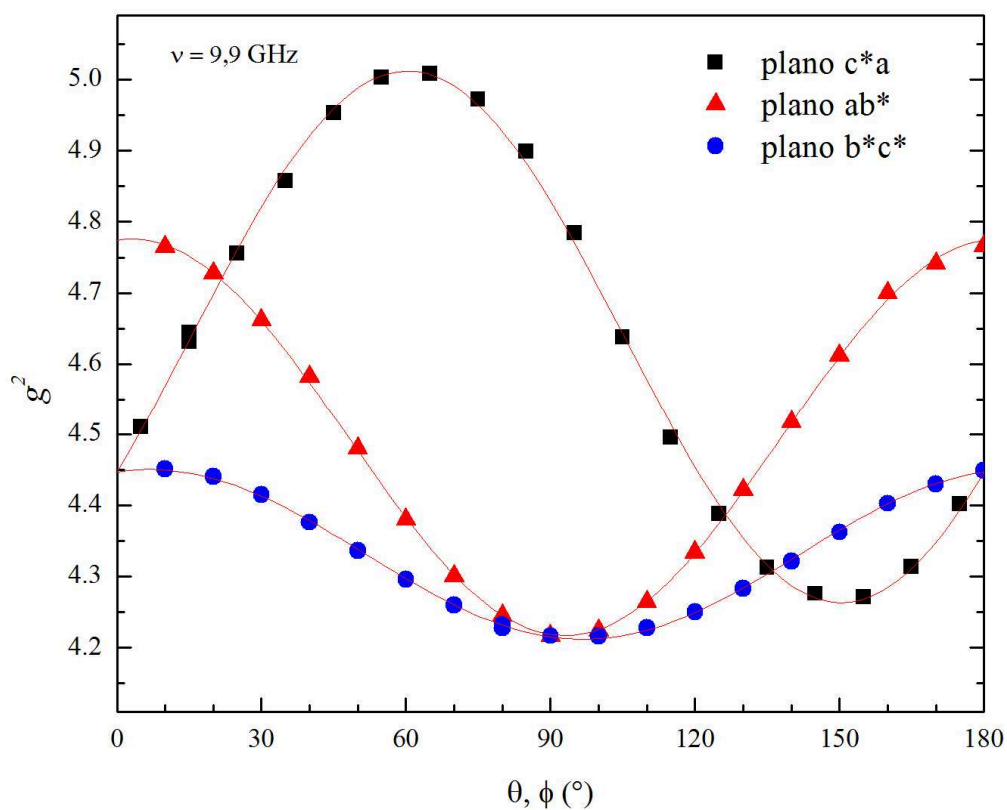
$$g^2(\theta, \varphi) = g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + g_{zz}^2 \cos^2 \theta + 2g_{xy}^2 \sin^2 \theta \cos \varphi \sin \varphi \quad (\text{V.1}) \\ + 2g_{zx}^2 \sin \theta \cos \varphi \cos \theta + 2g_{zy}^2 \sin \theta \sin \varphi \cos \theta$$

Las componentes del tensor  $g$  obtenidas para ambas bandas con sus eigenvalores y eigenvectores se presentan en la tabla V.4.

**Tabla V.4.** Valores de las componentes del tensor  $g^2$  obtenidas por análisis de cuadrados mínimos para ambas frecuencias de microondas.  $g_1, g_2, g_3$  y  $\mathbf{a}_1, \mathbf{a}_2, \mathbf{a}_3$  son los autovalores y autovectores de  $g^2$  en el sistema de coordenadas  $ab^*c$  respectivamente.

9.87 GHz		34.0 GHz	
$g_{xx}^2 = 4.802(4)$	$g_{xy}^2 = 0.029(5)$	$g_{xx}^2 = 4.817(4)$	$g_{xy}^2 = 0.101(5)$
$g_{yy}^2 = 4.212(4)$	$g_{zx}^2 = 0.322(5)$	$g_{yy}^2 = 4.186(4)$	$g_{zx}^2 = 0.344(5)$
$g_{zz}^2 = 4.451(4)$	$g_{zy}^2 = 0.028(5)$	$g_{zz}^2 = 4.449(4)$	$g_{zy}^2 = 0.046(5)$
$g_1 = 2.235(3)$		$g_1 = 2.244(3)$	
$g_2 = 2.052(2)$		$g_2 = 2.042(2)$	
$g_3 = 2.064(2)$		$g_3 = 2.060(3)$	
$\mathbf{a}_1 = [0.858(2), 0.050(6), 0.511(4)]$		$\mathbf{a}_1 = [0.852(2), 0.129(5), 0.508(3)]$	
$\mathbf{a}_2 = [0.045(4), 0.98(2), -0.17(7)]$		$\mathbf{a}_2 = [-0.20(3), 0.977(9), 0.081(5)]$	
$\mathbf{a}_3 = [-0.511(5), 0.17(8), 0.84(2)]$		$\mathbf{a}_3 = [-0.49(1), -0.17(6), 0.858(5)]$	





**Figura V.10.** Variación angular del factor  $g^2$  en banda X ( $\nu = 9,9$  GHz) y banda Q ( $\nu = 34,0$  GHz) en los 3 planos cristalinos ortogonales de Cu(glu)phen. Las líneas sólidas fueron obtenidas con los parámetros incluidos en la tabla V.4.



## V.2.9 Análisis magneto estructural

### V.2.9.1 Hamiltoniano de espín y Tensor *g* molecular del ión Cu (II)

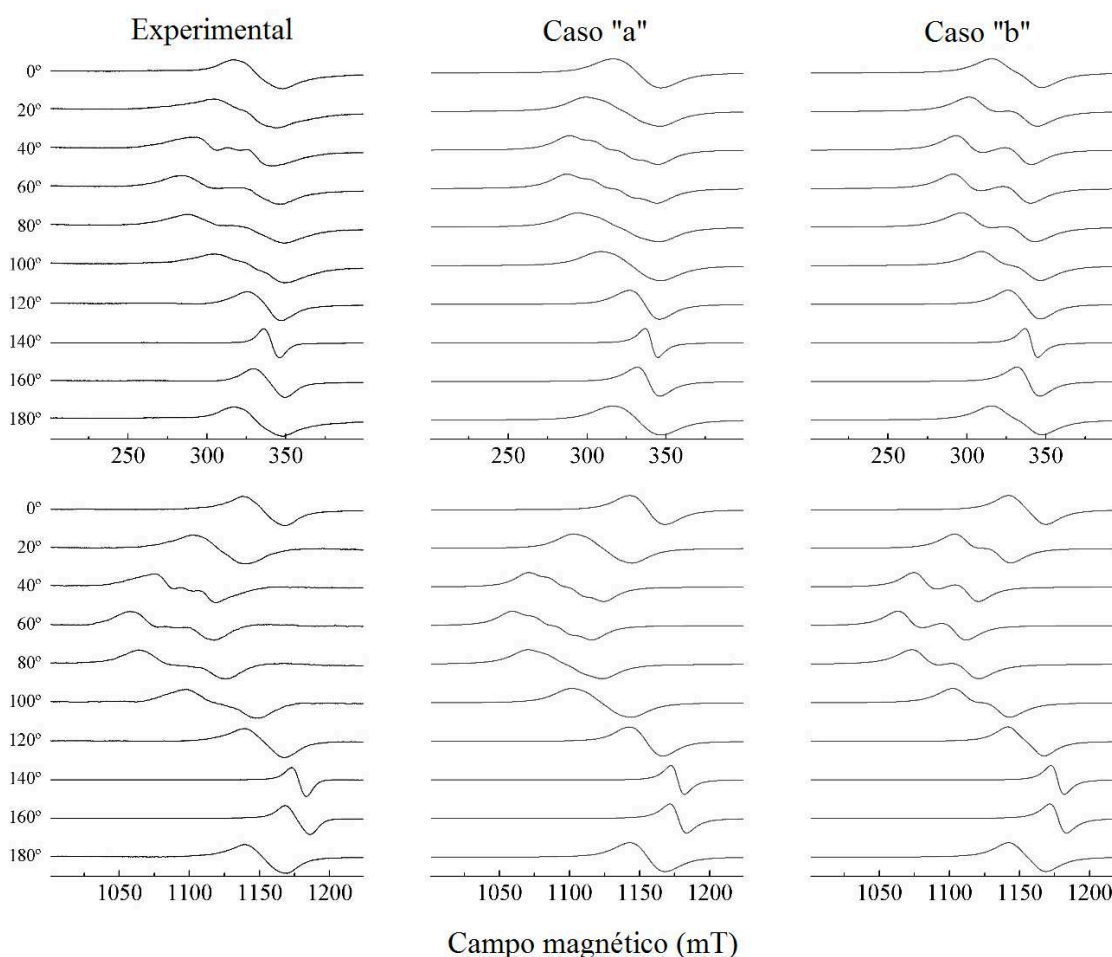
Cu(glu)phen es un sistema extendido con dos centros  $S = 1/2$ , por celda unidad cada uno con espín nuclear  $I = 3/2$ , acoplados por interacción de intercambio en el que los centros CuA y CuB pueden ser considerados magnéticamente equivalentes debido al pseudo centro de inversión que los relaciona. El Hamiltoniano de espín para este sistema es:

$$\hat{\mathcal{H}} = \beta(\mathbf{S}_A + \mathbf{S}_B) \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{S}_A \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}_A + \mathbf{S}_B \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}_B - J_{AB} \mathbf{S}_A \cdot \mathbf{S}_B - J_{AB'} \mathbf{S}_A \cdot \mathbf{S}_{B'} - J_{AB''} \mathbf{S}_A \cdot \mathbf{S}_{B''} \quad (\text{V.2})$$

donde  $\mathbf{g}$  es el tensor *g* molecular de los sitios de Cu,  $\mathbf{A}$  es el tensor hiperfino,  $J_{AB}$ ,  $J_{AB'}$  y  $J_{AB''}$  son los parámetros de intercambio isotrópico entre CuA y CuB de la misma celda, CuB' y CuB'' son sitios vecinos (figura V.6.A y B) mientras que los otros símbolos son los usuales en EPR. La suma sobre todas las celdas unitarias en la ecuación V.2 se omite por simplicidad.

El término Zeeman en la ecuación V.2, determina la posición central (centro de gravedad) de las líneas de resonancia superpuestas de ambos centros de cobre y los dos términos siguientes representan la interacción hiperfina debida al espín nuclear del ion Cu (II) ( $I = 3/2$ ). Los términos de intercambio producen la variación/fusión de todas las líneas espectrales hacia/en el centro de gravedad del espectro, dependiendo de la orientación del campo magnético. Como la interacción de intercambio conmuta con el término Zeeman, el centro de gravedad de los espectros en banda X y banda Q no se ve afectado por el intercambio (Brondino y col., 1993; Neuman y col, 2010). En contraste, la interacción de intercambio no conmuta con el término hiperfino, lo que produce el efecto de colapso de la estructura hiperfina. Tanto las interacciones de intercambio como la hiperfina no varían con la frecuencia de microondas, por lo que las posiciones de las líneas hiperfinas deberían ser independientes de la frecuencia de microondas, hecho que se observa experimentalmente. Las interacciones tales como dipolo-dipolo, y de intercambio anisotrópico se omiten en la ecuación V.2 debido a que éstas interacciones en ausencia de intercambio isotrópico contribuyen al ancho de línea principalmente sin modificar significativamente su posición.

En la figura V.11 se presentan en la columna de la izquierda espectros de EPR de monocristal obtenidos en el plano cristalino  $c^*a$  en banda X (panel superior) y banda Q (panel inferior) a temperatura ambiente. Los casos “a” y “b” son espectros simulados teniendo en cuenta los modelos “a” y “b” de Anderson de colapso de líneas por intercambio. Estos casos se discutirán más detalle.



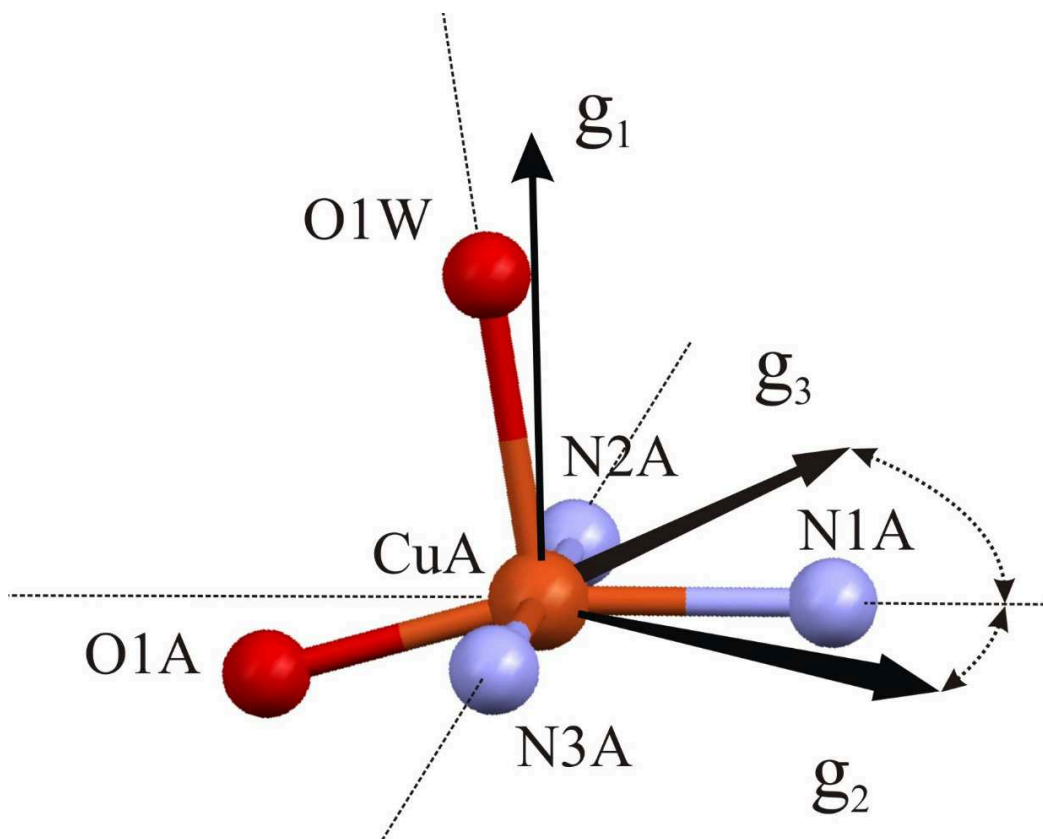
**Figura V.11.** Espectros experimentales de EPR de Cu(glu)phen en el plano cristalino  $c^*a$  (columna izquierda) junto con las simulaciones de los casos propuestos “a” y “b” (columna central y derecha, respectivamente). Los paneles superior e inferior corresponden a medidas en banda X y banda Q, respectivamente. Se indica la orientación del campo magnético en relación al sistema de ejes cristalinos  $ab^*c^*$ . Los parámetros del Hamiltoniano de espín para la simulación se tomaron del tensor  $\mathbf{g}$  dados en la tabla V.4 ( $A_{\parallel} = 182 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  y  $A_{\perp} = 19 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). Las frecuencias de intercambio ( $\omega_{ex} \approx J/\hbar$ ) fueron  $\hbar\omega_{ex} = 74 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  y  $370 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  para el caso “a” y “b”, respectivamente. Los anchos de línea fueron evaluados a partir del segundo momento de la interacción dipolar sumado a un ancho de línea intrínseco constante de 2 mT. Los tensores  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$  se asumieron coaxiales y se dedujeron desde la variación angular de los espectros experimentales.

Antes de analizar los espectros experimentales, se explicará como deberían verse los espectros en ausencia de intercambio o cuando esta interacción es muy débil. Si la interacción de intercambio es despreciable frente a todas las interacciones que producen

ensanchamiento (régimen de intercambio muy débil), en los espectros deberían observarse cuatro componentes hiperfinos con forma de línea gaussiana para todas las orientaciones del campo magnético. El grado de resolución de estas cuatro componentes está determinada por el valor del tensor hiperfino  $\mathbf{A}$  para cada orientación particular del campo magnético respecto a la muestra; cuando el valor de  $\mathbf{A}$  es mayor que el ancho de línea de cada línea hiperfina, las cuatro componentes están bien resueltas, siendo la resolución menor o no detectable para valores de  $\mathbf{A}$  del orden o menores, respectivamente, respecto de los anchos de línea. Estas situaciones, espectros con 4 componentes Gaussianas no fueron detectadas en los espectros experimentales, ya que una única línea de resonancia de forma Lorentziana, característica de intercambio fuerte, se observa en algunas orientaciones de campo magnético para ambas frecuencias de microondas (figura V.11, espectros a  $0^\circ$  y  $140^\circ$ ), o espectros con estructura hiperfina parcialmente resuelta, típica de intercambio débil que no pudieron ser simuladas como la suma de cuatro líneas Gaussianas (figura V.11, espectros en el rango de  $20^\circ$  a  $120^\circ$ ). Se debe considerar que este intervalo corresponde a una región en torno a  $g_{\parallel}$  lo que indica que el tensor  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$  son coaxiales como se espera para los centros de cobre (II) en coordinación cuadrado planar. Espectros con características similares se observaron en los planos  $ab^*$  y  $c^*b^*$ .

El hecho de que no se detectaron diferencias significativas entre los espectros de Cu(glu)phen en ambas bandas (figura V.11) indica que los sitios CuA y CuB muestran los mismos valores de  $\mathbf{g}$  y  $\mathbf{A}$ , lo cual está de acuerdo con el pseudo centro de inversión que relaciona a ambos centros (figura V.5). Esto implica que los centros cristalográficamente independientes CuA y CuB son indistinguibles por EPR en estas condiciones experimentales, y por lo tanto, los parámetros del tensor  $\mathbf{g}$  dados en la tabla V.4 corresponden a los del tensor molecular. El análisis de los mismos permite concluir que la dirección  $g_1$  ( $a_1$ ) coincide aproximadamente con la normal ( $n$ ) al plano de los ligandos de cobre ecuatoriales ( $a_1-n_A = 3.15^\circ$  para CuA,  $a_1-n_B = 5.19^\circ$  para CuB) mientras que las direcciones de  $g_2$  y  $g_3$  están ubicadas aproximadamente entre los enlaces ecuatoriales (figura V.12). La relación entre los valores de  $\mathbf{g}$  ( $g_1 > g_2 \approx g_3$ ) indica que la principal contribución al estado fundamental magnético está dada por el orbital d ( $x^2 - y^2$ ), típico de un sitio de cobre en coordinación piramidal aproximadamente cuadrada. La anisotropía de  $g_{\perp}$  junto con el hecho de que las direcciones  $g_2$  y  $g_3$  no están a lo largo de los enlaces ( $a_2-Cu, n_{1A} = 25.4^\circ$ ,  $a_3-Cu, n_{1A} = 67.3^\circ$ ) (figura V.12) como se esperaba por razones de simetría para un ion Cu (II) en un ambiente planar cuadrado  $\sim ON_3$ , indica

que la componente de campo-ligando que actúa a lo largo de las direcciones orbitales en estado fundamental disminuye la simetría produciendo una pequeña mezcla de principalmente el orbital  $d(3z^2 - r^2)$ , y en una menor medida de los orbitales  $d(xy)$ ,  $d(xz)$ , y  $d(yz)$  en el estado fundamental (Hitchman y col., 1987).



**Figura V.12.** Ejes principales (flechas negras) del tensor  $g$  en banda X para el sitio CuA. Orientación similar se obtuvo de los datos de banda Q. La línea de puntos a lo largo de los enlaces es para facilitar la visualización.

### V.2.9.2 Frecuencia de intercambio y su influencia en la estructura hiperfina

Dentro de la teoría de respuesta lineal, el espectro de absorción en el dominio de frecuencias observada en experimentos CW-EPR se puede calcular mediante (Abragam, 1961; Bencini y Gatteschi, 1990):

$$I(\omega) \propto \frac{\chi''}{\omega} = \frac{V}{2kT} \int_{-\infty}^{\infty} \langle M_{h_1}(t) M_{h_1} \rangle e^{-i\omega t} dt = \frac{V}{2kT} \langle M_{h_1} M_{h_1} \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \varphi(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{V.3})$$

donde  $\chi''$  es la parte imaginaria de la susceptibilidad dinámica,  $\omega = g \mu_B B / \hbar$  es la frecuencia de microondas,  $V$  es el volumen de la muestra,  $k$  es la constante de

Boltzmann y  $T$  es la temperatura absoluta.  $M_{hl}$  es la componente del operador de magnetización a lo largo de la dirección del campo magnético de microondas  $h_l$ , perpendicular al campo magnético estático aplicado  $\mathbf{B}$  y  $M_{hl}(t)$  es la dependencia temporal de  $M_{hl}$ .  $\varphi(t)$  se denomina función de relajación, e indica un promedio térmico calculado sobre el sistema de espines. La ecuación V.3 relaciona el espectro de absorción observada en experimentos de EPR con la transformada de Fourier de  $\varphi(t)$ .

Como se mencionó anteriormente, en ausencia de las interacciones de intercambio, el espectro de EPR de una red extendida compuesta por iones Cu (II) equivalentes magnéticamente, debe consistir en cuatro líneas de resonancia iguales con posiciones  $\omega_i + m_l A / \hbar$  en unidades de frecuencia, donde  $m_l = 3/2, 1/2, -1/2$  y  $-3/2$ , y ancho de línea  $\Gamma_i$ . Según el modelo de Anderson, en presencia de una única interacción de intercambio isotrópica  $J$  entre los centros de cobre de la red, la función de relajación se convierte en (Anderson y Weiss, 1953; Calvo, 2007):

$$\varphi(t) = \mathbf{W} \cdot \exp\left\{ \left[ i(\boldsymbol{\omega} + i\boldsymbol{\Gamma}) + \boldsymbol{\pi} \right] t \right\} \cdot \mathbf{1} \quad (\text{V.4})$$

donde las componentes del vector  $\mathbf{W}$  son proporcionales a las probabilidades de ocupación de los diferentes estados del sistema,  $\mathbf{1}$  es un vector con componentes iguales a uno,  $\boldsymbol{\omega}$  y  $\boldsymbol{\Gamma}$  son matrices diagonales cuyos elementos son  $\omega_i$  y  $\Gamma_i$ , que corresponden a la frecuencia de absorción y al ancho de línea en ausencia de intercambio, respectivamente;  $\boldsymbol{\pi}$  es una matriz cuyos elementos dan las probabilidades de transición, que son proporcionales a  $\omega_{ex}$ , entre las líneas de resonancia ( $\omega_{ex} \approx J / \hbar$ ).

La transformada de Fourier de la ecuación V.3 puede obtenerse partir de una metodología propuesta por Sack (Sack, 1958), quien demostró que  $I(\omega)$  está dada por:

$$I(\omega) = \text{Re} \left\{ \mathbf{W} \cdot \left[ i(\boldsymbol{\omega} - \omega \mathbf{E} + i\boldsymbol{\Gamma}) + \boldsymbol{\pi} \right]^{-1} \cdot \mathbf{1} \right\} \quad (\text{V.5})$$

donde  $\mathbf{E}$  es la matriz unidad. La solución de esta ecuación puede ser calculada analíticamente para los casos de dos espines  $S = 1/2$  diferentes interactuantes (Brondino y col., 1995) y para sistemas diméricos acoplados por interacciones de intercambio interdiméricas (Neuman y col, 2010) siendo  $\boldsymbol{\pi}$  una matriz de  $2 \times 2$  con elementos de la diagonal y fuera de la diagonal  $-\omega_{ex}$  y  $\omega_{ex}$ , respectivamente. Sin embargo, en el caso en

estudio,  $\pi$  es una matriz  $4 \times 4$  (4 líneas hiperfinas) que tiene dos construcciones extremas posibles, como se describe en el capítulo III. El caso "a" considera iguales probabilidades de transición entre las cuatro líneas ( $-\omega_{ex}$  y  $\omega_{ex}/3$  son los elementos de la diagonal y fuera de la diagonal de la matriz, respectivamente); mientras que en el caso "b" sólo transiciones entre líneas adyacentes están permitidas (los elementos de matriz fuera de la diagonal adyacentes a las diagonales son  $\omega_{ex}/2$  y cero en caso contrario;  $-\omega_{ex}/2$  y  $-\omega_{ex}$  son los elementos de matriz diagonales exterior e interior, respectivamente). Un enfoque alternativo para analizar el fenómeno de angostamiento proviene de la diagonalización de la matriz en la ecuación V.4, donde la parte imaginaria de los valores propios de la matriz da la posición de la línea y la parte real, el ancho de línea. Este procedimiento brinda una manera de dividir el espectro en componentes y puede ser útil para obtener una estimación de  $\omega_{ex}$  (Strother y col., 1971; Brondino y col., 1997; Rizzi y col., 2003b) pero no predice la forma de línea del espectro, que puede obtenerse únicamente a partir de la ecuación V.5.

Para el caso de un sistema con centros con espines  $S = 1/2$  acoplados a un núcleo con  $I \geq 1$ , es más simple resolver la ecuación V.5 numéricamente. Las simulaciones de los espectros con del Cu(glu)phen con este procedimiento en unidades de campo magnético utilizando la posición de las líneas de resonancia predichas por el tensor  $\mathbf{g}$  del ion Cu (II) (figura V.10, tabla V.4 ) se muestran en la figura V.11 para los casos "a" y "b". Como se muestra en esta figura, las simulaciones reproducen en forma semejante la variación angular de los espectros para ambos casos, aunque muestran algunas discrepancias ligeras para algunas orientaciones magnéticas de campo en la región de intercambio débil (figura V.11, espectros entre  $40^\circ$  y  $100^\circ$ ). Estas diferencias pueden ser atribuidas a la hipótesis de que tanto la separación como el ancho de línea de los cuatro componentes hiperfinos son iguales, pero puede ocurrir que haya formas de líneas  $m_i$  dependientes y aparecen las distorsiones más alejadas en el cuarteto hiperfino que en el cobre sin acomplejar (Weil y col., 1995).

Una inspección cualitativa de los espectros simulados para el caso "a" muestra que las cuatro líneas se desplazan de manera uniforme hacia el centro de gravedad a medida que los espectros se acercan a la condición de colapso. En contraste, para el caso "b", la variación angular espectral parece indicar que las dos resonancias centrales colapsan en primer lugar y las del exterior después. Es evidente que una comparación entre los espectros experimentales y simulados no permite discernir entre cualquiera de

estas dos posibilidades, ya que las principales características de los espectros pueden ser reproducidos razonablemente en ambos esquemas. Sin embargo, es importante tener en cuenta la diferencia en orden de magnitud necesaria para producir la fusión de la estructura hiperfina. Mientras que para el caso "a" la frecuencia de intercambio ( $\hbar\omega_{ex} = 74 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) que reproduce el espectro es aproximadamente del orden de la separación de línea media hiperfina (de  $A_{iso} = 73 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ), se necesita una frecuencia de intercambio 5 veces mayor en el caso "b" ( $\hbar\omega_{ex} = 370 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ). Este último valor es mucho más alto que los esperados para los sistemas que tienen interacciones  $\pi$ - $\pi$  como caminos químicos (Brondino y col, 1997; Neuman y col, 2010; Voronkova y col, 2005; Venegas-Yazigi y col, 2011). Por lo tanto, la simulación espectral asumiendo el caso "b", predice condiciones de colapso irreales a pesar del hecho de que se puede dar una explicación cualitativa del estrechamiento del fenómeno intercambio (Neuman y col., 2012).

### V.2.9.3 Interacción de intercambio y caminos de superintercambio

La interacción de intercambio en Cu(glu)phen se puede atribuir a los caminos químicos presentados en la figura V.6. Sobre la base de los datos estructurales, dos posibles comportamientos magnéticos se pueden especular. Uno de ellos es que la constante de intercambio que relaciona los iones CuA y CuB de la misma celda unidad ( $J_{AB}$ ) puede ser dominante (figura V.6.A), en cuyo caso el comportamiento EPR debe corresponder principalmente a la de un sistema dimérico. Por el contrario, si el apilamiento  $\pi$ - $\pi$  aromático fuera el camino de superintercambio dominante ( $J_{AB'}$  y  $J_{AB''}$ ), los espectros deberían mostrar las características asociadas con el comportamiento magnético 1D. Como ninguno de estos comportamientos se observaron y los anchos de línea podrían ser ajustados razonablemente usando el segundo momento de la interacción dipolar, se concluye que la CuA-O<sub>ap</sub>H ... O-C-O<sub>eq</sub>-CuB y el camino químico de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  aromático presentan valores de  $J$  del mismo orden de magnitud. Esto está en consonancia con los resultados obtenidos en el complejo de cobre con ácido aspártico y biperidina (Brondino y col., 1995). Dado que cada ión de cobre de la red está vinculado a tres vecinos (figura V.6.B), la relación entre la frecuencia de intercambio y las constantes de acoplamiento de intercambio puede asumirse que es  $\omega_{ex} \approx 3 J/\hbar$ , lo que determina  $|J| \approx 25 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ .

## V.3 Fase gas: Ligandos de Iones Metálicos

### V.3.1 Ligandos caracterizados

Una biomolécula de bajo peso molecular puede ser caracterizada en fase gas, libre de interacciones con el medio o el solvente, ya que en condiciones normales de fase condensada (líquida o sólida) se encuentra en solución (solvatada) o sometida a la influencia de moléculas vecinas. Debido a la importancia que desempeñan en ciclos vitales y sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, se estudiaron dos moléculas que responden a las características de ligandos de iones metálicos (Cotton y Wilkinson., 1988; Miessler y col., 2013). Los ácidos orgánicos y los compuestos aromáticos son biomoléculas de elección para el diseño de sistemas biomiméticos por lo que en el presente trabajo de tesis se caracterizaron dos moléculas que presentan en su estructura un anillo piridina: ácido picolínico y nicotinamida (figura V.13) con el fin de analizar sus conformaciones en ausencia de interacciones  $\pi$ - $\pi$  o enlaces puente hidrógeno.

Varias moléculas relacionadas estructuralmente presentan un anillo piridina. El ácido picolínico (ácido piridin-2-carboxílico) y el ácido isonicotínico (ácido piridin-4-carboxílico) son dos moléculas aromáticas de 6 miembros, isómeros del ácido nicotínico (ácido piridin-3-carboxílico) cuyos conformeros han sido caracterizados en fase gas (Mata y col, 2012).

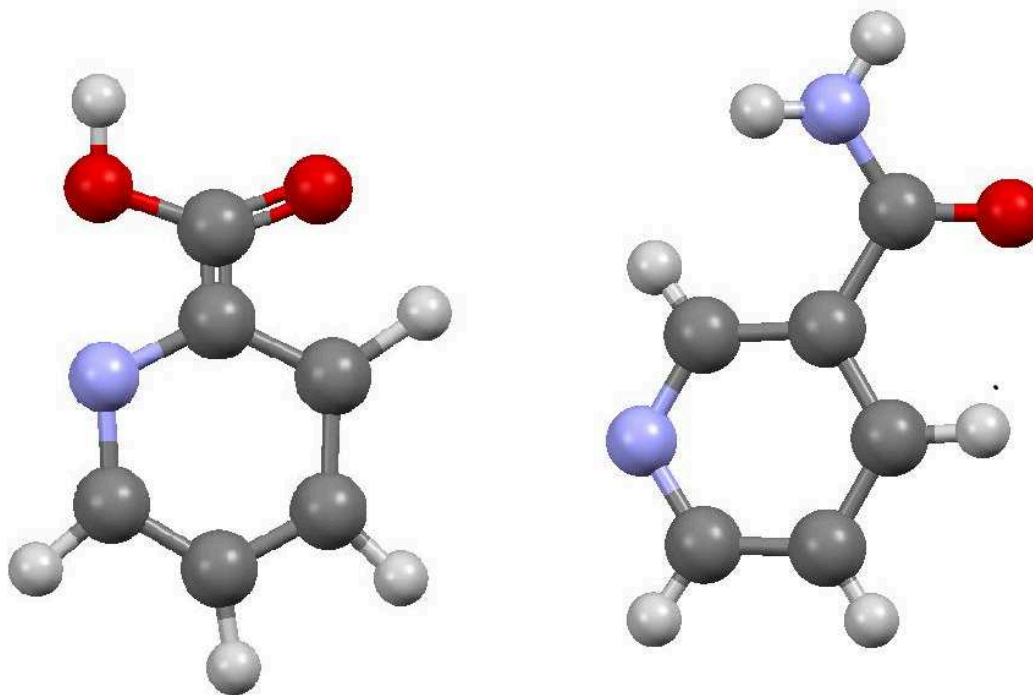
El ácido picolínico ofrece la posibilidad estructural de la formación de enlaces puente hidrógeno y actúa como ligando de metales de transición. Se han demostrado diversos modos de coordinación del ácido picolínico siendo los responsables de la facilidad de formación de metalocomplejos en sistemas biológicos. Estas posibilidades de coordinación se relacionan con la alta actividad biológica de derivados del ácido picolínico (Aliev y col., 1988).

En condiciones fisiológicas, el ácido picolínico es un metabolito producto de la degradación de triptófano por la vía de las kinureninas. Actúa como ligando de Zn (II) en condiciones fisiológicas y se encuentra involucrado en el transporte del catión en las neuronas. Las variaciones de concentración del ligando en el organismo provoca desequilibrios a nivel neurológico (Grant y col., 2009).

La nicotinamida y sus derivados son ligandos que forman enlaces puente hidrógeno que conectan las moléculas en una estructura 2D. Los dos patrones conocidos



son observados en complejos con éstas amidas, uno ligando interacciones amida - amida y el otro formando uniones N- H $\cdots$  O. El simple cambio de los sustituyentes en los ligandos quelantes tienen un profundo efecto electrónico sobre la geometría de iones metálicos, que altera tanto la estructura molecular y supramolecular de una manera predecible (Germán-Acacio y col., 2009).



**Figura V.13.** Estructura del ácido picolínico a la izquierda y de la nicotinamida a la derecha. Los átomos se representan en diferentes colores: lila, N; rojo, O; gris, C y blanco, H. La presencia del grupo carboxilato en el ácido picolínico, posibilita la formación de enlaces puente hidrógeno al igual que en la nicotinamida con el grupo amida. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

La nicotinamida o niacinamida es la amida del ácido nicotínico o niacina, la mezcla de ambos es lo que se conoce como vitamina B<sub>3</sub>. La nicotinamida es fundamental para la formación de cofactores (NAD y FAD) de enzimas redox que intervienen en procesos metabólicos de intercambio de electrones. Se puede generar en el organismo como un producto del metabolismo del triptófano pero es muy bajo el rendimiento (Nelson y Cox, 2001). La vitamina B<sub>3</sub> es hidrosoluble por lo que su comportamiento en solución a pH ácido (Jellinek y Gordon, 1949) con sus correspondientes constantes de disociación y mecanismos de reacción ha sido estudiado desde mediados de siglo pasado (Jellinek y Wayne, 1951).

Las moléculas estudiadas están formadas por menos de 20 átomos, por lo que es posible su caracterización por espectroscopia de rotación de alta resolución.

### V.3.2 Estrategia general de caracterización

Como se detallara en el capítulo III, la espectroscopia de rotación acoplada con métodos auxiliares permite la caracterización de moléculas en fase gas. Para la interpretación y análisis de los espectros de rotación, así como para la identificación de todos los posibles conforméromos estables que presentan las biomoléculas, se ha seguido la sistemática descrita en el diagrama de bloques de la figura V.14. Ésta se ejecuta en paralelo a lo largo de las líneas de flujo etiquetadas como a y b. En el inicio de la investigación es necesario un conocimiento previo de todas las posibles configuraciones estables que una molécula pudiera presentar en fase gas. Para sistemas sencillos basta a veces con la propia intuición química para realizar una propuesta inicial de posibles conforméromos, pero en general, no es suficiente. En sistemas más complejos, las diversas interacciones intramoleculares y las posibilidades de rotación que tienen lugar en ciertos enlaces pueden generar un número elevado de conforméromos, por lo que se hace necesaria una búsqueda sistemática de posibles configuraciones estables con la ayuda de cálculos teóricos.

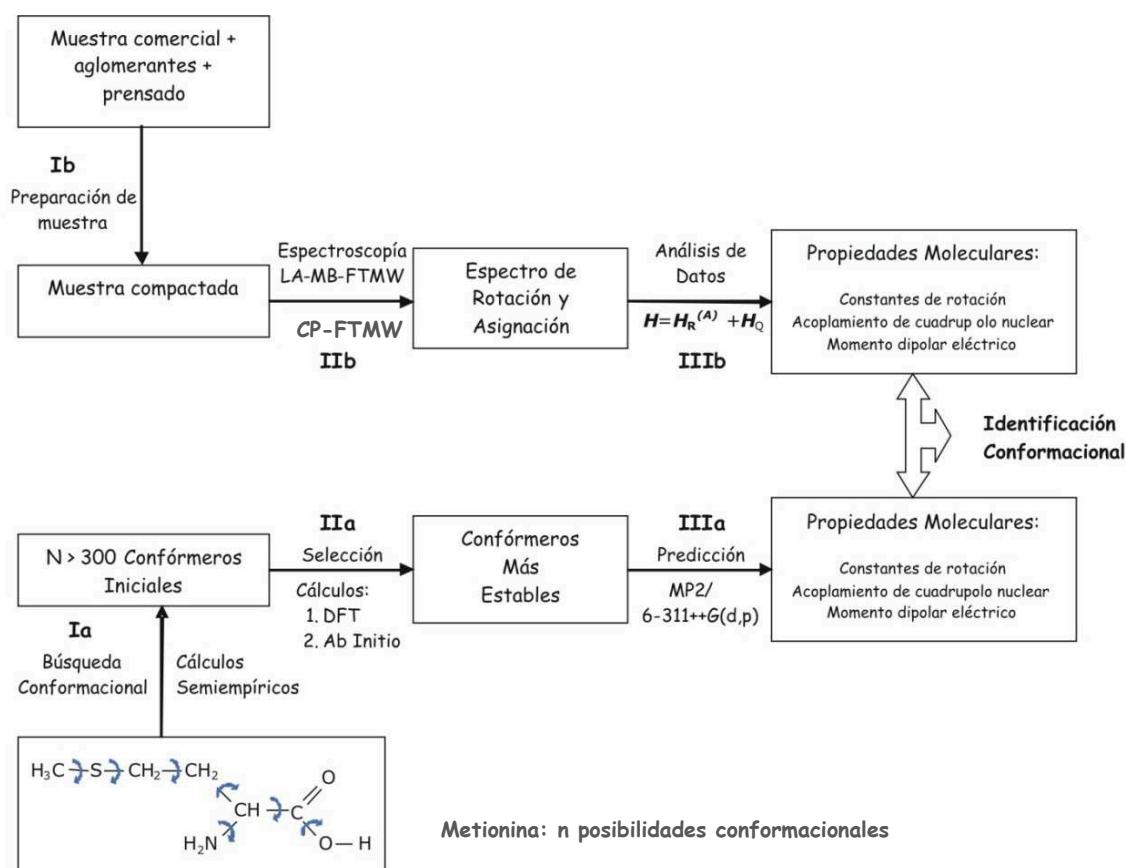


Figura V.14. Estrategia general de trabajo para la determinación de estructuras en fase gas de moléculas.

### V.3.2.1 Cálculos teóricos y predicciones

La etapa I.a, corresponde a la búsqueda conformacional exhaustiva. Se inicia con una representación de la molécula de interés donde se identifican los posibles enlaces que darán lugar a torsiones que generarán toda la variedad conformacional. Las configuraciones de inicio se seleccionan considerando todos los mínimos de energía que surgen en las rotaciones en torno a todos los enlaces. En esta primera etapa se utilizan metodologías de bajo consumo de recursos computacionales. Se utilizan fundamentalmente métodos semiempíricos (Dewar, 1985; Stewart, 1989) y de mecánica molecular (Cornell y col., 1995).

En la etapa II.a, estos conformeros estables se someten a cálculos de mayor nivel utilizando el método del funcional densidad. Se probaron diversos métodos de cálculo, siendo el más eficiente B3LYP con la base 6-31G(d,p). Considerando que los conformeros más altos en energía no estarán suficientemente poblados para ser detectados en la expansión supersónica, se focaliza la atención únicamente en los conformeros predichos como más estables. En general, se consideran aquellos conformeros cuya diferencia de energía con respecto al más estable sea del orden de  $1500\text{ cm}^{-1}$ . Éstos se someten a un cálculo *ab initio* utilizando el método perturbativo Moller-Plesset de segundo orden (MP2) (Moller y Plesset, 1934) con la base estándar de Pople (6-311++G (d,p)) (Krishnan y Pople, 1978) que incluye funciones difusas y de polarización.

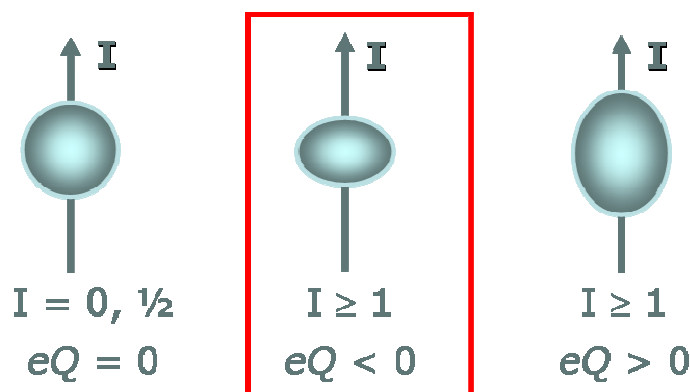
En esta etapa se procede igualmente a la selección de los conformeros más estables susceptibles de observación experimental. Para ello, no solamente hay que tener en cuenta las energías electrónicas, sino igualmente sus energías de Gibbs calculadas al mismo nivel (MP2/6-311++G (d,p)) con el fin de predecir correctamente las poblaciones relativas de los conformeros. El cálculo de las energías de Gibbs es especialmente necesario por la coexistencia de conformeros plegados y extendidos. Las interacciones intramoleculares (puentes de hidrógeno) contribuyen a estabilizar conformeros plegados con menor entropía. Ello tiene como consecuencia, un aumento de la energía de Gibbs en estos conformeros, respecto de los extendidos, y una disminución de su población relativa (Blanco y col., 2010). Siguiendo estos criterios energéticos y entrópicos, se seleccionan finalmente aquellos conformeros cuya energía sea del orden de  $1100\text{ cm}^{-1}$  sobre el valor cero atribuido al conformero con mínimo global.

En la etapa III.a, sobre las geometrías optimizadas (*ab initio*, MP2/6-311++G (d, p)), se predicen las propiedades moleculares más relevantes para la asignación e interpretación de sus espectros de rotación. Éstas son las constantes de rotación ( $A$ ,  $B$  y  $C$ ), las constantes de acoplamiento de cuadrupolo nuclear ( $\chi_{ii}$ ) y las componentes de los momentos dipolares eléctricos ( $\mathbf{p}_i$ ). Estos resultados se comparan en tablas donde se aprecian las diferencias entre los distintos conformeros.

Los valores de las constantes de rotación  $A$ ,  $B$  y  $C$  (que son inversamente proporcionales a los momentos de inercia) proporcionan información de la distribución de las masas en las moléculas y con ello, la estructura molecular. El análisis de las constantes de rotación normalmente es concluyente para la identificación de los conformeros. Los conformeros de las biomoléculas bajo estudio son rotores asimétricos ( $A > B > C$ ). Su grado de asimetría se evalúa con el parámetro de asimetría de Ray, definido como  $\kappa = (2B - A - C)/(A - C)$  y cuyo valor puede oscilar entre 1 y -1, valores que corresponden a los casos límite de trompos simétricos oblate y prolate, respectivamente. Una primera valoración de la simetría de los conformeros observados (valores de  $\kappa$ ) permite siempre dictaminar su naturaleza plegada o extendida (Gordy y Cook, 1984). La comparación de las constantes rotacionales teóricas y experimentales posibilita en la mayoría de los casos la identificación de los conformeros observados.

En algunas ocasiones, en conformeros con la misma configuración del esqueleto molecular, los valores de las constantes de rotación no son suficientes para discriminar entre ellos. En estos casos, la identificación de los conformeros se realiza en base al análisis de la estructura hiperfina de los espectros originada por los núcleos de  $^{14}\text{N}$  presentes en las biomoléculas. La aparición de esta estructura hiperfina de cuadrupolo nuclear (Gordy y Cook, 1984) en el espectro de rotación se produce cuando la molécula posee algún núcleo con una distribución no esférica de su carga nuclear, tal como se presenta en la figura V.15 (ocurre en todos aquellos núcleos con spin nuclear  $I > 1/2$ ,  $I = 1$  para  $^{14}\text{N}$ ). La distribución no esférica de carga nuclear implica la existencia de un momento de cuadrupolo nuclear ( $eQ$ ) que interacciona con el gradiente de campo eléctrico generado por el resto de las cargas de la molécula en dicho átomo. Esto se traduce en un acoplamiento entre el momento de spin del núcleo ( $I$ ) y el momento angular de rotación de la molécula ( $L$ ) y del que se da cuenta mediante el número cuántico  $F = I+L$ . Como consecuencia, se origina un desdoblamiento de las transiciones

de rotación, es decir una estructura hiperfina cuyas componentes pueden resolverse gracias a la alta resolución de la técnica empleada.



**Figura V.15.** Diferentes distribuciones de carga nuclear. El rectángulo con línea continua roja ejemplifica la distribución no esférica de carga del núcleo de  $^{14}\text{N}$ .

Del análisis de la estructura hiperfina pueden determinarse las constantes de acoplamiento de cuadrupolo nuclear  $\chi_{ii}$  ( $i = a, b, c$ ) cuyos valores están relacionados con el gradiente de campo eléctrico ( $q_{ii}$ ) en el núcleo cuadrupolar ( $\chi_{ii} = eQ \cdot q_{ii}$ ) y por lo tanto, con el entorno electrónico del  $^{14}\text{N}$ . La comparación entre las constantes de cuadrupolo experimentales y las teóricas constituye una herramienta única para identificar el conformero observado. Además, hace posible determinar y concluir en muchos casos, sobre la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.

El momento dipolar eléctrico es la tercera propiedad molecular a considerar en el análisis conformacional. Las diferentes orientaciones de los grupos funcionales en los conformeros producen cambios en la distribución de carga eléctrica, que se reflejan en los diferentes valores de las componentes de momento dipolar  $p_i$  ( $i = a, b, c$ ) en los ejes principales de inercia.

Las reglas de selección (espectros de tipo  $a$ ,  $b$  o  $c$ ) (Hollas, 2004) y la intensidad de las transiciones de rotación dependen de la magnitud de estas componentes de momento dipolar. De esta forma, para que una molécula tenga espectro de rotación de tipo  $a$ , es condición necesaria que  $p_a$  tenga un valor no nulo; lo mismo ocurre con los espectros de tipo  $b$  y  $c$ . Los valores de las componentes del momento dipolar también se pueden utilizar para discriminar entre conformeros.

La potencia de microondas necesaria para una óptima polarización de una transición de rotación depende entre otros factores, del valor de la correspondiente componente ( $p_a$ ,  $p_b$  o  $p_c$ ). Así, es posible constatar si la potencia de microondas

requerida para la polarización óptima es o no consistente con las predicciones del momento dipolar eléctrico de cada confórmero. Aunque por sí mismo, el momento dipolar no se puede considerar una herramienta concluyente en muchos casos, puede corroborar la identificación conformacional realizada con las anteriores propiedades moleculares.

El procedimiento de cálculo consiste en una primera aproximación para la cual se utiliza el programa *Molden* donde se dibuja la molécula de interés. Los parámetros que proporciona el modelo inicial son distancias y ángulos de enlace. Nuestro modo natural de ver la estructura consiste en describirla con las coordenadas de valencia: distancias, ángulos de enlace y ángulos de torsión. En Química, la matriz *Z* es una forma de representar la estructura molecular mediante un sistema de coordenadas internas. Proporciona una descripción de cada átomo en términos de su número atómico, una distancia, un ángulo y un ángulo diedro con respecto a otros átomos o puntos de referencia. Es conveniente que los puntos de referencia sean átomos y que las distancias y ángulos usados describan los enlaces. El nombre se debe a que la matriz *Z* sitúa el segundo átomo a lo largo del eje *Z* tomando al primer átomo como origen. Una matriz *Z*, puede convertirse fácilmente a coordenadas cartesianas y viceversa, puesto que la información que contienen es idéntica. Mientras que la transformación es conceptualmente directa, los algoritmos para hacer la conversión pueden variar en cuanto a velocidad y precisión. Esto es importante para moléculas con muchos átomos como las biológicas.

Las matrices *Z* se usan para crear geometrías de sistemas moleculares como entrada en muchos programas de modelado molecular y Química Computacional. Una elección acertada de las coordenadas internas puede facilitar la optimización de geometrías y la interpretación de los resultados. Por otra parte permite incorporar condicionamientos de simetría fácilmente. Un caso aparte son las moléculas cíclicas que hay que tratar de forma especial.

El programa CART (Pickett, 1991) permite el cálculo de los momentos de inercia y otras propiedades moleculares relevantes en espectroscopia de rotación. Se basa en el uso de una matriz *Z* de entrada de datos geométricos de la que posteriormente se calculan las coordenadas cartesianas de los átomos y el centro de masas (cdm). A partir del sistema centrado en el cdm se calculan los momentos y ejes principales de inercia. La matriz *Z* obtenida de la optimización del cálculo para cada confórmero en términos electrónicos se utiliza en el programa de *Pickett* con la rutina SPCAT donde se

consideran los momentos de inercia y se calculan los parámetros característicos de la molécula en términos de su centro de masas.

Con la información anterior, se elabora un archivo de entrada que se procesa con el programa *Gaussian 3.0*, en el centro de cálculo. Éste realiza una optimización de las coordenadas atómicas y las componentes del momento dipolar, de mínimos de energía basándose en la distribución electrónica de la molécula.

Los parámetros optimizados se colocan en un archivo de entrada para el programa *CART* (Pickett, 1991) y mediante la rutina SPCAT se obtiene información de la molécula considerando el centro de masa: constantes de rotación y constantes de acoplamiento cuadrupolar.

Con las constantes de rotación y las de cuadrupolo, además de cada componente del momento dipolar se realiza la predicción con la rutina SPCAT de las líneas de transición posibles en el rango de las microondas.

En espectroscopia de rotación de alta resolución, el uso de herramientas de cálculo es fundamental para orientar el trabajo experimental.

### **V.3.2.2 Desarrollo Experimental**

La tarea experimental se inicia para las muestras sólidas en la etapa I.b con la preparación de la muestra. Se parte de aproximadamente 0,7 g del sólido comercial y se pulveriza con un mortero de ágata (figura V.16.a) hasta conseguir un polvo fino. Posteriormente, se mezcla con un aglomerante comercial para formar una barra uniforme.

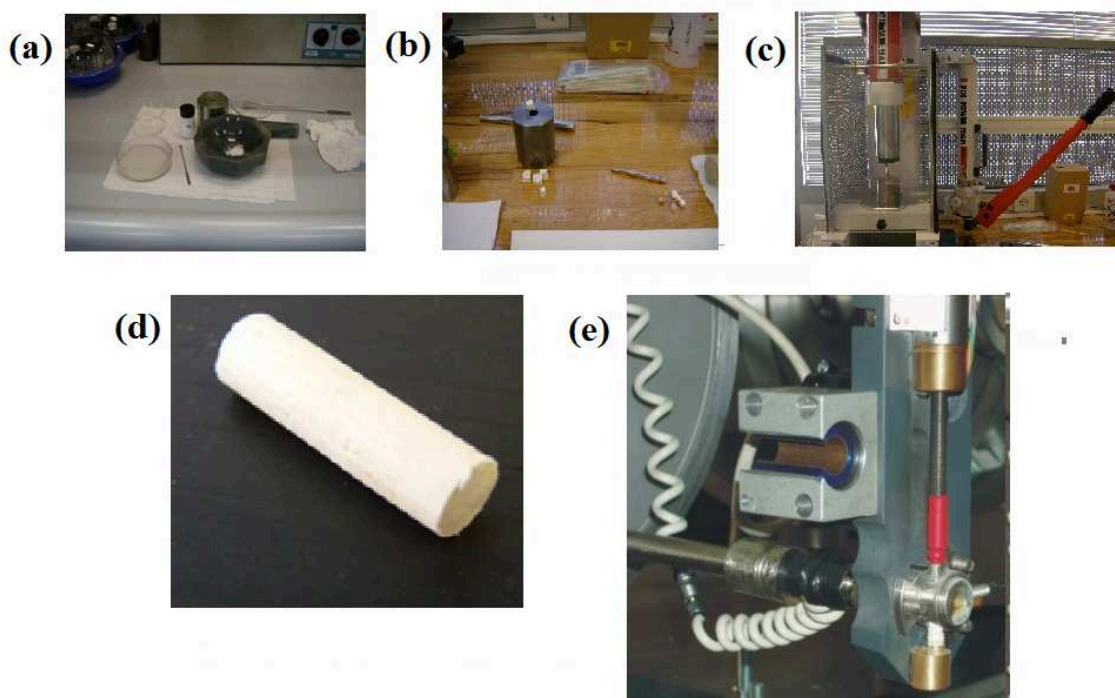
Los aglomerantes a utilizar son diferentes dependiendo del tipo de muestra. En general se trata de aditivos para pinturas que unen los componentes necesarios en una formulación sintética. Su función es evitar que el pigmento se desprenda y acelerar el proceso de secado. Se utilizan en general: POVAL® PVA 220, ACRISIL 201/O.N y Primal AC™35.

POVAL® PVA 220b (elaborado por *Kuraray America Inc.*) es un alcohol polivinílico completamente hidrolizado usado para la modificación de los adhesivos de emulsión y en la producción de adhesivos de papel y de adhesivos rehumedecibles. También se utiliza como coloide protector en la polimerización de emulsiones, como un aglutinante en el acabado de superficies de papel y como un regulador en el procesamiento de revestimientos.

ACRISIL 201/O.N (elaborado por *CTS S.R.L.*) es una resina acril-silicónica de efecto consolidante-hidrorepelente compuesta por una resina acrílica y una resina siliconada en disolventes orgánicos. Se utiliza para conferir mejores propiedades estructurales y de hidrorepelencia a piedras naturales, ladrillo o estuco. Es muy utilizada en procesos de restauración.

Primal AC<sup>TM</sup>35 (elaborado por *Kremer Pigmente*) es un polímero acrílico para pinturas resistentes de alto brillo, formulado sincoalescente. En comparación con los polímeros convencionales Primal AC<sup>TM</sup> 35 ofrece un desarrollo más rápido de la dureza y la resistencia.

Es necesario probar cada uno de los aglutinantes para encontrar el más adecuado a cada sistema. Uno de los inconvenientes más comunes es que al preparar la muestra la misma se hidrate durante el proceso de mezcla con el aglomerante por lo que no se formará una pasta de consistencia apropiada para ser colocada en la prensa.



**Figura V.16.** (a) Muestra comercial, aglomerante y mortero de ágata; (b) Molde y tapones de papel (c) Molde con muestra en la prensa hidráulica; (d) barra de muestra compactada y (e) entrada de ablación láser con la barra de muestra ubicada.

Para formar la barra se usa un molde de acero inoxidable. El molde que se observa en la figura V.16.b se utiliza en dos etapas: En la primera, se arman los tapones de papel que se observan en la figura. El material de los tapones debe ser inerte ya que no debe interactuar ni con la muestra ni con el aglomerante. Se cortan tiras de papel *tissue* y se enrollan sobre sí mismas. Se colocan en el centro del molde y con una varilla



de acero inoxidable se presiona. Se coloca en la prensa durante unos minutos y cuando se retira con un martillo de goma se da un golpe para retirar el tapón formado. La segunda etapa consiste en la formación de la barra propiamente dicha. A continuación, la mezcla formada por la muestra y el aglomerante se coloca en el molde y se somete a presiones de cerca de 300 MPa con la prensa hidráulica (figura V.16.c) para obtener una barra de muestra compactada (figura V.16.d) de aproximadamente 2 cm de largo y 6 mm de diámetro. La barra obtenida se coloca en un desecador para protegerla de la humedad ambiente y se deja “fraguar” de 7 a 10 días. Se deben preparar por lo menos 3 barras en el mismo día ya que si la muestra se hidrata, se quiebra o no resiste la ablación no se podrá continuar con el experimento y se deberá esperar otros 10 días para trabajar. La barra queda con los extremos de papel que deben ser retirados con el mayor cuidado de no quebrarla. Ésta se ubica en la entrada de ablación (figura V.16.e). Una preparación adecuada de la muestra (con dureza y poca fragilidad) es fundamental en el éxito del experimento.

En la etapa II.b, se hace uso de la espectroscopia CP-FTMW y LA-MB-FTMW para obtener los espectros de rotación de los confórmeros presentes en el jet supersónico. La búsqueda experimental de los confórmeros más estables se inicia con barridos desde 6000 a 10200 MHz mediante la técnica CP-FTMW y se detectan las transiciones correspondientes a todos los confórmeros. Una vez identificadas las transiciones, mediante LA-MB-FTMW se polariza a la frecuencia donde se produjo la transición, con unas condiciones de potencia en consonancia con el momento dipolar responsable de las reglas de selección de las transiciones observadas. Los espectros de los correspondientes confórmeros se identifican mediante sucesivas predicciones y nuevas medidas experimentales que descartan o confirman la asignación inicial.

En la etapa III.b, las transiciones medidas se analizan con las rutinas desarrolladas en el programa de Pickett, utilizando el Hamiltoniano semirrígido de Watson para la reducción asimétrica,  $H_R^{(A)}$  en la representación  $I'$  ( $z \rightarrow a$ ,  $y \rightarrow b$ ,  $x \rightarrow c$ ) y suplementado con un término que da cuenta de la interacción de acoplamiento de cuadrupolo nuclear  $H_Q$  (Gordy y Cook, 1984):

$$H = H_R^{(A)} + H_Q \quad (\text{V.6})$$

El Hamiltoniano de Watson semirrígido  $H_R^{(A)}$  utilizado se expresa como:

$$H_R^{(A)} = A L_a^2 + B L_b^2 + C L_c^2 - \Delta_L L^4 - \Delta_{LK} L^2 L_a^2 - \Delta_K L_a^4 - 2 \delta_L L^2 (L_b^2 - L_c^2) - \delta_K [L_a^2 (L_b^2 - L_c^2) + (L_b^2 - L_c^2) L_a^2] \quad (V.7)$$

donde  $A$ ,  $B$  y  $C$  representan las constantes de rotación y  $\Delta_L$ ,  $\Delta_{LK}$ ,  $\Delta_K$ ,  $\delta_L$  y  $\delta_K$  son las constantes de distorsión centrífuga. El Hamiltoniano  $H_Q$  tiene la expresión:

$$H_Q = \left[ \frac{eQ * q_L}{2L(2L-1)I(2I-1)} \right] * \left[ \frac{3(IL)^2 + 3}{2IL - I^2 * L^2} \right] \quad (V.8)$$

Los parámetros espectroscópicos que se determinan son las constantes de rotación, las constantes de distorsión centrífuga sólo en algunos casos ( $\Delta_L$  y  $\Delta_{LK}$ ) y los elementos del tensor de acoplamiento de cuadrupolo. Generalmente, se determinan los elementos diagonales del tensor  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$  que junto con las constantes de rotación experimentales  $A$ ,  $B$  y  $C$ , nos permiten identificar los conformeros mediante comparación directa con los parámetros espectroscópicos calculados.

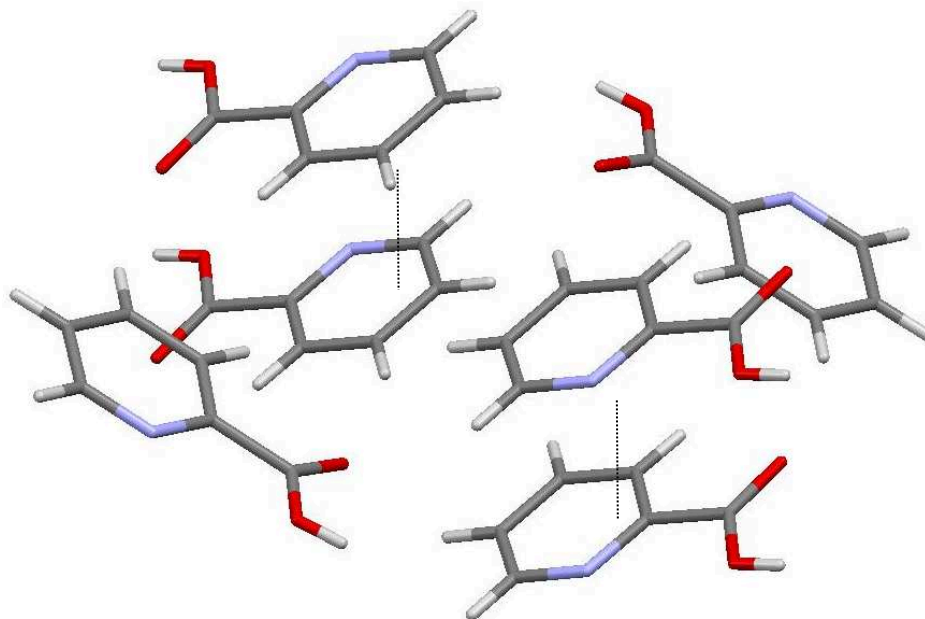
Con las frecuencias de transiciones obtenidas del experimento se ajustan los parámetros teóricos utilizando la rutina del programa de *Pickett*, SPFIT.

### V.3.3 Ácido Picolínico

El ácido picolínico o ácido piridin-2-carboxílico es una biomolécula de 14 átomos formada por un anillo piridínico y un grupo ácido. El nitrógeno piridínico se encuentra en posición *orto* respecto del grupo carboxílico (Jellinek, 1954). La molécula ha sido cristalizada y reportada su estructura mediante rayos X. En la figura V.18 se observa la celda unitaria del cristal. Corresponde a un grupo espacial  $C_{2/c}$ , monoclinico, con parámetros de celda  $a = 21.262(6)$ ,  $b = 3.837(4)$  y  $c = 13.972(4)$ ;  $\alpha = 90$ ,  $\beta = 108.02(2)$  y  $\gamma = 90$ . Por celda unitaria hay 8 moléculas de ácido picolínico (Takusagawa y Shimada, 1973).

La estructura cristalina reportada presenta una única configuración para las moléculas empaquetadas y en la que se observa que en fase condensada el ácido picolínico adopta una configuración tendiente a formar puentes de hidrógeno intermoleculares y además las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos piridínicos estabilizan la estructura a lo largo del eje  $b$ . En contraste, los cálculos teóricos predicen 3

conformeros teóricos estables en fase gas calculados con el método MP2 y una base estándar 6-311++G(d,p) que son mínimos de la superficie de energía potencial.



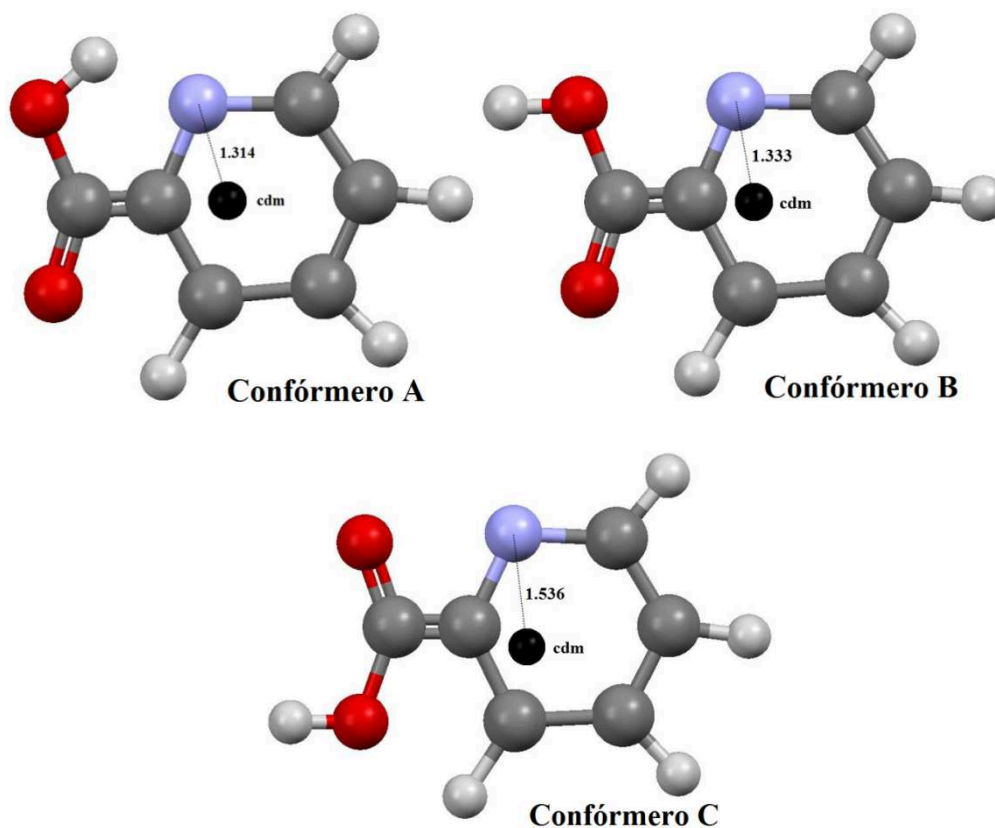
**Figura V.17.** Estructura cristalina del Ácido picolínico. En fase condensada, las moléculas se empaquetan con una única posibilidad conformacional. Las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos piridínicos, estabilizan la estructura cristalina a lo largo del eje b. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

La representación para cada conformero resulta en la figura V.18 donde se observan los rotámeros con las orientaciones que puede adoptar el átomo de hidrógeno del grupo carboxilo con respecto al átomo de nitrógeno del anillo piridínico. Estudios teóricos previos realizados con otra base de cálculo obtuvieron iguales resultados (Koczón y col., 2003). La ubicación de cada átomo en cada conformero es expresada en ejes cartesianos considerando el centro de masas para cada conformero (tabla 1.1, anexo V). Con cada rotámero centrado en el centro de masas (figura V.18) se calculan los momentos, ejes principales de inercia y otros parámetros relevantes.

En la tabla V.5 se resumen los parámetros teóricos para los 3 conformeros. Las constantes de rotación y los elementos diagonales del tensor de acoplamiento cuadrupolar fueron muy similares para los 3 rotámeros.

En algunas ocasiones, en conformeros con la misma configuración del esqueleto molecular, los valores de las constantes de rotación no son suficientes para discriminar entre ellos. Este es el caso, por ejemplo, de los conformeros **B** y **C** del ácido picolínico (tabla V.5), que tienen exactamente la misma disposición de la función ácido y se diferencian únicamente en la orientación del átomo de hidrógeno del grupo carboxílico (similar distribución de masa). Las componentes del momento dipolar constituyeron una

herramienta muy útil al momento de la experimentación siendo  $p_a$  la componente de mayor valor para los conformeros **A** y **B**; y  $p_b$  el conformero **C**. Los valores de energía, permitieron inferir que el conformero **C** no sería hallado en la expansión supersónica.



**Figura V.18.** Conformeros más estables del ácido picolínico predichos mediante cálculos *ab initio*. El grupo carboxílico es el responsable de las variaciones de configuración de los 3 rotámeros identificados como **A**, **B** y **C** en orden creciente de energía. Se muestra el centro de masas de cada una de las posibilidades conformacionales. A medida que el átomo de hidrógeno del grupo carboxilato se aleja del nitrógeno piridínico aumenta la distancia de éste al centro de masa lo que se relaciona directamente con la estabilidad de los conformeros, confirmado con los valores crecientes de energía calculados. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

Los valores del parámetro de *Ray*, definido como  $\kappa = (2B - A - C)/(A - C)$  indican que las moléculas son rotores asimétricos ya que  $A > B > C$  próximos a la situación prolata. El momento planar de Inercia, definido como  $P_c = \frac{1}{2} (I_A + I_B - I_C)$  de cada conformero da la extensión de masa fuera del plano inercial principal *ab*. Si  $P_c = 0$ , la molécula es completamente plana.

Las interacciones intramoleculares (enlaces puente hidrógeno) contribuyen a incrementar el orden, disminuyen la entropía y aumentan la energía de Gibbs. La

estructura más estable es la denominada **A** debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular, entre el átomo de hidrógeno del grupo carboxílico y el átomo de nitrógeno del anillo piridínico, siendo la distancia 1.465 Å y el ángulo formado entre O-H...N de 115.30°. Este tipo de enlace estabiliza la estructura de la molécula tal como ocurre con otras moléculas biológicas que contienen nitrógeno como aminoácidos y neurotransmisores (Sanz y col., 2006a; Sanz y col., 2006b; Alonso y col., 2006; Cocinero y col., 2006; Alonso y col., 2009).

**Tabla V.5.** Constantes espectroscópicas *Ab Initio* para los conformeros de ácido picolínico calculadas con MP2/6-311+ + G(d,p).

Parámetros	Conformeros		
	A	B	C
<b>A (MHz)</b>	3880	3933	3922
<b>B (MHz)</b>	1286	1264	1255
<b>C (MHz)</b>	966	957	960
<b>Pc (uÅ<sup>2</sup>)</b>	2,652	0,003	2,563
<b>κ</b>	-0,78	-0,79	-0,80
<b>χ<sub>aa</sub> (MHz)</b>	-0.49	-0.41	-0.47
<b>χ<sub>bb</sub> (MHz)</b>	-2.45	-2.94	-2.88
<b>χ<sub>cc</sub> (MHz)</b>	2.93	3.34	3.34
<b>p<sub>T</sub> (D)</b>	<b>5.8</b>	<b>2.4</b>	<b>3.9</b>
<b>p<sub>a</sub> (D)</b>	5.8	2.4	2.3
<b>p<sub>b</sub> (D)</b>	0.4	0.6	-3.1
<b>p<sub>c</sub> (D)</b>	0.0	0.0	0.0
<b>E<sub>MP2</sub> (h)</b>	-435.8086951	-435.8032881	-435.8019251
<b>ΔE<sub>MP2</sub> (cm<sup>-1</sup>)</b>	0	1186	1486

A, B y C representan las constantes rotacionales teóricas; κ, parámetro de Ray; χ<sub>aa</sub>, χ<sub>bb</sub> y χ<sub>cc</sub>, son los elementos diagonales del tensor de acoplamiento cuadrupolar del núcleo de <sup>14</sup>N; p<sub>a</sub>, p<sub>b</sub> y p<sub>c</sub> son las componentes del momento dipolar eléctrico.

Con las constantes de rotación y las componentes del momento dipolar de cada conformero, se realizó la predicción de la frecuencia de cada línea de transición, para cada especie sin desdoblamiento cuadrupolar.

Para el conformero **A** se predijeron líneas de tipo **a** debido a que presentó el mayor valor de las componentes del momento dipolar (**p<sub>a</sub> = 5.8 D**). La predicción (tabla 1.2, anexo V) se realizó sin contemplar las constantes de cuadrupolo, debido a que la búsqueda conformacional se planteó con el instrumento CP-FTMW el cual no permite resolver la estructura hiperfina pero tiene la ventaja de realizar barridos de 4 GHz en un lapso corto de tiempo. De la salida completa de la rutina de predicción SPCAT, solo se

tuvieron en cuenta las transiciones de la rama R ( $\Delta L = +1$ ) debido a que fueron las que presentaron mayor intensidad calculada. El valor  $L = 5$  es el máximo que se puede observar en la expansión supersónica por lo que las predicciones a mayores valores no se tuvieron en cuenta.

De acuerdo a los cálculos de energía y tal como era previsto, se detectaron los conformeros **A** y **B** en la expansión supersónica con el instrumento en configuración CP-FTMW. El espectro obtenido (figura V.19) muestra el barrido con las transiciones más intensas correspondiente al conformero más estable. El conformero B, que corresponde al detectado en fase condensada mediante cristalografía, se identificó entre las líneas de menor intensidad.

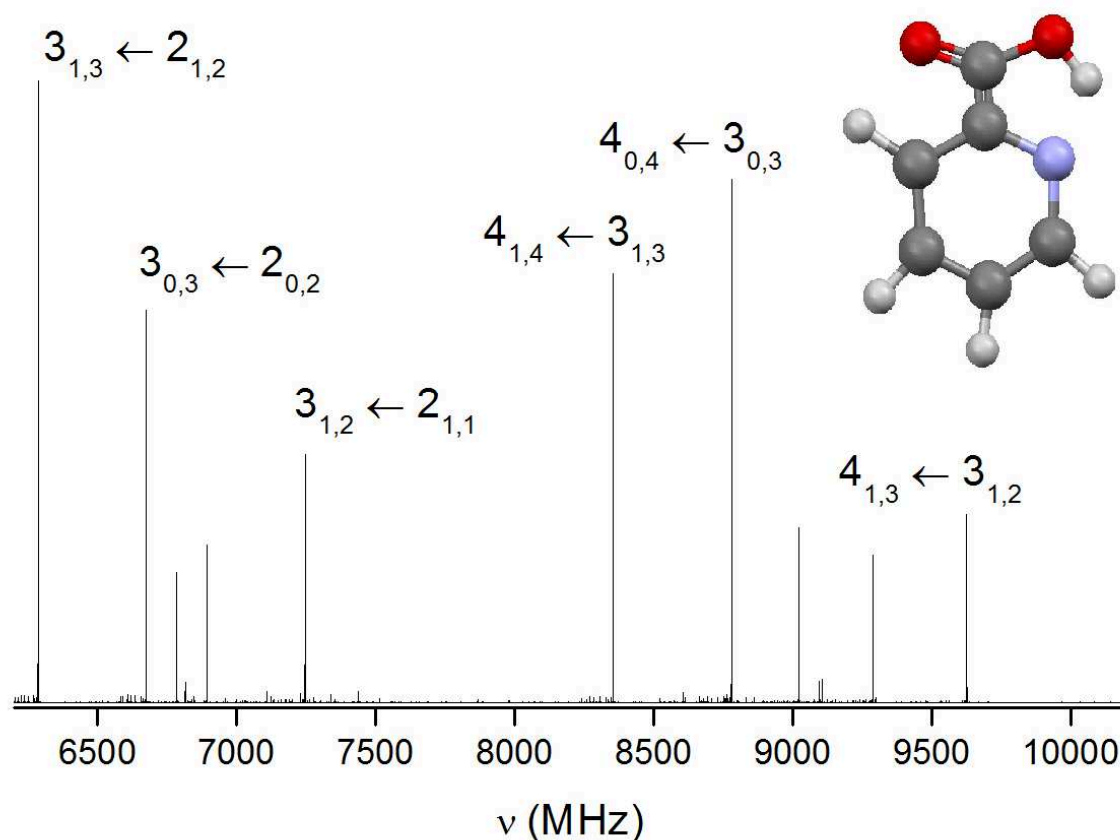
En la tabla V.6 se resumen los parámetros experimentales para los conformeros A y B obtenidos del barrido mediante la configuración CP-FTMW.

**Tabla V.6.** Constantes espectroscópicas experimentales para los conformeros de Ácido Picolínico. Los dos conformeros se detectaron en la expansión supersónica y se ajustaron por el método de mínimos cuadrados de la rutina SPFIT.

Parámetros	Conformero	
	A	B
<i>A</i> (MHz)	3903.70(4)	3959.41(2)
<i>B</i> (MHz)	1281.8490(6)	1268.126(7)
<i>C</i> (MHz)	965.3239(5)	961.353(7)
$\chi_{aa}$ (MHz)	-0.56(7)	-0.43(6)
$\chi_{bb}$ (MHz)	-2.48(5)	-2.85(4)
$\chi_{cc}$ (MHz)	2.89(6)	3.37(5)
N	27	12
$\sigma$ (%)	0.2	1.1

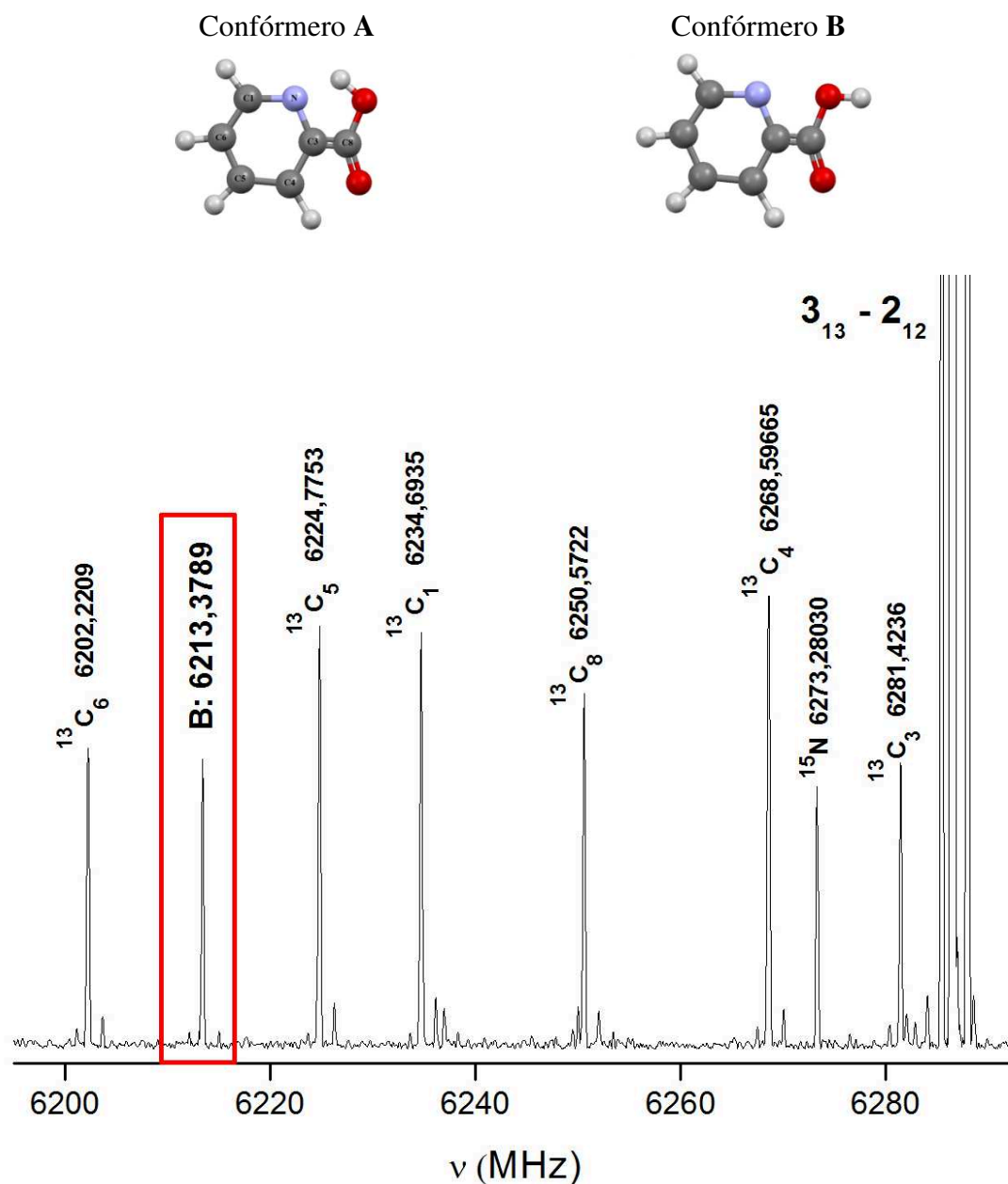
*A*, *B* y *C* representan las constantes rotacionales teóricas;  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$  y  $\chi_{cc}$ , son los elementos diagonales del tensor de acoplamiento cuadrupolar del núcleo de  $^{14}\text{N}$ ; N es el número de componentes hiperfinas ajustadas;  $\sigma$  (%) desviación porcentual del ajuste (rms, root mean square).

Tal como se concluye de los cálculos y se observa en la expansión supersónica (figura V.19), el conformero con el puente hidrógeno intramolecular es el más estable y el más abundante. Las transiciones  $3 \leftarrow 2$  se asignaron aproximadamente 30 MHz por encima de la predicción y las transiciones  $4 \leftarrow 3$ , 40 MHz. Esto se debe a que a medida que aumenta el valor de  $L$  las transiciones tienen mayor espaciamiento (tabla A.7, anexo V). Del análisis detallado del barrido obtenido con el espectrómetro CP-FTMW (figura V.20) se identificó el mismo patrón de líneas del conformero **A** con menor intensidad y las transiciones pertenecientes al conformero **B**.



**Figura V.19.** Espectro CP-FTMW del ácido picolínico. Barrido en un rango de 6200 a 10200 MHz. Las líneas intensas corresponden a las transiciones del conformero A.

La determinación de la estructura molecular implica el conocimiento de las constantes de rotación que están relacionadas en forma inversamente proporcional con los momentos de inercia. La estructura de las moléculas se ve afectada por las vibraciones atómicas por lo que el concepto de *estructura* puede entenderse de diferentes formas: La *estructura de equilibrio* ( $r_e$ ) es la que corresponde al mínimo de la curva de energía potencial por lo que es un estado de referencia, pero no se corresponde con un estado experimental observable; la *estructura efectiva* ( $r_0$ ) es la que reproduce los momentos de inercia en un estado particular de vibración y la *estructura de sustitución* ( $r_s$ ) es la que permite determinar la posición de los átomos al centro de masa de la molécula sustituida isotópicamente a partir del cambio que se produce en el momento de inercia debido al aumento del número de neutrones del átomo isotópico que incrementa la masa total (Peña y col., 2014)



**Figura V.20.** Espectro CP-FTMW, ampliación de la región de la transición  $3_{13} \leftarrow 2_{12}$ . Se identificó la misma transición para el confórmero A sustituido isotópicamente por  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En el recuadro rojo se observa la transición correspondiente al confórmero B.

En el experimento inicial, con la predicción sin cuadrupolo fue suficiente para la asignación de las señales de menor intensidad y favoreció la búsqueda del confórmero B (figura V.20 y Anexo V). La sustitución isotópica normalmente se realiza como un procedimiento adicional en la preparación de muestra. En este caso particular la caracterización se realizó en abundancia natural. Se realizaron nuevos cálculos *ab initio* correspondientes al confórmero A pero sustituyendo cada uno de los carbonos de la



molécula por  $^{13}\text{C}$ , el nitrógeno por  $^{15}\text{N}$  y el oxígeno por  $^{18}\text{O}$ , respectivamente obteniendo las constantes de rotación de la molécula sustituida (tabla V.7).

**Tabla V.7.** Constantes espectroscópicas *Ab Initio* para el conformero A sustituido isotópicamente. Las constantes se calcularon mediante MP2/6-311+ + G(d,p).

Parámetros	$^{13}\text{C}_1$	$^{13}\text{C}_3$	$^{13}\text{C}_4$	$^{13}\text{C}_5$	$^{13}\text{C}_6$	$^{13}\text{C}_8$	$^{15}\text{N}$	$^{18}\text{O}_{10}$	$^{18}\text{O}_{11}$
<i>A</i> /MHz	3836.4	3879.5	3832.8	3839.7	3879.4	3879.4	3841.1	3770.8	3774.3
<i>B</i> /MHz	1275.7	1285.5	1284.5	1273.0	1264.6	1276.5	1285.0	1251.2	1253.3
<i>C</i> /MHz	957.4	965.5	962.1	956.0	953.7	964.7	962.9	939.5	940.9

En el archivo de entrada de datos se consideró la misma matriz *Z* de coordenadas cartesianas de los átomos en la molécula para la configuración adoptada por el conformero correspondiente, cambiando en cada cálculo sólo la masa del átomo isotópico. Con las nuevas constantes obtenidas de la sustitución isotópica, se realizaron predicciones de líneas tipo *a* para el conformero A.

**Tabla V.8.** Constantes de rotación y de acoplamiento cuadrupolar experimentales del conformero A sustituido isotópicamente.

Parámetros	$^{13}\text{C}_1$	$^{13}\text{C}_3$	$^{13}\text{C}_4$	$^{13}\text{C}_5$	$^{13}\text{C}_6$	$^{13}\text{C}_8$	$^{15}\text{N}$
<i>A</i> /MHz	3860.33(4)	3904.61(5)	3856.90(4)	3863.91(5)	3906.77(5)	3903.72 (4)	3865.35(7)
<i>B</i> /MHz	1281.0164(5)	1290.2352(6)	1289.7750(5)	1278.2779(5)	1269.791(5)	1281.8484 (5)	1290.3379 (8)
<i>C</i> /MHz	962.1761(4)	969.4901(6)	966.8940(4)	960.8516(5)	958.4731(5)	965.3239 (4)	967.7406 (7)
$\chi_{aa}$ (MHz)	-0,54(3)	-0,52(7)	-0,53(4)	-0,56(7)	-0,58(7)	-0,52(7)	-
$\chi_{bb}$ (MHz)	-2.41(5)	-2.45(5)	-2.48(5)	-2.43(5)	-2.51(5)	-2.50(5)	-
$\chi_{cc}$ (MHz)	2.79(6)	2.81(2)	2.83(3)	2.84(6)	2.80(6)	2.89(6)	-
<i>N</i> <sup>(*)</sup>	26	14	24	23	17	27	(***)
$\sigma$ (%) <sup>(**)</sup>	0.4	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3

(\*) *N* es el número de componentes hiperfinas ajustadas.

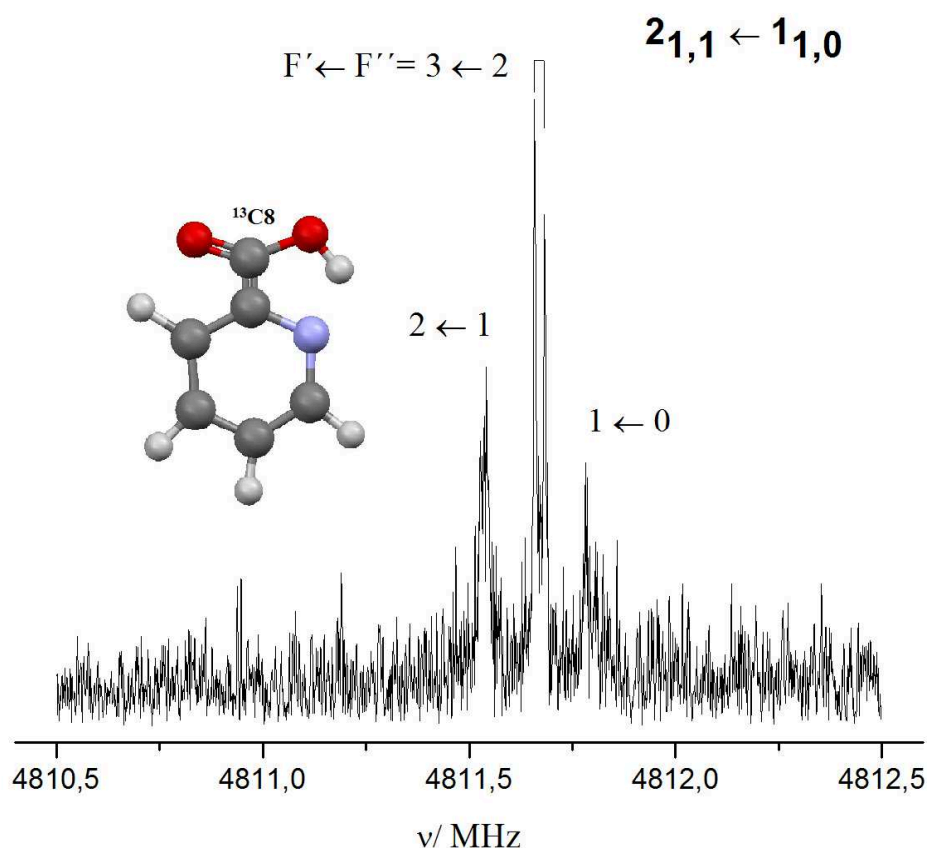
(\*\*) Desviación porcentual del ajuste (rms, root mean square).

(\*\*\*) En este caso no hay desdoblamiento hiperfino debido a que  $^{15}\text{N}$  posee distribución esférica de carga en el núcleo, *I* = 0.

El cálculo se realizó en dos etapas: ignorando y considerando las constantes acoplamiento hiperfino. Para las predicciones con estructura hiperfina, las constantes de acoplamiento cuadrupolar que se consideraron fueron las obtenidas para el conformero sin sustituir. Con los valores medidos para cada transición, se procedió a realizar el ajuste mediante el método de cuadrados mínimos desarrollado en la rutina SPFIT del programa de Pickett.

El ajuste óptimo se logra si la desviación rms ( $\sigma$ ) es menor al 2%. Un ejemplo de ajuste se presenta en la tabla V.4 en el anexo V. Los parámetros experimentales obtenidos se resumen en la tabla V.8.

En la resolución de la estructura hiperfina del conformero **A** sustituido isotópicamente se utilizó el instrumento en la configuración LA-MB-FTMW. Los espectros obtenidos se visualizan como el de la figura V.21 para cada una de las transiciones. El desdoblamiento de la señal por la presencia del átomo de nitrógeno permite la caracterización inequívoca de las componentes (Peña y col., 2014)



**Figura V.21.** Espectro LA-MB-FTMW del ácido picolínico. Transición  $2_{1,1} \leftarrow 1_{1,0}$  del conformero **A** sustituido isotópicamente en abundancia natural en el  $\text{C}_8$ , mostrando la estructura hiperfina de cuadrupolo de  $^{14}\text{N}$ . La forma de la señal es típica del efecto Doppler.

La intensidad de las señales de transición para cada conformero está relacionada con la abundancia de cada uno en la expansión supersónica. Suponiendo que el enfriamiento producido por la expansión supersónica lleva a todos los conformeros a sus estados fundamentales de vibración después de la expansión, las abundancias de los distintos conformeros se pueden estimar midiendo las intensidades relativas resultantes de las transiciones rotacionales. Las intensidades de las transiciones de un conformero en concreto son proporcionales a  $\mu_i \cdot N_i$  donde  $\mu_i$  es la componente del momento dipolar

eléctrico y  $N_i$  la población de esa especie en el *jet*. Las líneas correspondientes al conformero **A** son mucho más intensas que las del **B** y son las que se visualizan fácilmente en la figura V.20. De este modo, han sido estimadas las proporciones de las poblaciones conformacionales con las transiciones de tipo *a*. Estas abundancias relativas indican la estabilidad conformacional y coinciden con los cálculos *ab initio* de las energías relativas. En la Tabla V.9 se presentan las abundancias (relaciones entre las intensidades con respecto al momento dipolar) de seis transiciones y una media de las mismas con la estimación de la abundancia relativa de cada conformero.

**Tabla V.9.** Abundancia relativa de los conformeros. Intensidades con respecto del momento dipolar de uno y abundancias relativas medidas a partir de espectros CP-FTMW.

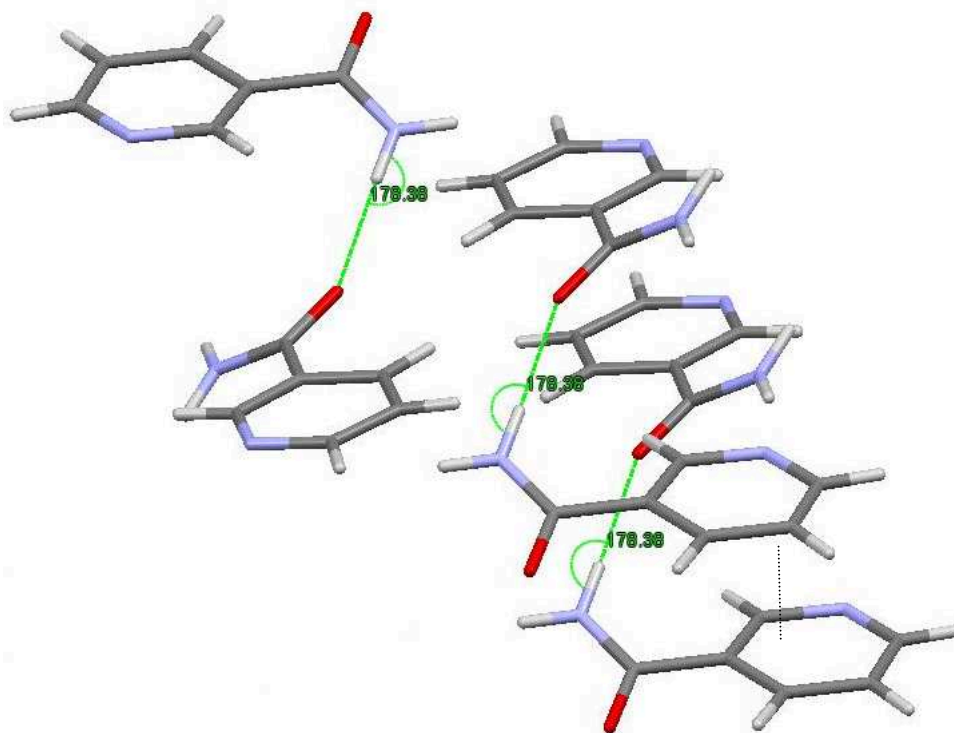
$L'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$L''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	$I_A / p_a$ ( $p_a = 5.8 \text{ D}$ )	$I_B / p_a$ ( $p_a = 2.4 \text{ D}$ )
3	1	3	2	1	2	9,693	0,169
3	0	3	2	0	2	6,116	0,199
3	1	2	2	1	1	3,859	0,052
4	1	4	3	1	3	6,684	0,097
4	0	4	3	0	3	8,147	0,123
4	1	3	3	1	2	2,922	0,050
<b>(<math>I_{\text{conformero}} / p_a</math>) promedio</b>						<b>6,237</b>	<b>0,115</b>
<b>Abundancia Relativa</b>						<b>1,0</b>	<b>0,2</b>

La comparación de la estructura reportada en fase condensada del ácido picolínico con los resultados obtenidos en fase gas, indican que la interacción con el medio condiciona el comportamiento de las moléculas. En fase gas el conformero más estable es el que genera un enlace puente hidrógeno intramolecular, conformero A, en tanto en fase condensada la configuración adoptada es la del conformero B, menos abundante en la expansión supersónica pero estabilizado por interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre anillos piridínicos.

### V.3.4. Nicotinamida

La molécula ha sido cristalizada y reportados sus parámetros estructurales (Wright y King, 1954); éstos valores fueron chequeados y ajustados nuevamente con instrumentos más sofisticados que los usados en el primer reporte (Miwa y col., 1999). En la figura V.22 se observa que por celda unitaria hay 4 moléculas de nicotinamida con

posibilidad de formación de puentes de hidrógeno entre ellas. El cristal es monoclinico y pertenece al grupo espacial P 2-1/c con parámetros de celda:  $a = 3.877(4) \text{ \AA}$ ,  $b = 15.60(1) \text{ \AA}$  y  $c = 9.375(6) \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 98.45^\circ(7)$  y  $\gamma = 90^\circ$  (Miwa y col., 1999).



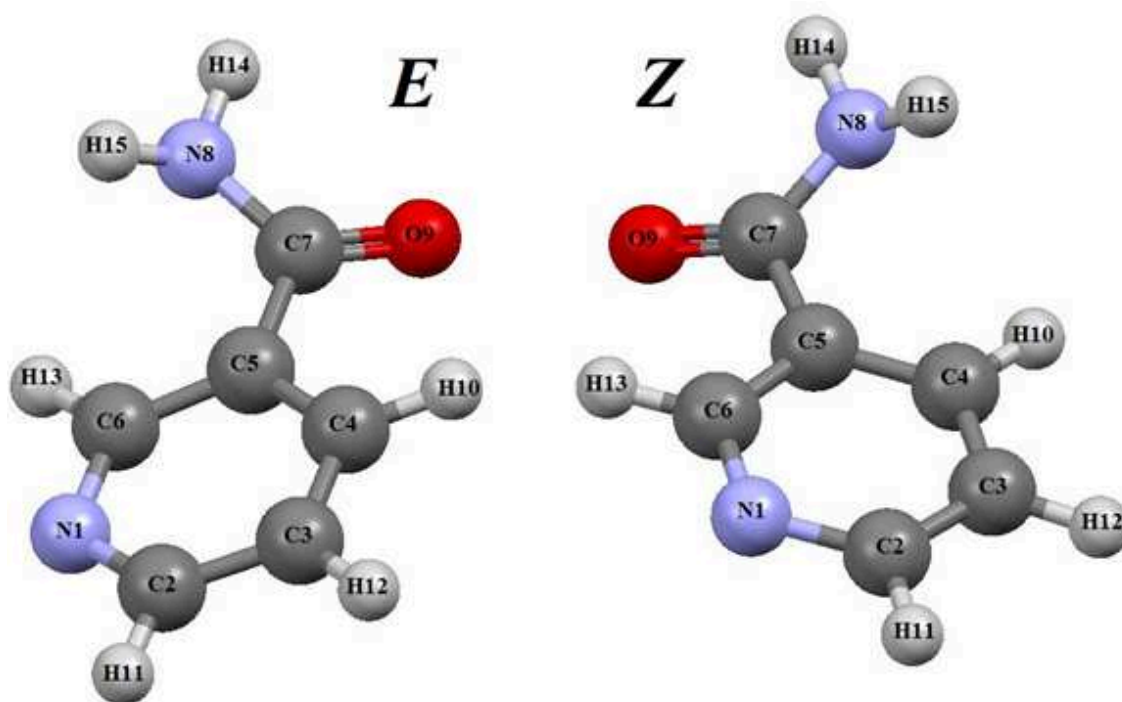
**Figura V.22.** Estructura cristalina de nicotinamida. Las moléculas en fase condensada, se estabilizan por enlaces puente hidrógeno formados entre el oxígeno del carbonilo de una molécula y el hidrógeno del grupo amino de la molécula vecina. Las interacciones entre los anillos piridínicos  $\pi$ - $\pi$  a lo largo del eje  $c$  contribuyen a la estabilización. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

En fase condensada las posibilidades conformacionales se encuentran acotadas al empaquetamiento en el cristal, por lo que el estudio en fase gas provee información estructural que no es posible obtener a partir de un cristal. El grupo amida de la molécula tiene la posibilidad de girar lo que resulta en dos rotámeros diferentes. En la figura V.22 se observa una única posibilidad conformacional para la molécula en la red cristalina, estabilizándose mediante enlaces puente hidrógeno entre moléculas vecinas e interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre anillos piridínicos. Las moléculas de nicotinamida en la red cristalina presentan el oxígeno del grupo amida en posición trans con respecto al nitrógeno piridínico.

Mediante espectroscopia de rotación se evidenció la existencia de 4 conformeros en fase gas denominados  $E_g$ ,  $E_e$ ,  $Z_I$  y  $Z_{II}$  (Vogelsanger y col., 1990). La denominación  $E$  o  $Z$  se debe a la posición que ocupa el oxígeno del grupo amida con

respecto al nitrógeno piridínico: *Entgegen* (contra) y *Zusammen* (junto), en la figura V.23 se visualizan los dos rotámeros.

Los conformeros  $E_g$  y  $Z_I$  se corresponden al estado basal vibracional mientras que  $E_e$  y  $Z_{II}$  a un estado excitado. La detección de los conformeros excitados, se realizó con un espectrómetro de ondas milimétricas con sistema de evaporación por calor de la muestra y expansión supersónica. La muestra en fase gas e irradiada con ondas milimétricas se sometió a alto voltaje (Stark Modulation) (Vogelsanger y col., 1990). En adelante se denominarán  $E$  y  $Z$ , debido a que se analizarán sólo resultados obtenidos para el estado basal. De los conformeros hallados el más estable es el conformero  $E$  (Wu y Houk, 1993) al igual que en fase condensada.



**Figura V.23.** Confórmeros de nicotinamida. Ambos han sido predichos con cálculos teóricos y evidenciados experimentalmente en fase gas y en fase condensada. En el conformero  $E$  el oxígeno se encuentra en posición *trans* respecto del nitrógeno piridínico; en  $Z$  se encuentra en posición *cis*. La figura se generó utilizando *CCDC Mercury 3.2*.

La formación de enlaces puente hidrógeno mediante los grupos amida y el nitrógeno piridínico de moléculas vecinas se estudió comparando los parámetros estructurales teóricos en fase gas con los obtenidos de cristales mediante difracción de neutrones para el conformero  $E$  (Miwa y col., 1999). El estudio de complejos de nicotinamida con metales de transición confirmó que el grupo amida es el responsable

de la formación de las redes intermoleculares mediante puentes de hidrógeno (Bayari y col., 2003).

Medidas realizadas en fase condensada mediante espectroscopia FT-IR de la molécula confirmaron la mayor estabilidad del conformero *E* o *trans* y la similitud de las frecuencias vibracionales para las dos configuraciones que puede adoptar el rotámero, pudiendo asignar las señales a cada conformero por las diferencias de intensidad, actividad Raman y radios de de polarización en las bandas Raman (Kumar y col., 2010).

En el presente trabajo se ha profundizado en el estudio de ésta biomolécula. La resolución de la estructura hiperfina de los conformeros permite la caracterización completa de la molécula. El análisis de los espectros de rotación de nicotinamida en fase gas es especialmente complejo en espectroscopia de alta resolución debido a la estructura hiperfina de acoplamiento de cuadrupolo nuclear originada por los **dos núcleos de  $^{14}\text{N}$**  que posee la molécula (Gordy y Cook, 1984). Esto origina un número mayor de líneas debidas al desdoblamiento, lo que dificulta la asignación, pero al mismo tiempo es la herramienta adicional para la identificación inequívoca de los conformeros (López y col., 2010).

Mediante cálculos por el método MP2/6-311++G(d,p) se obtuvieron los valores teóricos para las estructuras optimizadas. A partir de las coordenadas en ejes cartesianos considerando el centro de masas para cada conformero (tabla 2.1, anexo V) se calcularon los momentos y los ejes principales de inercia; además de las constantes de rotación, las componentes del momento dipolar y las constantes de desdoblamiento cuadrupolar. En este caso se obtuvieron los valores correspondientes a cada nitrógeno lo que permitió la caracterización de la molécula.

En la tabla V.10 se resumen los parámetros teóricos para cada rotámero. Ambos son del tipo pseudo prolate por el valor del parámetro de Ray ( $\kappa$ ) para cada uno. Para ambos conformeros la componente del momento dipolar  $p_b$  es la de mayor valor por lo que las predicciones se realizaron para líneas tipo *b*.

La posición que adopta el grupo amida en la molécula se relaciona con la planaridad de la molécula y es responsable del valor de  $P_c$ . Los valores obtenidos de  $P_c$  tanto en *E* como en *Z* indican claramente que el grupo amida se acomoda de tal forma que la molécula se aleja de la planaridad dada por el anillo piridínico, tal como se observa en la cristalografía en fase condensada.

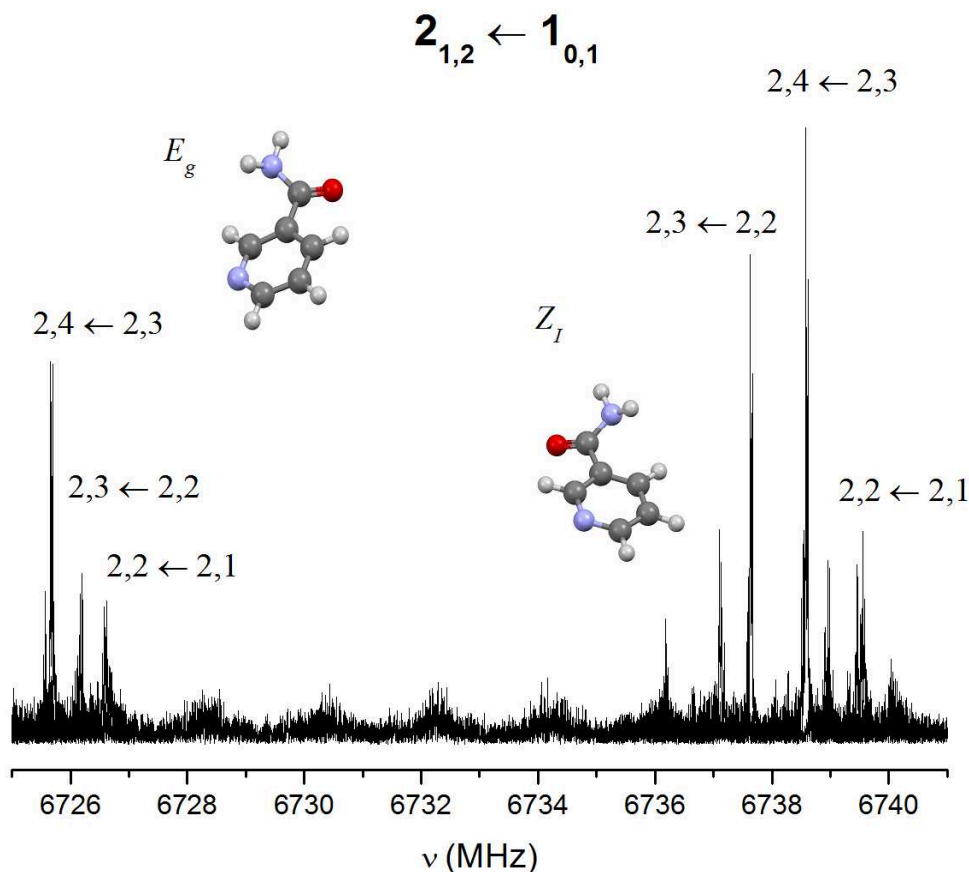
**Tabla V.10.** Constantes espectroscópicas *Ab Initio* para los conforméromos de nicotinamida calculadas con MP2/6-311+ + G(d,p).

Parámetro	Conforméromos $E_g$	Conforméromos $Z_I$
A /MHz	3847.1560	3847.2146
B /MHz	1221.1086	1214.8546
C /MHz	956.3493	960.8328
$\kappa$	-0.817	-0.824
$P_c/\text{u.Å}^2$	8,394	10,691
$\mu_T/D$	1.200	4.814
$\mu_a /D$	0.315	-0.160
$\mu_b /D$	1.150	-4.559
$\mu_c /D$	0.200	-1.538
<b>N1</b>		
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	-0.0295	-0.0310
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	-3.2594	-3.9453
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	3.2889	3.3576
<b>N8</b>		
$\chi_{aa}/\text{MHz}$	1.9355	1.4355
$\chi_{bb}/\text{MHz}$	0.3229	0.3785
$\chi_{cc}/\text{MHz}$	-2.2584	-2.6543
$E_{MP2} /h$	-415.9472315	-415.9461549
$\Delta E_{MP2} /cm^{-1}$	0	236.286

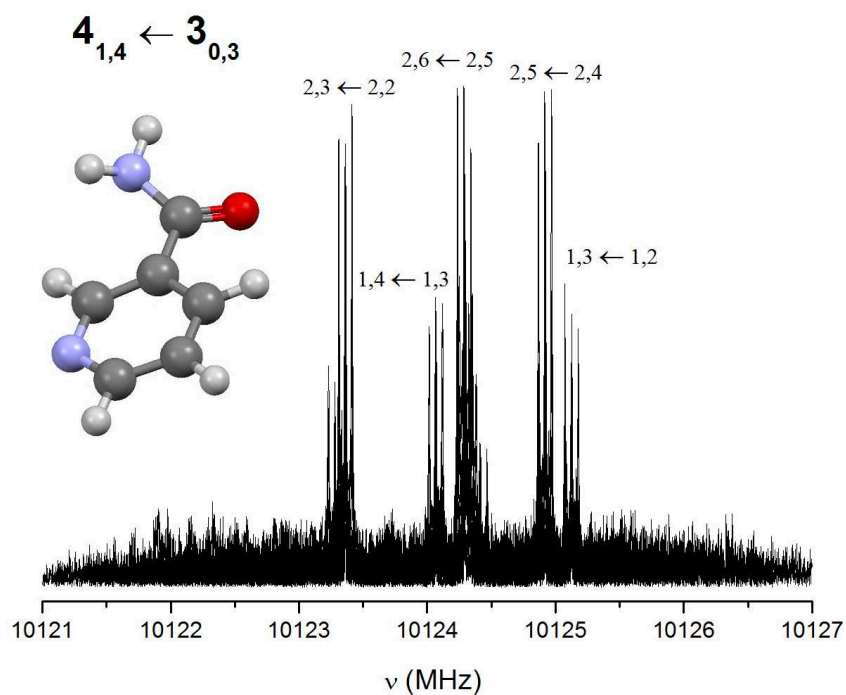
$A$ ,  $B$  y  $C$  representan las constantes rotacionales teóricas;  $\kappa$ , parámetro de Ray;  $P_c$ , parámetro de planaridad;  $\mu_a$ ,  $\mu_b$  y  $\mu_c$  son las componentes del momento dipolar eléctrico.  $\chi_{aa}$ ,  $\chi_{bb}$ ,  $\chi_{cc}$ , son los elementos diagonales del tensor de acoplamiento cuadrupolar del núcleo de  $^{14}\text{N}$ ;

En particular para el conforméromos  $E$  se realizaron cálculos adicionales rotando el ángulo del carbono  $\alpha \pm 3^\circ$  y  $\alpha \pm 5^\circ$ . Con las nuevas constantes se realizaron las predicciones correspondientes para los parámetros rotacionales (tabla 2.2, anexo V). Esto permitió corroborar la estructura más estable en cuanto a la posición el grupo amida.

Los espectros LA-MB-FTMW obtenidos de nicotinamida, indicaron la presencia de ambos conforméromos en la expansión supersónica (figura V.24) tal como fueran reportados por Vogelsanger y colaboradores. Las predicciones permitieron identificar claramente ambos conforméromos, aunque no fueron suficientes para resolver la estructura hiperfina de ambos.



**Figura V.24.** Espectro LA-MB-FTMW de nicotinamida. Se observa la presencia de ambos conformeros en la transición  $2_{1,2} \leftarrow 1_{0,1}$ .



**Figura V.25.** Transición rotacional  $4_{1,4} \leftarrow 3_{0,3}$  del conformero *E* de nicotinamida. Se observan las componentes del desdoblamiento cuadrupolar debidas a la presencia de dos átomos de  $^{14}\text{N}$ . Se etiquetan con los números cuánticos  $I, F' \leftarrow I', F''$ .



Sólo pudo resolverse la estructura hiperfina del conformero *E*. En la figura V.25 se observan claramente las componentes del desdoblamiento cuadrupolar de la estructura hiperfina para el éste conformero. La potencialidad de la técnica utilizada radica en la posibilidad de las asignaciones inequívocamente de las señales en una molécula “compleja” desde el punto de vista químico debido a la presencia de dos átomos de nitrógeno.

En la tabla V.11 se comparan los valores teórico y los experimentales para el rotámero caracterizado.

**Tabla V.11.** Comparación de constantes espectroscópicas teóricas y experimentales para el conformero *E*.

Parámetro	Teórico	Experimental
A /MHz	3847.1560	3848.13(6)
B /MHz	1221.1086	1222.1(5)
C /MHz	956.3493	955.95(7)
$\kappa$	-0.817	-0.82(7)
$P_c$	8,394	8,4(5)
<b>N1</b>		
$\chi_{aa}$ /MHz	0.315	0.32(4)
$\chi_{bb}$ /MHz	1.150	1.13(3)
$\chi_{cc}$ /MHz	0.200	0.19(5)
<b>N8</b>		
$\chi_{aa}$ /MHz	-0.0295	-0.03(4)
$\chi_{bb}$ /MHz	-3.2594	-3.27(2)
$\chi_{cc}$ /MHz	3.2889	3.30(6)
N	-	16
$\sigma$ (%)	-	0.4

Los datos experimentales obtenidos pertenecen al conformero más estable de nicotinamida tanto en fase gas como condensada, corroborando la sinergia de las técnicas acopladas. La dilucidación de la estructura hiperfina del conformero *E* indica que el mismo en ausencia de otras interacciones con el medio adopta la configuración energéticamente más estable, que a su vez es la que permite la formación de enlaces puente hidrógeno entre moléculas vecinas y la estabilización de las láminas mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos piridínicos.



## *Capítulo VI*

---

## VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis, se estudiaron las metaloenzimas *DdATPs* y *DdAPSr* y se modelaron diferentes aspectos del comportamiento fisicoquímico de éstas, mediante sistemas miméticos en fase condensada y en fase gas.

Las metaloproteínas caracterizadas se purificaron a partir de la cepa *Desulfovibrio desulfuricans*, bacteria sulfato reductora anaerobia. Se optimizaron las condiciones para el crecimiento en condiciones de anaerobiosis (en atmósfera de nitrógeno) y se recolectó una cantidad de biomasa celular suficiente para la obtención de proteínas. Se lograron purificar hasta grado electroforético *DdATPs* y *DdAPSr*. Ambas metaloenzimas fueron caracterizadas mediante sus propiedades fisicoquímicas, cinéticas y magnéticas.

De la primera enzima del ciclo de azufre ATPs de la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* (Furusaka, 1961) se comprobó el peso molecular de 47 kDa por subunidad siendo la misma un trímero tal como fuera anteriormente reportado para ATPs de *D. gigas* (Gavel y col., 1998). La adaptación de una metodología analítica para la cuantificación colorimétrica de fosfato inorgánico proveniente de la descomposición de pirofosfato, producto de la reacción de ATPs, por Pirofosfatasa alcalina (Fusari y col., 2006) permitió caracterizar cinéticamente la metaloenzima mediante el modelo de Michaelis-Menten obteniendo los parámetros correspondientes  $K_m$  y  $V_m$ , en correspondencia con los hallados para la misma metaloproteína de *T. denitrificans* (Gay y col., 2009). Se cuantificaron los metales presentes Co (II) y Zn (II) mediante absorción atómica, coincidiendo en valores dentro del rango de los reportados (Gavel y col., 1998). Mediante espectroscopia UV-vis se complementó la información para caracterizar el sitio metálico cuyo entorno de coordinación se confirmó tetraédrico debido a la banda de absorción alrededor de 660 nm, típico de Co (II) en coordinación tetraédrica (Cotton y Wilkinson, 1988). El ensayo de saturación de microondas mediante EPR permitió cuantificar la separación entre dobletes del Co (II), el valor hallado se corresponde a un sitio metálico coordinado a cuatro ligandos. Este es el primer reporte de caracterización magnética de ATPs proveniente de *Desulfovibrio desulfuricans*.

La metaloproteína APSr de la bacteria *Desulfovibrio desulfuricans*, que corresponde a la segunda enzima que participa en la vía desasimilativa de reducción del

sulfato (Furusaka, 1961), se caracterizó molecularmente. Se obtuvieron las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de 97 kDa y 18 kDa, respetivamente. La subunidad  $\alpha$ , presentó en su estructura un cofactor asociado, el radical flavina; en la subunidad  $\beta$  se detectaron dos centros Fe-S tal como fuera reportado para *D. gigas* (Chiang y col., 2009). La flavina y los centros  $\text{Fe}_4\text{-S}_4$  constituyen los sitios paramagnéticos de la molécula y es a través de los cuales se realiza la transferencia electrónica. El camino químico planteado, involucra el anillo isoaloxazina del radical unido covalentemente en el sitio activo y enlaces puente hidrógeno entre aminoácidos de la enzima y los centros FeS. La cadena de transferencia electrónica, comienza con el radical flavina oxidado, que toma dos electrones y los cede al sitio  $\text{Fe}_4\text{-S}_4$  a menor distancia y que por cristalografía se denominó centro FeS I (Chiang y col., 2009). Estos electrones continúan al centro FeS II, ubicado en la superficie de la enzima y expuesto al solvente. El ensayo de saturación de la enzima en 3 condiciones rédox, permitió asignar inequívocamente los centros detectados por EPR a los cristalográficos. Este es el primer reporte en que se hace una asignación de centros FeS utilizando EPR.

El modelado de aspectos puntuales de un sistema complejo como lo es una metaloenzima, permitió esclarecer ciertas cuestiones planteadas para el camino químico de transferencia electrónica de APSr y su comportamiento magnético. Con este fin, en fase condensada, se caracterizó el complejo  $\text{Cu}(\text{glu})\text{phen}$  y en fase gas los ligandos de iones metálicos, ácido picolínico y nicotinamida. Esto permitió modelar las uniones puente hidrógeno y las interacciones de tipo  $\pi\text{-}\pi$  entre anillos aromáticos en presencia y en ausencia de interacciones con el medio.

En fase condensada, se caracterizó estructural y magnéticamente el complejo de cobre sintetizado con el aminoácido ácido L-glutámico y la amina aromática 1,10-fenantrolina. Se obtuvieron espectros de muestra policristalina en banda X y Q. En banda X, se observó una sola línea asimétrica en  $g \sim 2.07$ , mientras que en el espectro en banda Q se observa una línea casi axial con estructura hiperfina parcialmente resuelta en la región de  $g \parallel$ . Las mediciones de EPR en muestra de monocristal orientado, resultaron en líneas espectrales de multiplete hiperfino, moduladas por interacciones de intercambio entre centros débiles mediadas por interacciones no covalentes. Los espectros EPR se interpretaron utilizando el modelo de Anderson para evaluar tanto el tensor  $g$  molecular de los iones de cobre como la frecuencia de intercambio que acopla los centros de cobre vecinos más cercanos entre sí, de la red. Las simulaciones numéricas de la variación angular de los espectros de EPR mostraron que el colapso de

la estructura hiperfina de los centros de cobre se debe a un mecanismo de intercambio que acopla cada línea de las transiciones  $2I + 1$  con todas las demás líneas del espectro y con la misma probabilidad de transición (caso “a”). La interacción de intercambio responsable de los cambios experimentados por la estructura de multiplete de los iones de Cu aislados, está mediada por la interacción hidrofóbica entre dos moléculas phen y un camino químico mixto del tipo  $\text{CuA-O}_{\text{ap}}\text{H} \dots \text{OC-O}_{\text{EQ}} - \text{CuB}$ . El valor hallado para la constante de acoplamiento por intercambio  $|J| \approx 25 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  está en concordancia con valores de  $J$  hallados para otros compuestos que tienen caminos químicos de superintercambio similares. Se han propuesto caminos químicos con estas características, como vías de transferencia electrónica en metaloproteínas redox, estos resultados también pueden ser útiles para dar una idea de los procesos de transferencia de electrónica a través de largas distancias. El camino químico propuesto específicamente para la metaloenzima *DdAPSr*, se corresponde con éstas características.

En fase gas, se caracterizaron los ligandos de iones metálicos, ácido picolínico y nicotinamida. Las posibilidades conformacionales, libre de interacciones con el medio de la molécula de ácido picolínico, se deben al nitrógeno del anillo piridínico y al grupo ácido. Mediante cálculos se predijeron 3 conformeros denominados **A** (con un enlace puente hidrógeno intramolecular, entre el nitrógeno piridínico y el hidrógeno más el oxígeno del grupo carboxílico), **B** (el grupo carboxílico tiene rotado el hidrógeno  $180^\circ$  en relación al conformero A) y **C** (el grupo carboxilato rota completo  $180^\circ$  por lo que en dirección al nitrógeno piridínico queda el grupo carbonilo) en orden creciente de energía y sus respectivas transiciones cuánticas permitidas. Con el instrumento de configuración CP-FTMW se hallaron en la expansión supersónica los conformeros A y B. Se detectaron señales muy intensas correspondientes al conformero A, el cual se encuentra estabilizado por el puente hidrógeno intramolecular. Se observó la repetición del patrón espectral con menor intensidad por lo que se realizaron cálculos y predicciones sustituyendo cada uno de los átomos de la molécula con su isótopo. Esto permitió caracterizar isotópicamente en abundancia natural el conformero A del ácido picolínico. El conformero B se detectó entre las señales de menor intensidad de acuerdo a lo esperado. La presencia de un átomo de nitrógeno en la molécula (núcleo con una distribución no esférica de su carga nuclear), permitió la identificación de conformeros en base al análisis de la estructura hiperfina cuadrupolar. Para resolverla se utilizó el instrumento de configuración LA-MB-FTMW, caracterizando inequívocamente ambos conformeros. Éste es el primer reporte de conformeros para ácido picolínico.

Comparando éstos resultados con los reportados por cristalografía, se observó que el conformero que se empaqueta en la red cristalina es el B siendo ésta la configuración más estable de la molécula en fase condensada ya que permite generar enlaces puente hidrógeno intermoleculares e interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos piridínicos tal como ocurre con aminoácidos con éstas características estructurales, como el triptófano fundamental en el camino de transferencia electrónica de *DdAPSr*. La molécula de nicotinamida presenta la particularidad de poseer en su estructura dos átomos de nitrógeno. Esto genera una estructura hiperfina cuadrupolar nuclear con más líneas que en la molécula de ácido picolínico por lo que su caracterización es más compleja. Se realizaron cálculos y predicciones de conformeros que se denominaron *E* y *Z*. Las mediciones se realizaron con el instrumento LA-MB-FTMW, cuya configuración es la apropiada para la resolución de la estructura hiperfina. La caracterización del conformero *E* permitió no solo probar de la potencialidad de la técnica sino que además se comprobó la importancia de los enlaces puente hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas en el empaquetamiento de moléculas. En fase condensada la molécula se encuentra condicionada por su entorno, ya sea por moléculas vecinas o por el solvente en el cual se encuentra disuelta a diferencia de fase gas, donde la configuración más estable de la molécula es la que permite generar enlaces puente hidrógeno intermoleculares e interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos piridínicos.

## *Anexo I*

---

### **Cultivo de *Desulfovibrio desulfuricans***

Detalle de las condiciones de crecimiento, método de cultivo y repique de la cepa

## AI. CULTIVO DE *Desulfovibrio desulfuricans*

### 1. Condiciones de crecimiento

El cultivo de *Desulfovibrio desulfuricans* se realiza bajo condiciones de anaerobiosis, en atmósfera de nitrógeno; estático, con un período de incubación de 7-10 días al cabo del cual se procede al repique del cultivo.

### 2. Condiciones de mantenimiento

El mantenimiento de *Desulfovibrio desulfuricans* se realiza bajo condiciones de anaerobiosis, en atmósfera de nitrógeno; estático, con un período de incubación de 15 días al cabo del cual se procede al repique del cultivo.

### 3. Preparación del medio de cultivo

Para preparar 1000 mL de medio, se procede con las cantidades expuestas en la tabla A.1. Para evitar errores en la preparación es conveniente utilizar la planilla y completar con los valores pesados. Se deben adicionar los reactivos en el orden correspondiente de aparición y las soluciones en el orden en que están nombradas.

**Tabla A.1.** Soluciones para la preparación de 1 L de medio de cultivo.

<b>Solución A</b>		<b>Solución B</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g	Agua destilada	10 mL
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.1 g	<b>Solución C</b>	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2.0 g	Tioglicolato de sodio	0.1 g
DL-Lactato de Sodio	3.2 mL	Ácido Ascórbico	0.1 g
Extracto de Levadura	1.0 g	Agua destilada	10 mL
Resazurina	1 mg		
H <sub>2</sub> O destilada	980 mL		
pH 7.4		pH final 7.8	

El indicador utilizado es resazurina. Si la solución es rosada significa presencia de oxígeno (figura 1); si se encuentra de color gris, ausencia del mismo. La solución A se ve de color azul (poco resazurina) o de color violeta (cantidad apropiada de reactivo). Considerar el alto costo del indicador, por lo que se debe agregar una pizca. Una vez adicionadas las soluciones B y C el color cambia a rosado intenso (al llevar a pH puede



que se debilite el color pero luego vuelve a virar). Es fundamental el pH de la solución A y el de la solución final.



**Figura A.1.** Kitasatos con medio de cultivo listos para la inoculación. El color rosado intenso indica presencia de oxígeno. En ausencia vira la coloración a gris.

A los kitasatos de 1000 mL, se adiciona un volumen aproximado de 500 mL. A los kitasatos de 500 mL, se adiciona un volumen aproximado de 250 mL. Se les colocan los tapones en la boca, y en el pico un capuchón de papel de aluminio. Los taponcitos se envuelven juntos en papel de diario y se hace un paquete; se pega con cinta de papel a uno de los kitasatos. Así preparados, se colocan en autoclave. Controlar el nivel de agua, debe estar por debajo del contrafondo. Si es poca, siempre adicionar agua destilada. Se enciende y luego de 40 minutos se cierra la espita y se controla que llegue a 1 atmósfera de presión. Una vez alcanzada, se baja la llama para que se mantenga la presión constante durante 15 minutos. Luego se apaga el autoclave. Se espera que baje la presión, se abre la espita, se espera que se disipe el vapor y se retiran los kitasatos. Se colocan en el flujo laminar hasta temperatura ambiente (figura A.1).

#### 4. Repique de la cepa

Una vez transcurrido el período de incubación, se procede al repique en medio fresco. Se cierran las válvulas que permiten el pasaje de nitrógeno y se retiran los kitasatos. Se recolecta el contenido de los mismos en un vaso de precipitado de 2000

mL y se coloca en la heladera. Se guarda 1 kitasato para inocular los nuevos (por ej. 1 kitasato de 1000 mL para inocular 3 de 1000 mL, se adiciona 200 mL a cada uno). Se enciende el flujo laminar, (previamente se limpia con una mezcla de alcohol y agua con papel) por 15 minutos. Se deja el motor encendido y se cambia la luz de UV a visible. Se abre el paquete y se colocan los taponcitos en los kitasatos. Se agita bien el kitasato con inóculo a fin de homogeneizar. Se destapa el kitasato y se procede a la inoculación de los medios frescos. Se colocan nuevamente en la cámara de incubación y se abren las válvulas que permiten el pasaje de nitrógeno. Se abre lentamente la válvula del tubo para permitir un pasaje mayor del gas. Al cabo de 2 horas, los medios comienzan a virar su color de rosado a gris.

## **5. Recolección de la cepa**

Se centrifuga el medio de cultivo con las bacterias a fin de separar ambas fracciones. Las condiciones son las siguientes: rotor 0.78, con las botellas de 80 mL, a 6000 rpm, durante 6 minutos con un break de 6 a 4 °C. Se pesan las botellas para equilibrar, con una apreciación de 0,01 g (utilizar pipeta Pasteur nueva en cada centrifugación); el volumen no debe ser mayor de 60 mL. Es fundamental mantener baja la temperatura del medio por lo que después de la operación de pesada se debe llevar el recipiente a la heladera. Para descartar el medio se debe colocar en recipientes adecuados para luego adicionar agua lavandina. Colectar en bidón de descarte de residuos líquidos perfectamente rotulado.

Una vez completado el proceso de centrifugación, resuspender en buffer TRIS / HCl 100 mM pH 7.6. Colocar todas las células en un único falcón de 50 mL. Centrifugar nuevamente, cambiando el rotor, descartar el sobrenadante y pesar el tubo (previamente tarado) para conocer la biomasa obtenida. Rotular adecuadamente y guardar en freezer a (-20°C). Realizar la correspondiente planilla de seguimiento de datos obtenidos.

## **6. Repique de la cepa en medio sólido**

Se realiza en medio sólido en placas de Petri. El medio de cultivo se prepara igual, con la única diferencia de agregar 15 g de Agar-Agar por litro de medio. Por cada placa se necesitan 15-20 mL. Se prepara un volumen pequeño (50 mL) de medio, se pesa el agar-agar y se coloca en erlenmeyer sin agitar (se debe evitar que se pegue en las

paredes) se autoclave cubriendo con papel aluminio la boca en olla presión durante 30 minutos. Esperar que baje la temperatura. Previamente encender el flujo laminar 15 minutos y volcar el medio en las placas y esperar que solidifique. Colocar la cuba de anaerobiosis en el flujo y destapar cuidadosamente. Sacar todas las placas y apartar la de abajo. Tomar con ansa ojal colonias de la placa más antigua y pasarla por toda la placa. Colocar la nueva placa en la parte superior (cuidado con el orden, esto indica la antigüedad de cada una). Sellar con parafilm y colocar en la cámara de anaerobiosis nuevamente con nitrógeno.

## *Anexo II*

---

### **Purificación**

Detalle del proceso de purificación de las metaloproteínas  
*DdATPs* y *DdAPSr*

## AII. PURIFICACIÓN

### 1. Preparación de la muestra

Se retiraron los tubos falcon conteniendo la biomasa almacenada a (-20)°C. Se colocaron en baño con agua circulando para aumentar la temperatura sin llegar a la ambiente. Se resuspendieron las células con buffer TRIS/HCl 10 mM pH 7,6.

- ♦Biomasa inicial: 169,71 g
- ♦Volumen inicial: 500 mL

### 2. Ruptura Celular

- ♦Equipo: Sonicador Marca Sonics Modelo VC 505.
- ♦Condiciones: Potencia 40%, sonda de mayor diámetro (25 mm), con intervalos de 4 tiempos de pulsos y 4 tiempos de espera. Tiempo total de 1 hora.

### 3. Ultracentrifugación

La muestra fue ultracentrifugada a 45000 rpm durante 45 minutos, para separar la fracción membranar de la citoplasmática. Ambas se guardaron en freezer a (-20)°C. La fracción citoplasmática se observa en la figura A.2 y se la denomina “crudo”.



**Figura A.2.** Fracción citoplasmática de las células de *D. desulfuricans*.

## 4. Dializado del crudo

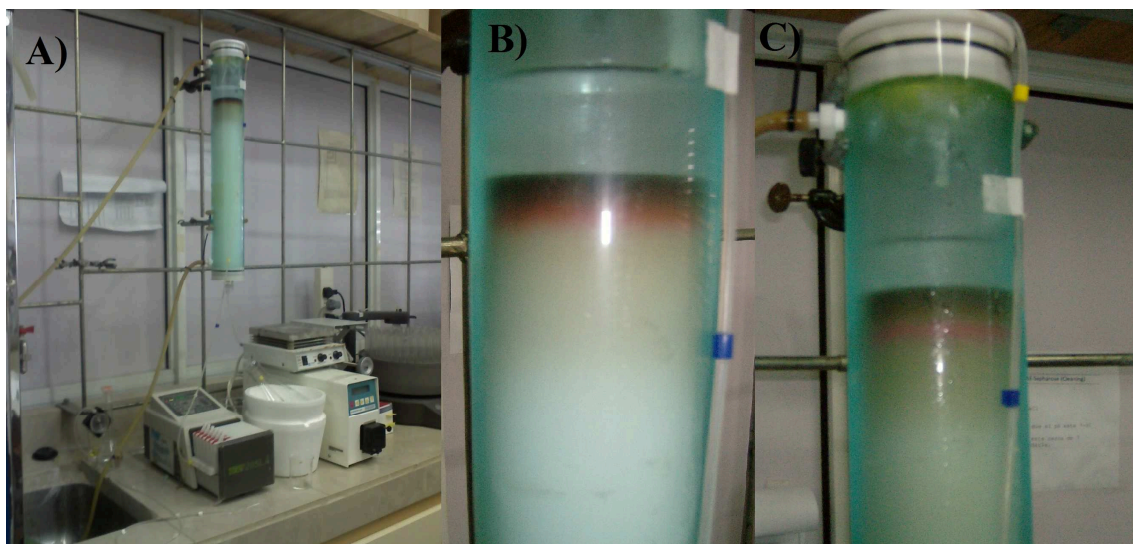
Se prepararon 4 L de buffer TRIS/HCl 10 mM pH 7,6 con  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  10  $\mu\text{M}$  (masa: 5,2 mg). Se cargaron las cintas de diálisis con el crudo y se sumergieron en esta solución con agitación en la heladera over night.

Se centrifugó el crudo para descartar impurezas.

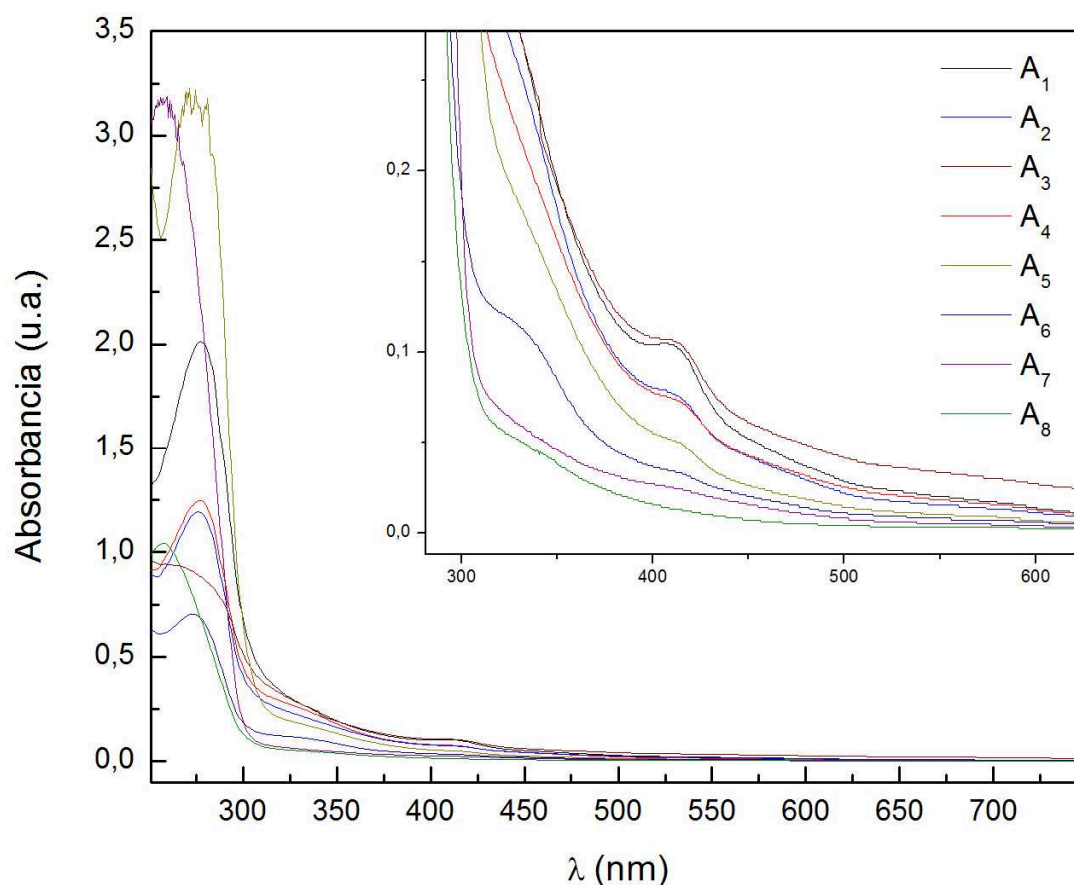
## 5. Columna (A)

Características:

- ♦ Intercambio Iónico Débil
- ♦ Resina: DEAE-Celulosa
- ♦ Diámetro: 5 cm
- ♦ Longitud: 39 cm
- ♦ Volumen: 765,8  $\text{cm}^3$
- ♦ Buffer de equilibrado: 5 volúmenes de TRIS/HCl 10 mM pH 7,6.
- ♦ Flujo: 2,5 mL/min
- ♦ Gradiente: 30 a 300 mM NaCl en buffer TRIS/HCl 10 mM pH 7,6.
- ♦ Fracciones colectadas: 1,8 mL
- ♦ Secuencia de lavado: NaOH 0,5 M: 2 volúmenes  
HCl 0,5 M: 1 volumen  
H<sub>2</sub>O hasta pH 7
- ♦ Solución de almacenamiento: TRIS/HCl 1 M pH 7,6.



**Figura A.3.** A) Columna DEAE-Celulosa sembrada. B) Detalle de la columna sembrada. C) Se observa la separación de las bandas proteicas.



**Figura A.4.** Espectros UV-vis de las fracciones obtenidas de la columna A. Fracciones: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>5</sub>, A<sub>6</sub>, A<sub>7</sub>, A<sub>8</sub>.

## 6. Columna (B)

Características:

- ◆ Intercambio Iónico Fuerte
- ◆ Matriz de la resina: Poliestireno/Divinilbenceno
- ◆ Volumen: 24 cm<sup>3</sup>
- ◆ Buffer de equilibrado: TRIS/HCl 20 mM pH 7,6
- ◆ Flujo: 1,3 mL/min
- ◆ Gradiente: 0 – 600 mM NaCl en TRIS/HCl 20 mM pH 7,6
- ◆ Fracciones colectadas: 1,3 mL
- ◆ Secuencia de lavado:
  1. NaCl 1 M en TRIS/HCl 20 mM pH 7,6 (2 vol) (elimina impurezas)
  2. Agua filtrada (2 vol)
  3. TRIS/HCl 1 M pH 7,6 (2 vol) (para activar la resina)
  4. TRIS/HCl 20 mM pH 7,6 (5 vol) (para equilibrar)



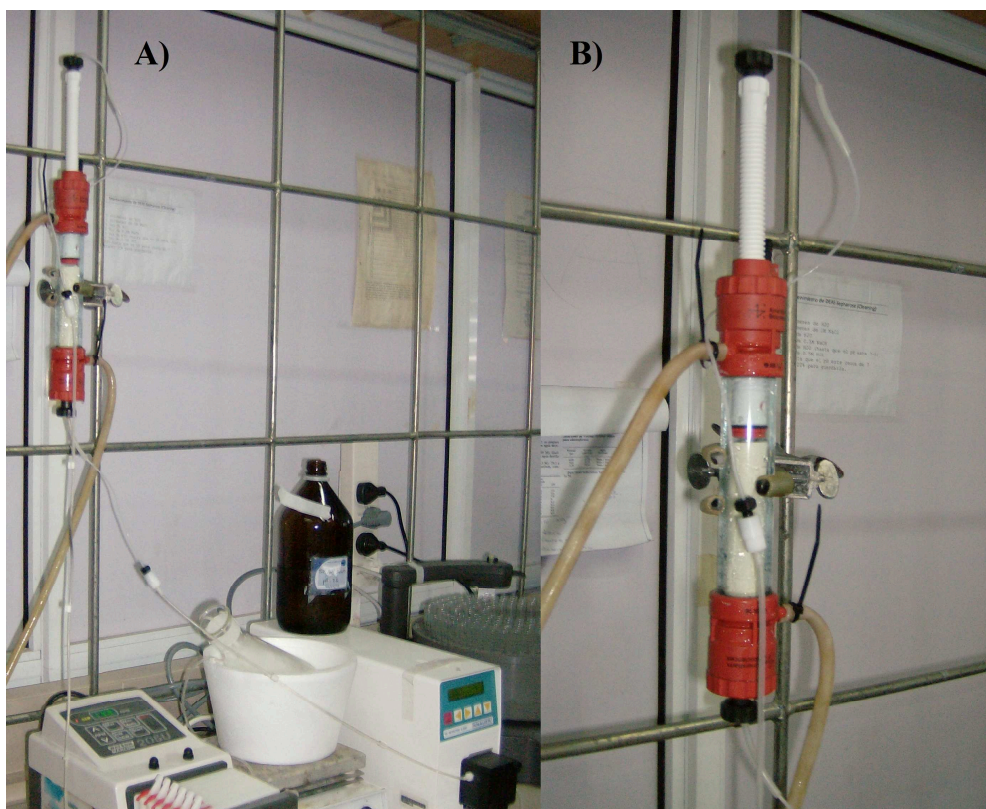


Figura A.5. A) Equipo de purificación con columna Source 15Q. B) Detalle de la columna Source 15 Q.

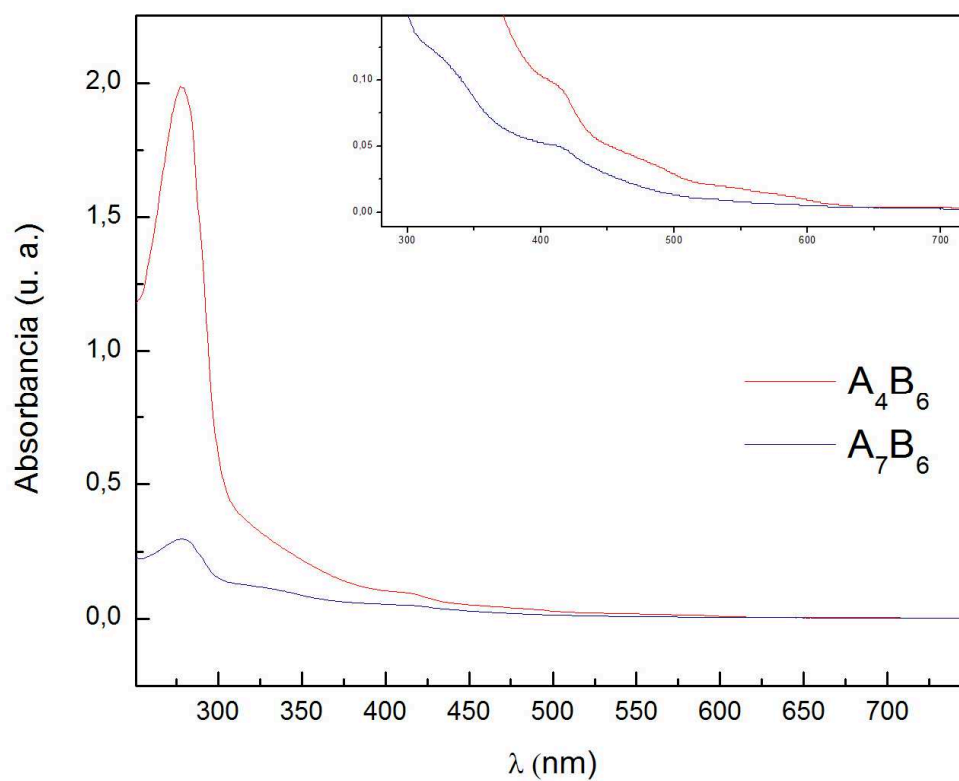


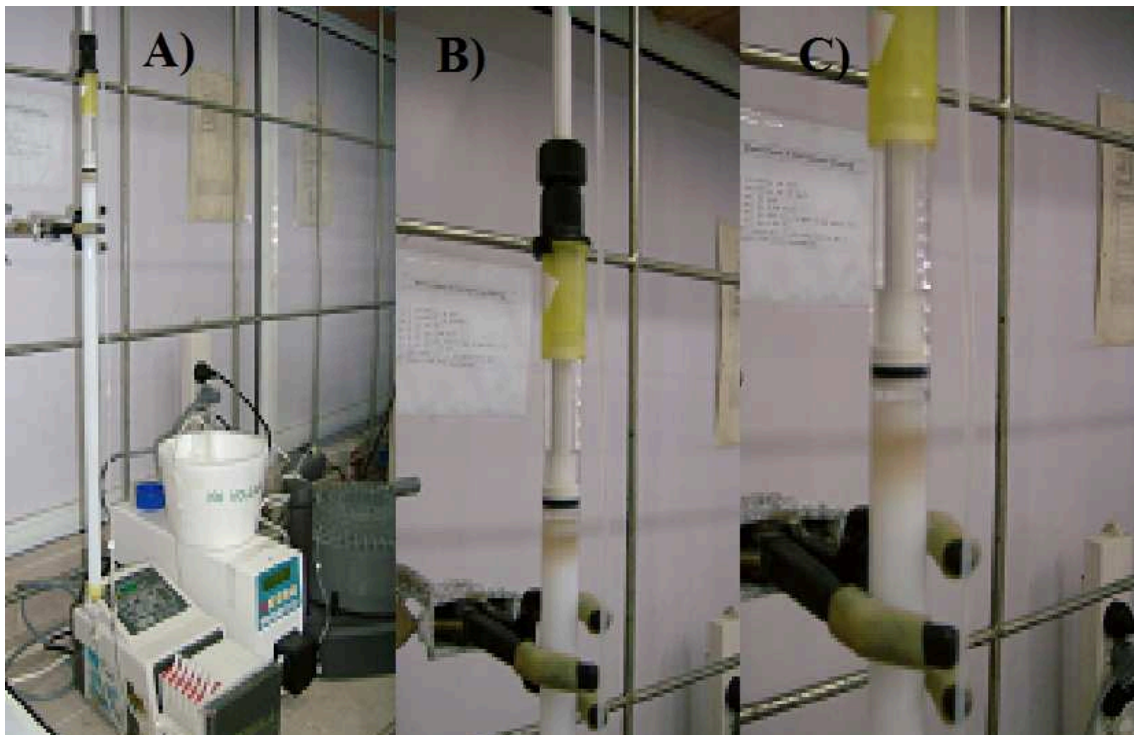
Figura A.6. Fracciones seleccionadas de acuerdo al espectro UV-vis para obtención de *DdATPs* ( $A_4B_6$ ) y *DdAPSR* ( $A_7B_6$ ).



## 7. Columna (C)

Características:

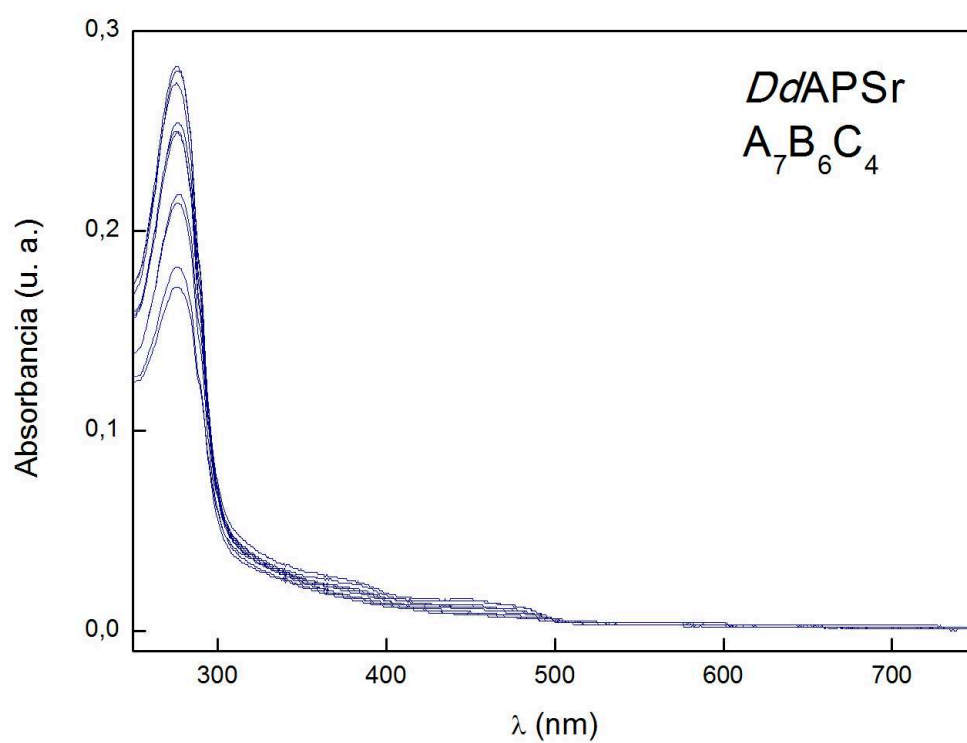
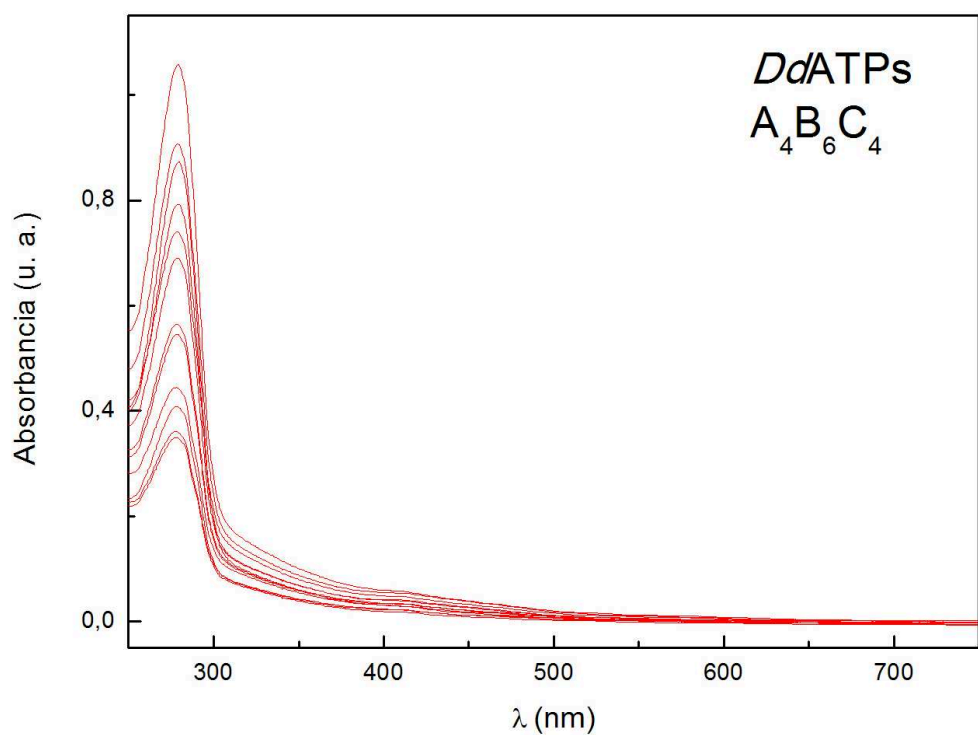
- ♦ Resina: Agarosa y Dextrano
- ♦ Volumen: 100 mL
- ♦ Buffer de equilibrado: NaCl 200 mM en TRIS/HCl 20 mM pH 7,6
- ♦ Flujo: 0,7 mL/min
- ♦ Fracciones colectadas: 1,0 mL



**Figura A.7.** A) Equipo de purificación con columna Superdex 200. B) Columna sembrada. C) Se observa la separación de las bandas proteicas.

Se seleccionaron las fracciones a partir del perfil de los espectros Uv-vis para formar los pools. Una vez seleccionadas las alícuotas que corresponden a cada fracción se les asignó un número indicando el orden de elución.

A cada fracción se le realizó el ensayo de proteínas totales, cinética enzimática y electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE) con el objetivo de asignar inequívocamente la fracción a la metaloproteína purificada.



**Figura A.8.** La gráfica superior pertenece a la alícuota  $A_4B_6C_4$ , donde se identificó *DdATPs*. La gráfica inferior corresponde a la fracción  $A_7B_6C_4$ , donde se detectó *DdAPSr*.

## *Anexo III*

---

### **Ensayo cinético para ATPs**

Descripción del método cinético, su adaptación y validación para  
la evaluación de ATPs

## AIII. ENSAYO CINÉTICO PARA ATPS

### 1. Materiales y Métodos

La preparación de las soluciones utilizadas en el ensayo cinético se realizó como se detalla en la tabla A.2.

**Tabla A.2.** Soluciones necesarias para la determinación de la actividad enzimática de ATP sulfurilasa.

Solución <sup>(*)</sup>	Reactivo	Concentración	Solvente
Fosfato diácido de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,1mM	H <sub>2</sub> Odestilada
Ácido Clorhídrico	HCl	4 M	H <sub>2</sub> Odestilada
Molibdato de Amonio (am)	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	34 mM	HCl 4 M
Verde de Malaquita (MG) Madre	Verde de Malaquita	0,5 mM	H <sub>2</sub> O destilada
Tween 20	Tween 20	2% (v/v)	H <sub>2</sub> O destilada
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 mM	TRIS/HCl110 mM pH 7.6
ATP	$\text{Na}_2\text{ATP}$	25 mM	TRIS/HCl110 mM pH 7.6
Citrato de Sodio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	34% (m/v)	H <sub>2</sub> Odestilada

(\*) Todo el material de vidrio previamente fue lavado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 50% para evitar la interferencia de los grupos fosfatos presentes en el agua de lavado.

**Solución MG-am:** Se tomaron 10 mL de la solución de Molibdato de amonio (am) y se adicionaron 30 mL de la solución de Verde de Malaquita (MG).

**Reactivo de Color:** Se tomaron 10 mL de solución MG-am y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución Tween 20.

**Solución de Pirofosfatasa alcalina inorgánica** (*Pirophosphatase inorganic, from bakers yeast Sigma-Aldrich*) se disolvió con el *buffer* de almacenamiento (TRIS/HCl110 mM pH 7.6) en el mismo vial comercial, con un volumen apropiado para obtener una concentración de 1 unidad/ $\mu\text{L}$  con un 5-10% de glicerol.

El método es indirecto ya que lo que se cuantifica es el  $\text{P}_i$  producido por la reacción enzimática que utiliza como sustrato el pirofosfato resultante de la acción catalítica de ATP sulfurilasa.

Para cada ensayo se realiza una curva de calibrado de Fosfato tal como se muestra en la tabla A.3.

**Tabla A.3.** Curva de calibrado de fosfato utilizada en la cuantificación de  $P_i$ .

Reactivos	0	3	6	9	12	15 <sup>(*)</sup>
Reactivo de color(MG-am) ( $\mu$ L)	1000	970	940	910	880	850
Solución de $KH_2PO_4$ ( $\mu$ L)	0	30	60	90	120	150
Incubación 1 minuto						
Solución de Citrato de sodio ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100	100

(\*) Se adicionaron los volúmenes siguiendo el orden de la tabla de reactivo color y solución de  $KH_2PO_4$  correspondientes a cada punto de la curva. Luego de 1 minuto se agregó la solución de citrato de sodio.

Para la preparación de la muestra se adicionaron los volúmenes de cada solución siguiendo el orden de la tabla AIII.3.

**Tabla A.4.** Preparación de las muestras a ser evaluadas con el método colorimétrico.

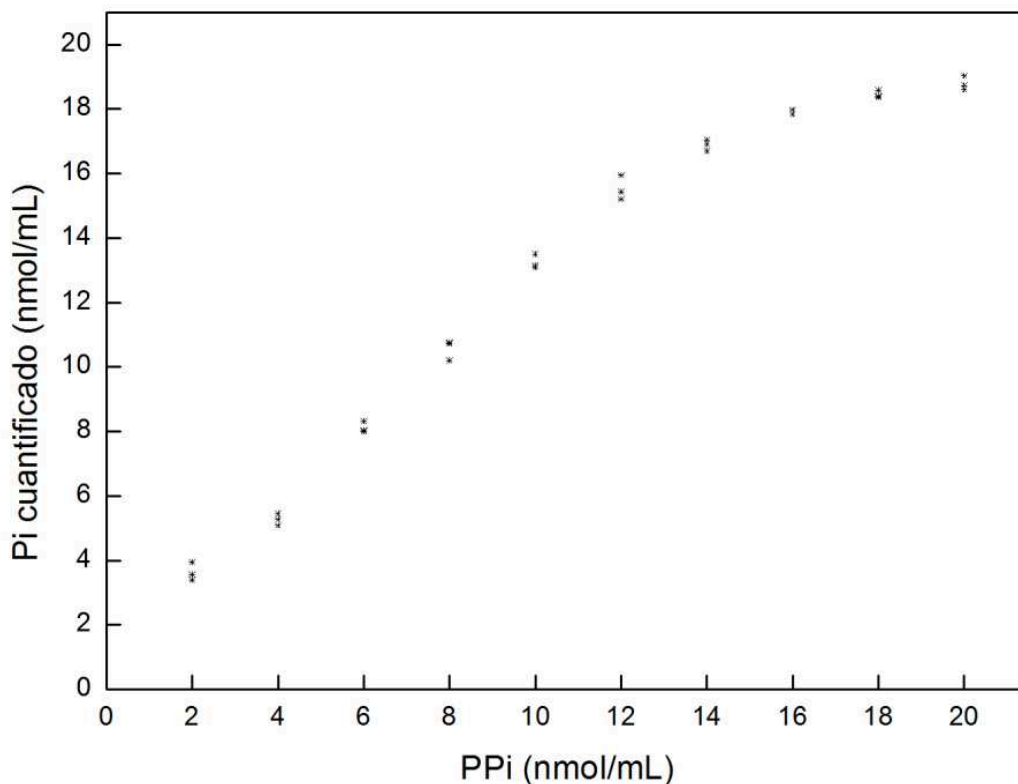
Reactivos	0	D 1/5	D 1/10	D 1/20	D 1/50	D 1/100
Solución de $MgSO_4$ ( $\mu$ L)	250	250	250	250	250	250
Solución de Crudo( $\mu$ L)	0	50	50	50	50	50
Solución de ATP ( $\mu$ L)	10	10	10	10	10	10
Solución de Pirofosfatasa alcalina ( $\mu$ L)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reactivo de color(MG-am) ( $\mu$ L)	740	690	690	690	690	690
Incubación 1 minuto						
Solución de Citrato de sodio ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100	100

Se realizaron las lecturas de las muestras en espectrofotómetro UV-vis *Shimadzu 1800* a 650 nm.

La cuantificación se realizó a partir de los parámetros obtenidos de la curva de calibrado ajustada con un modelo lineal calculando la concentración de  $P_i$  en la muestra incógnita.

## 2. Optimización del ensayo

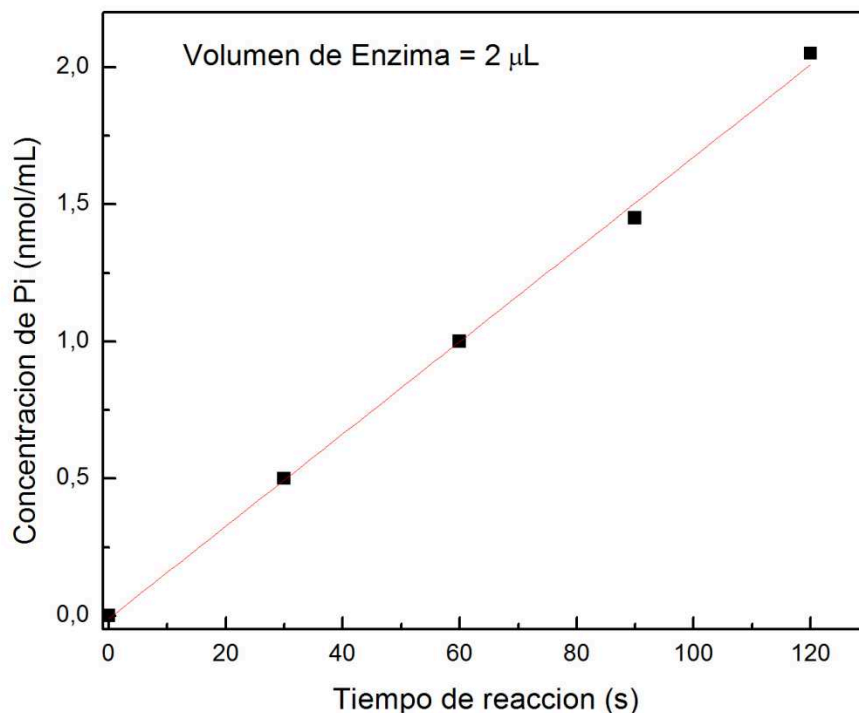
Se evaluó la linealidad en la respuesta a la concentración de pirofosfato. Se cuantificó el Pi hidrolizado a partir de PPI mediante Pirofosfatasa alcalina (PPasa) comercial para verificar la respuesta en un rango de concentración de 0 a 20 nmol/mL de pirofosfato (figura A.9).



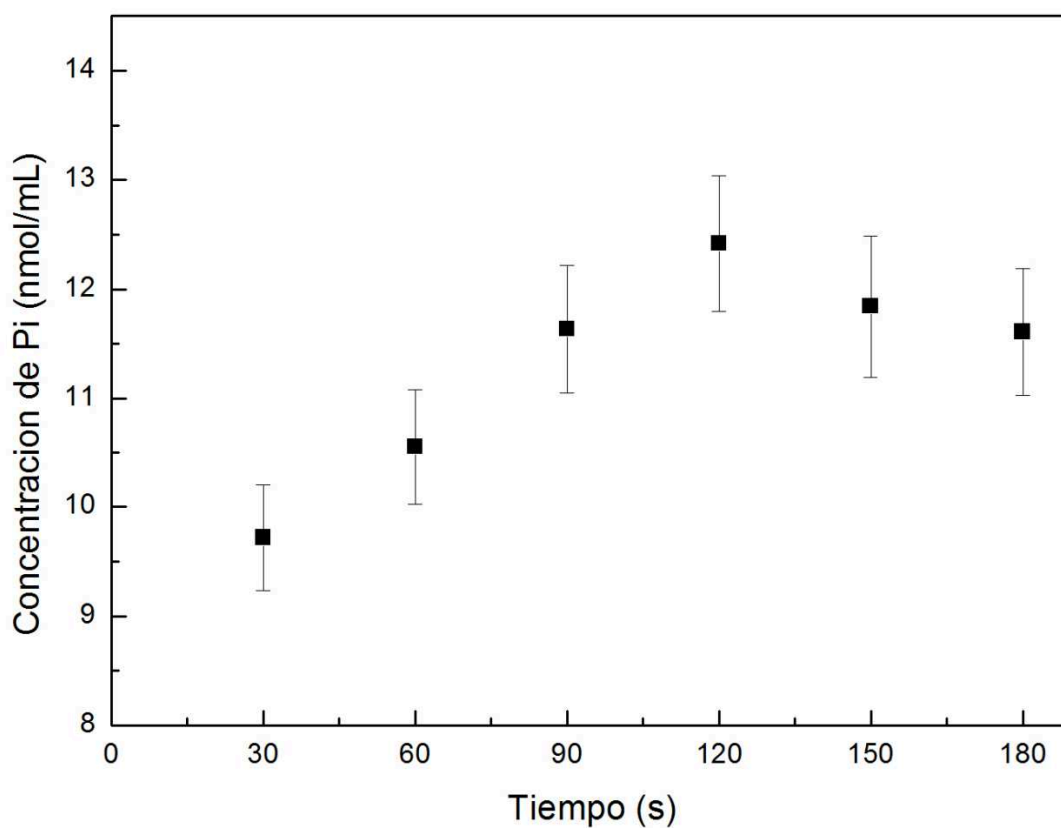
**Figura A.9.** Evaluación de la linealidad del método colorimétrico. Se cuantifica el Pi obtenido a partir de la hidrólisis del PPI producida por la enzima Pirofosfatasa alcalina.

El rango lineal correspondió a concentraciones 0-12 nmol/mL de pirofosfato. A mayores concentraciones el método no presenta correlación.

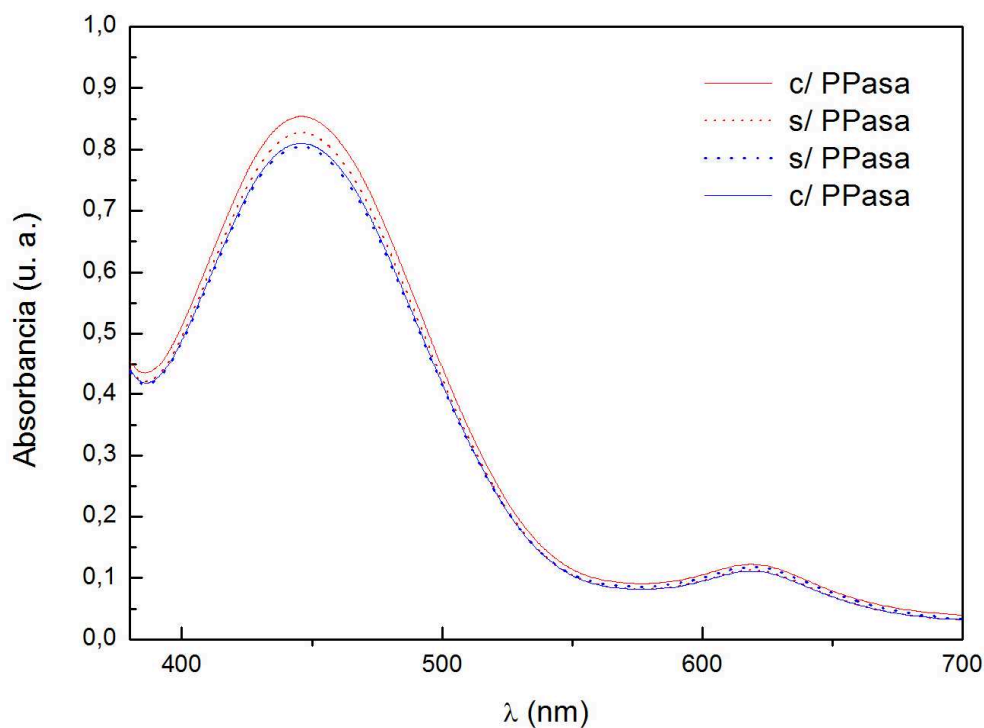
Para asegurar que la cantidad de enzima utilizada en la reacción no provoca falsos resultados se evaluó el ensayo con 3 volúmenes diferentes de ATPs comercial: 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L y 5  $\mu$ L. Con la adición de 1  $\mu$ L de enzima la respuesta obtenida se situó por debajo del límite de detección de la técnica no obteniéndose un cambio en la respuesta. En la figura A.10, se observa la dependencia de la cantidad de enzima agregada con la respuesta que es lineal para 2  $\mu$ L y 5  $\mu$ L. La respuesta lineal se obtiene agregando 2  $\mu$ L de enzima para iniciar la reacción. La adición de 5  $\mu$ L resulta en una falta de linealidad y mayores valores de Pi para idénticas condiciones de ensayo (no se presenta).



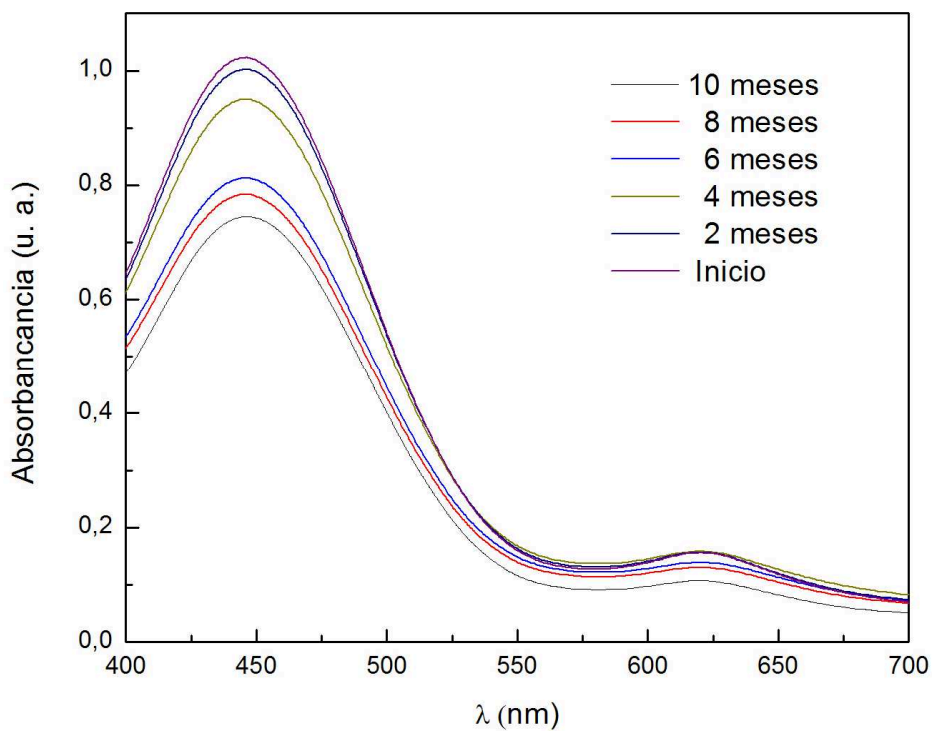
**Figura A.10.** Evaluación de la respuesta lineal. La correlación de los datos tienen una respuesta lineal:  $y = a + b \cdot x$ ;  $a = (-0,01 \pm 0,03)$ ;  $b = (0,0200 \pm 0,0004)$ ;  $R^2 = 0,99952(1)$ .



**Figura A.11.** Evaluación del tiempo de incubación de la enzima sin la adición de citrato de sodio. Se observa claramente que en 120 s se alcanza el máximo de reacción. A 150 s comienza el decaimiento.



**Figura A.12.** Estabilidad del reactivo color frente al agregado de enzima. Se evalúa que el reactivo sea inerte a la adición de enzima. Los picos de absorbancia se mantienen invariantes al agregado de enzima.



**Figura A.13.** Estabilidad del reactivo color. De mayor a menor intensidad son los tiempos en meses que se realizaron los barridos. Se observa la disminución de la absorbancia sin aparición de nuevos picos de absorción que serían indicios de degradación.



Se evaluó la respuesta de la enzima en relación al tiempo de incubación. Se expuso a la acción de la enzima la mezcla de reacción sin la adición de citrato de sodio que detiene la actividad enzimática, a diferentes intervalos de tiempo (figura A.11) y se verificó que a 120 s se obtiene el máximo de reacción.

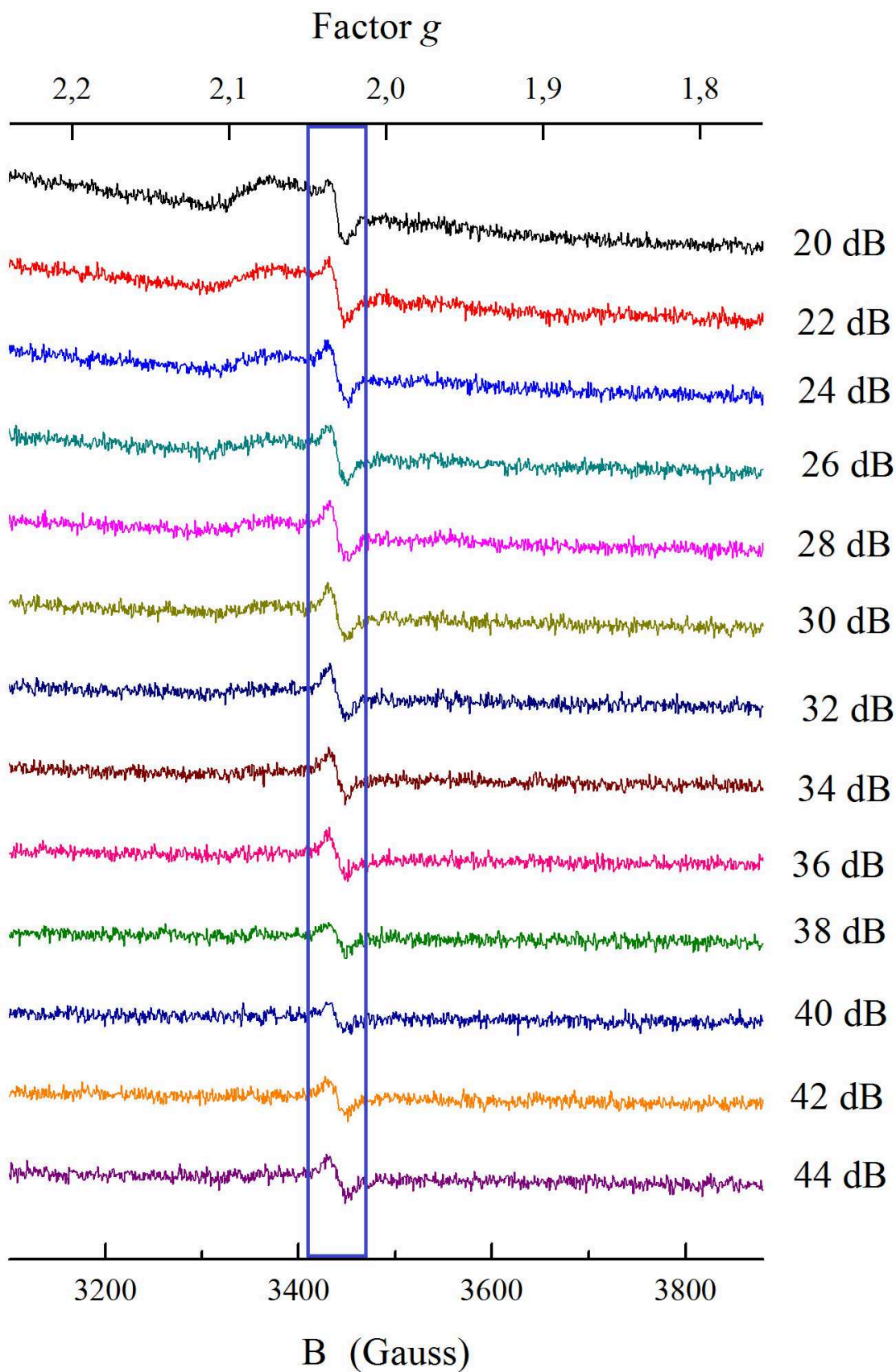
Se verificó la ausencia de interacción de la enzima con el reactivo color en función del tiempo de incubación (figura A.12) y a la cantidad de enzima adicionada donde se observó linealidad para la optimización del método. Se evaluó la estabilidad del reactivo color formado por las soluciones MG y am. A un lote preparado y almacenado en freezer a (-20)°C, se le hizo un seguimiento durante 6 meses. La figura A.13 muestra los barridos realizados donde se observa el decaimiento de la intensidad con ausencia de nuevos picos de absorbancia que indicarían productos de degradación.

## *Anexo IV*

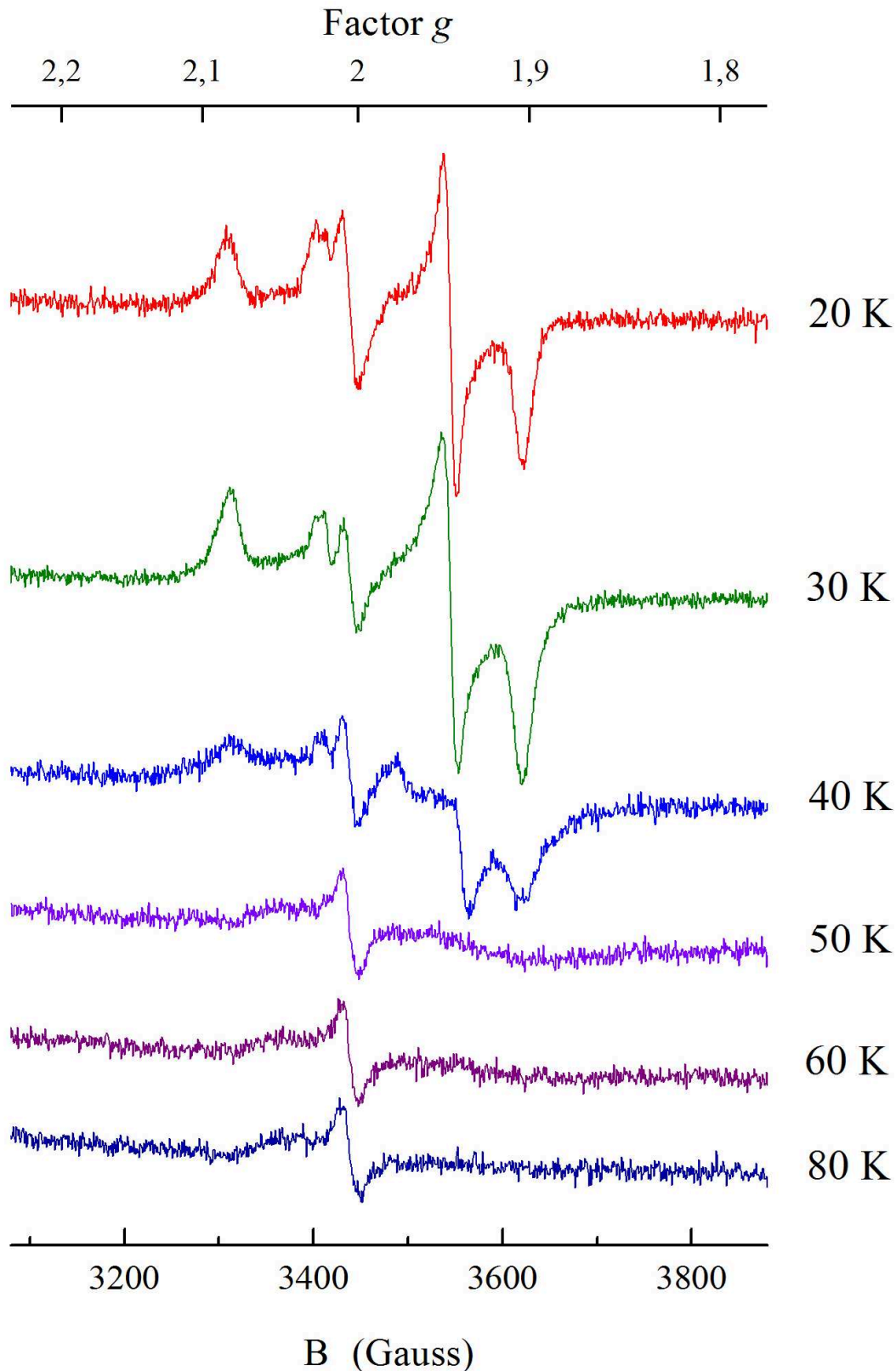
---

### **Espectros de EPR**

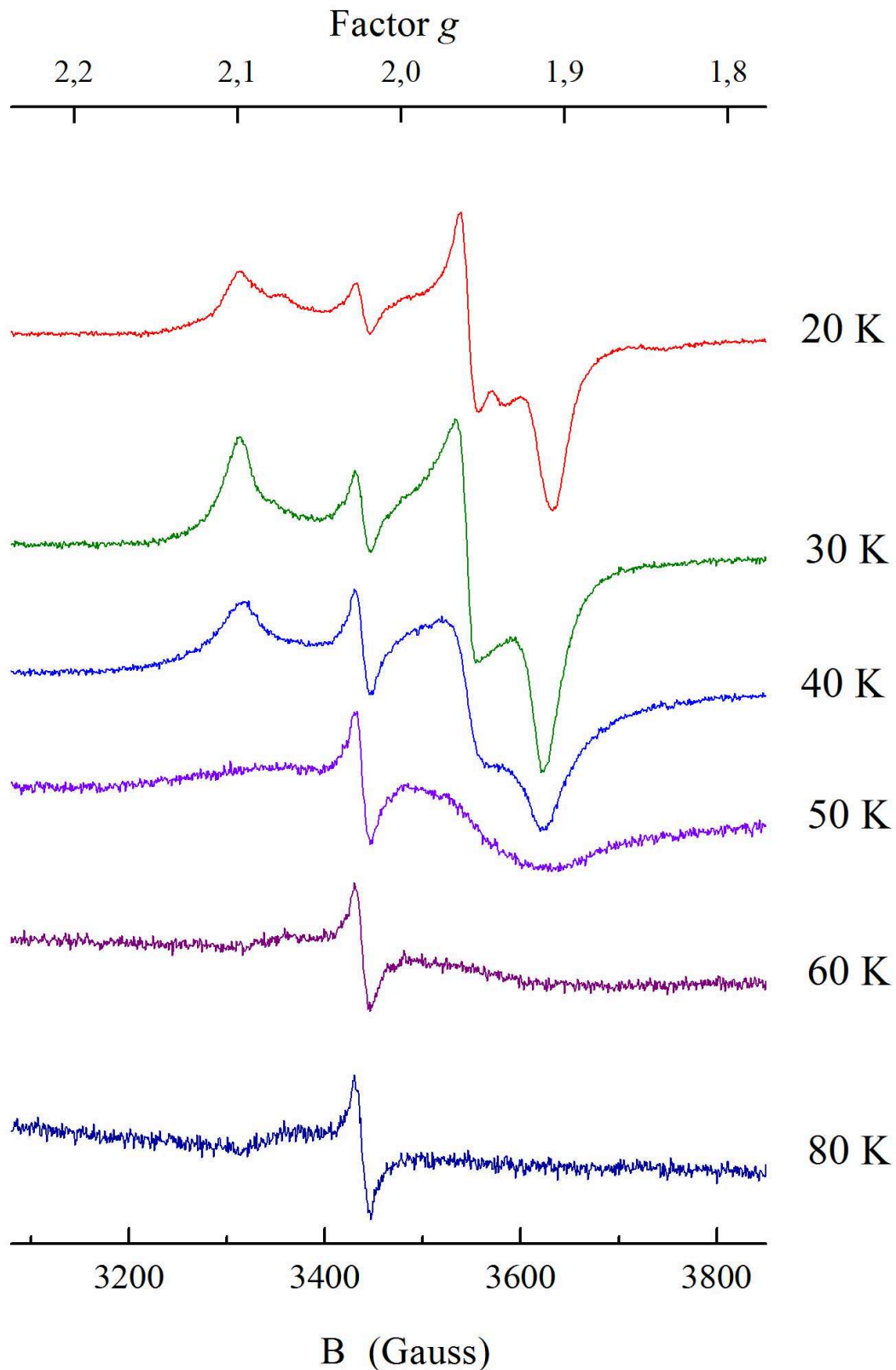
Espectros experimentales de *Dd*APSr tomados en diferentes condiciones de temperatura y estado de oxidación de la enzima



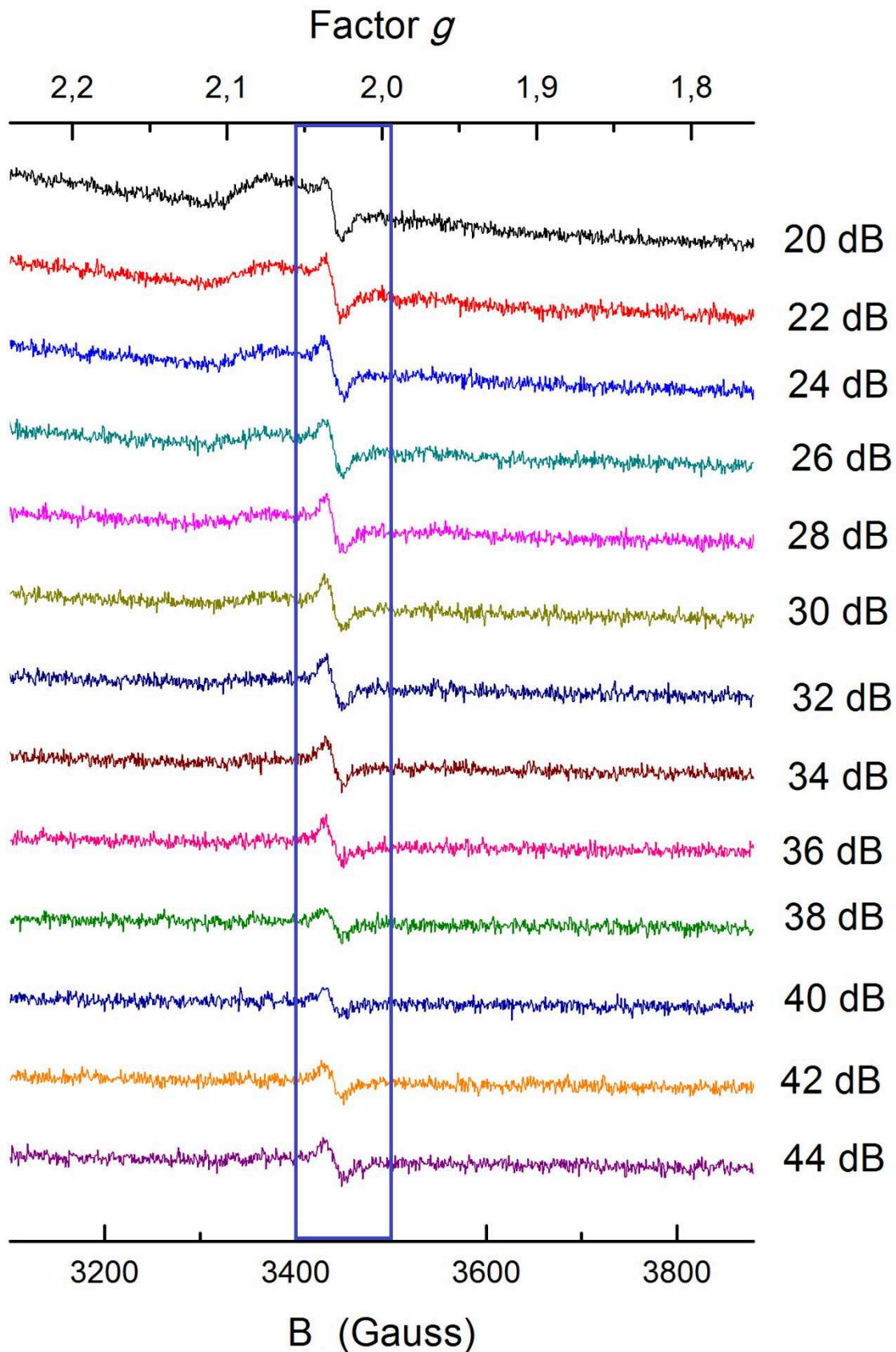
**Figura A.14.** *DdAPSR* nativa a diferentes valores de potencias (dB) a  $T = 60$  K. Sólo se observa la señal de la flavina (recuadro azul) No ha sido reportada anteriormente esta señal.



**Figura A.15.** *DdAPSR* reducida con ditionito de sodio durante 15 segundos y sometida a diferentes temperaturas a  $P = 30$  dB (0.2 mW). La evaluación de las señales paramagnéticas se realizó mediante la variación de la temperatura con que se tomó cada espectro de EPR. En la gráfica A.16 se observa *DdAPSR* que a medida que aumenta la temperatura las señales disminuyen su intensidad. A 20K se observan los 3 sitios paramagnéticos, la flavina y los dos centros [4Fe-4S]. A 80 K sólo se observa la señal de la flavina.

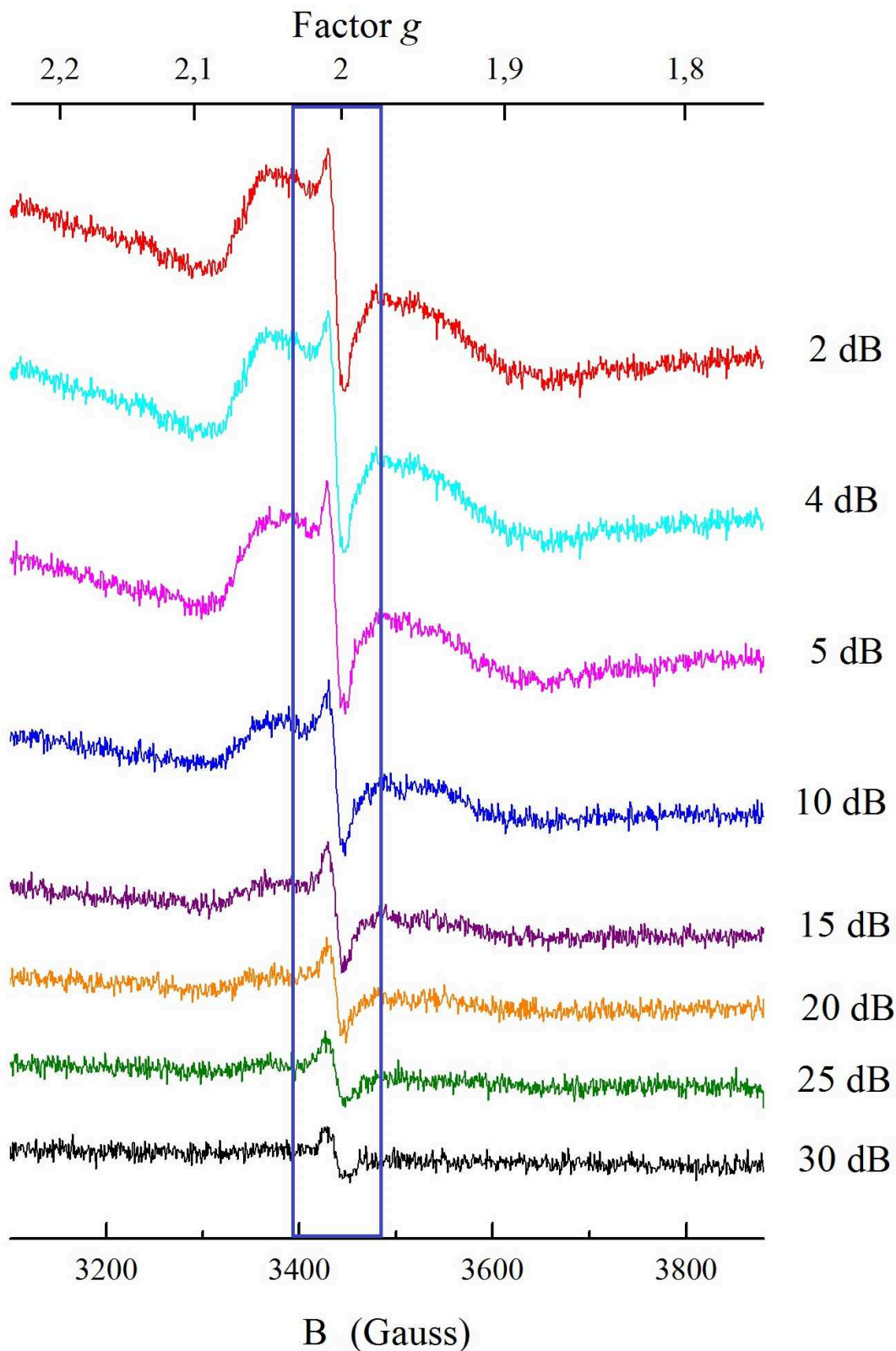


**Figura A.16.** *DdAPSr* reducida con ditionito de sodio durante 30 minutos y sometida a diferentes temperaturas a  $P = 30$  dB (0,2 mW). La evaluación de las señales paramagnéticas se realizó mediante la variación de la temperatura con que se tomó cada espectro de EPR. En la gráfica A.17 se observa que a medida que aumenta la temperatura las señales disminuyen su intensidad. A 20 K se observan los 3 sitios paramagnéticos, la flavina y los dos centros [4Fe-4S]. A 80 K sólo se observa la señal de la flavina.

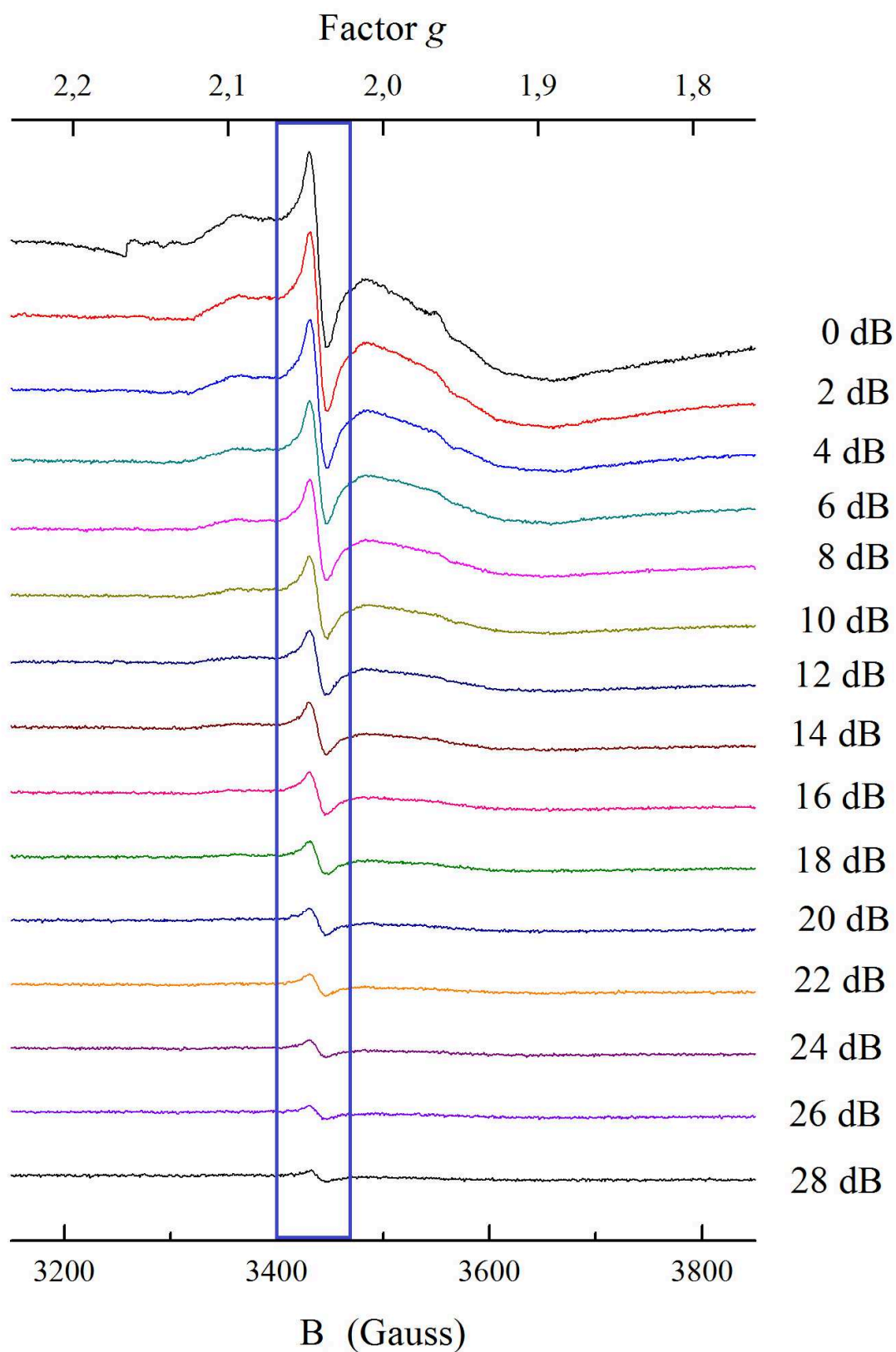


**Figura A.17.** Ensayo de saturación: DdAPSR nativa (*as purified*) sometida a diferentes potencias de microondas (dB) a T = 60K. La señal paramagnética corresponde a la flavina (recuadro azul). La intensidad de la señal se utilizó para gráfica del ensayo de saturación (Muestra 1, figura IV.25).





**Figura A.18.** Ensayo de saturación: *DdAPsR* reducida 15 segundos sometida a diferentes potencias de microondas (dB) a  $T = 60\text{K}$ . La señal paramagnética corresponde a la flavina (recuadro azul). La intensidad de la señal se utilizó para gráfica del ensayo de saturación (Muestra 2, figura IV.25).



**Figura A.19.** Ensayo de saturación: *Dd*APSR reducida 30 minutos sometida a diferentes potencias de microondas (dB) a  $T = 60\text{K}$ . La señal paramagnética corresponde a la flavina (recuadro azul). La intensidad de la señal se utilizó para gráfica del ensayo de saturación (Muestra 3, figura IV.25).



## *Anexo V*

---

### **Cálculos y espectros FTMW**

Tablas de resultados de cálculos y espectros experimentales de ácido picolínico y nicotinamida

## AV. CÁLCULOS Y ESPECTROS FTMW

### 1. Ácido Picolínico

**Tabla A.5.** Coordenadas cartesianas para los átomos de los 3 conformeros del ácido picolínico.

Conformero A					
Posición del átomo	Nº atómico	Masa atómica	x	y	Z
1	6	12	-1.726904042	-1.238411475	-0.000898911
2	7	14	-0.386492042	-1.153950475	-0.001048911
3	6	12	0.159574958	0.076050525	-0.000299911
4	6	12	-0.584139042	1.260318525	0.000901089
5	6	12	-1.976226042	1.158095525	0.000931089
6	6	12	-2.559228042	-0.114239475	0.000080089
7	1	1	-0.067449042	2.214247525	0.001498089
8	6	12	1.668683958	0.119338525	-0.000135911
9	1	1	-2.596348042	2.049881525	0.001819089
10	8	16	2.296358958	1.153234525	-0.001817911
11	8	16	2.244201958	-1.092486475	0.002034089
12	1	1	1.504472958	-1.730103475	0.002396089
13	1	1	-2.143593042	-2.242593475	-0.001575911
14	1	1	-3.637737042	-0.238482475	0.000129089
Conformero B					
Posición del átomo	Nº atómico	Masa atómica	x	y	Z
1	6	12	-1.758550337	-1.232804511	-0.001194555
2	7	14	-0.416983337	-1.192108511	-0.001368555
3	6	12	0.149253663	0.027684489	-0.000152555
4	6	12	-0.571934337	1.230083489	0.001239445
5	6	12	-1.965942337	1.163591489	0.001187445
6	6	12	-2.574716337	-0.094838511	0.000148445
7	1	1	-0.037065337	2.173701489	0.002027445
8	6	12	1.647555663	0.113955489	-0.000189555
9	1	1	-2.563523337	2.070706489	0.002200445
10	8	16	2.252917663	1.168009489	-0.002685555
11	8	16	2.250323663	-1.088553511	0.002898445
12	1	1	3.199763663	-0.895957511	0.001101445
13	1	1	-2.200241337	-2.227118511	-0.002216555
14	1	1	-3.655711337	-0.198325511	0.000156445
Conformero C					
Posición del átomo	Nº atómico	Masa atómica	x	y	Z
1	6	12	-1.829609960	-1.163354980	-0.111164694
2	7	14	-0.489081960	-1.201920980	-0.106150694
3	6	12	0.151258040	-0.023566980	-0.000647694
4	6	12	-0.499291960	1.214165020	0.108577306
5	6	12	-1.896234960	1.229873020	0.107141306
6	6	12	-2.578186960	0.015868020	-0.003244694
7	1	1	0.077958040	2.128194020	0.189126306
8	6	12	1.649600040	-0.113183980	0.020429306
9	1	1	-2.437477960	2.167757020	0.193612306
10	8	16	2.217081040	1.097060020	-0.244349694
11	8	16	2.290464040	-1.110677980	0.246420306
12	1	1	-2.328558960	-2.125641980	-0.204933694
13	1	1	-3.663394960	-0.023636980	-0.010336694
14	1	1	3.172433040	0.959835020	-0.167243694

**Tabla A.6.** Predicción de líneas tipo  $a$  sin desdoblamiento hiperfino para el conformero **A** del ácido picolínico. Salida completa de la rutina de predicción SPCAT. Las transiciones sombreadas son aquellas que corresponden a la rama R ( $\Delta L = +1$ ) con los mayores valores de intensidad y posibles de encontrar en la expansión supersónica.

$L'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$L''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	$\nu_{\text{cal}}$	Intensidad
2	1	2	1	1	1	4182.3169	-.358380E+01
8	2	6	8	2	7	4313.2991	-.414930E+01
2	2	0	3	0	3	4428.5729	-.624230E+01
2	0	2	1	0	1	4474.4598	-.339280E+01
5	1	4	5	1	5	4757.2883	-.417090E+01
2	1	1	1	1	0	4822.2155	-.346230E+01
9	4	5	10	2	8	5075.0176	-.587560E+01
5	3	2	6	1	5	5840.0007	-.579820E+01
9	2	7	9	2	8	6106.6011	-.398140E+01
3	1	3	2	1	2	6256.7919	-.300240E+01
6	1	5	6	1	6	6594.9233	-.399100E+01
3	0	3	2	0	2	6643.5429	-.289440E+01
3	2	2	2	2	1	6753.3993	-.317110E+01
3	2	1	2	2	0	6863.2557	-.315740E+01
3	1	2	2	1	1	7215.1225	-.288370E+01
10	2	8	10	2	9	8186.6690	-.385540E+01
4	1	4	3	1	3	8313.2904	-.263320E+01
8	4	4	9	2	7	8448.4304	-.560010E+01
7	1	6	7	1	7	8655.9340	-.384700E+01
4	3	1	5	1	4	8673.1147	-.583610E+01
4	0	4	3	0	3	8738.2657	-.256010E+01
4	2	3	3	2	2	8982.8648	-.269570E+01
4	3	2	3	3	1	9055.8758	-.297020E+01
4	3	1	3	3	0	9064.9344	-.296930E+01
4	2	2	3	2	1	9249.0628	-.267090E+01
4	1	3	3	1	2	9584.0290	-.251880E+01

Nomenclatura de los niveles de energía de rotación:  $L' K'_{-1} K'_{+1} L'' K''_{-1} K''_{+1}$

**Tabla A.7.** Transiciones rotacionales del conformero A del ácido picolínico. Comparación entre las frecuencias predichas mediante el modelo del rotor rígido y las experimentales obtenidas mediante CP-FTMW. El valor de la diferencia se incrementa al aumentar el valor de  $L$ .

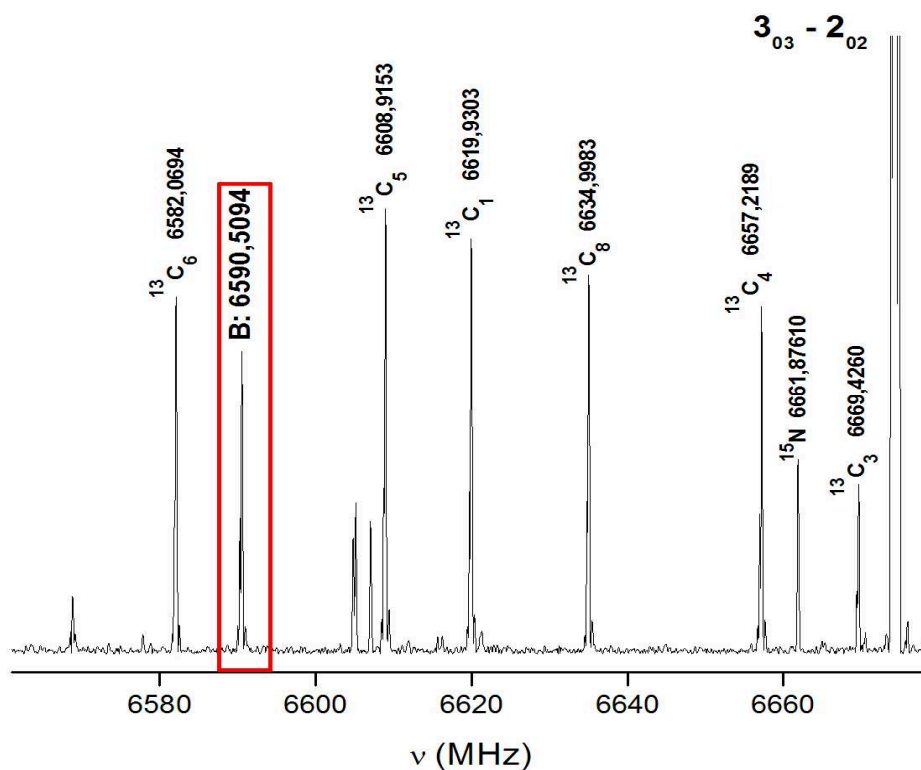
Transición		$\nu_{\text{Teórica}}$ (MHz)	$\nu_{\text{Experimental}}$ (MHz)	$\Delta\nu$ (MHz)
3 <sub>13</sub>	2 <sub>12</sub>	6256,7919	6286,5257(1)	30
3 <sub>03</sub>	2 <sub>02</sub>	6643,5429	6674,3851(1)	31
3 <sub>22</sub>	2 <sub>21</sub>	6753,3993	6783,8192(1)	30
3 <sub>21</sub>	2 <sub>20</sub>	6863,2557	6893,1103(1)	30
3 <sub>12</sub>	2 <sub>11</sub>	7215,1225	7246,3036(1)	31
4 <sub>14</sub>	3 <sub>13</sub>	8313,2904	8352,9949(1)	40
4 <sub>04</sub>	3 <sub>03</sub>	8738,2657	8779,7165(1)	41
4 <sub>23</sub>	3 <sub>22</sub>	8982,8648	9023,3803(1)	41
4 <sub>22</sub>	3 <sub>21</sub>	9249,0628	9288,5971(1)	40
4 <sub>13</sub>	3 <sub>12</sub>	9584,0290	9625,7210(1)	42

**Tabla A.8.** Ajuste para el conformero A sustituido con  $^{15}\text{N}$ . El ajuste se realizó con la rutina SPFIT del programa de Pickett. La característica de la distribución de carga esférica del núcleo de  $^{15}\text{N}$  no permite el desdoblamiento hiperfino.

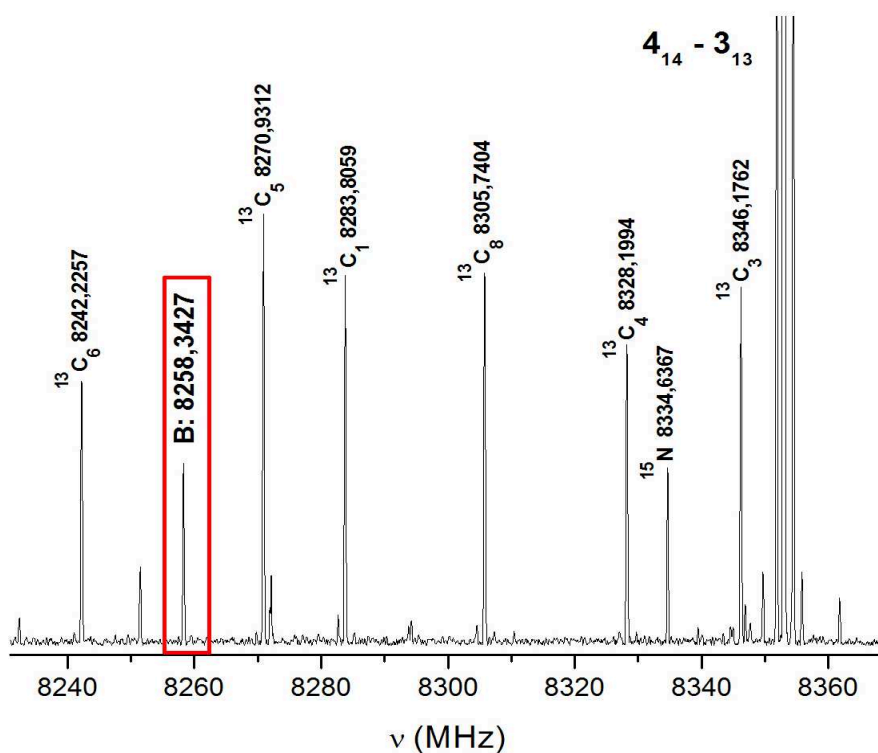
$L' K'_{-1} K'_{+1}$	$L'' K''_{-1} K''_{+1}$	$\nu$ experimental (MHz)	$\nu$ calculada (MHz)	Diferencia (MHz)
2 1 2	1 1 1	4193.56040	4193.55975	0.00065
2 0 2	1 0 1	4487.70750	4487.70652	0.00098
2 1 1	1 1 0	4838.75270	4838.75424	-0.00154
3 1 3	2 1 2	6273.28030	6273.27940	0.00090
3 0 3	2 0 2	6661.87610	6661.87538	0.00072
3 1 2	2 1 1	7239.49890	7239.49556	0.00334
4 1 4	3 1 3	8334.64580	8334.64742	-0.00162
4 1 3	3 1 2	9615.62890	9615.63124	-0.00234

**Tabla A.9.** Ajuste para el conformero A sustituido en el  $^{15}\text{N}$  realizado con la rutina SPFIT del programa de Pickett. La característica de la distribución de carga esférica del núcleo de  $^{15}\text{N}$  no permite el desdoblamiento hiperfino.

$L' K'_{-1} K'_{+1}$	$L'' K''_{-1} K''_{+1}$	$\nu$ experimental (MHz)	$\nu$ calculada (MHz)	Diferencia (MHz)
2 1 2	1 1 1	4193.56040	4193.55975	0.00065
2 0 2	1 0 1	4487.70750	4487.70652	0.00098
2 1 1	1 1 0	4838.75270	4838.75424	-0.00154
3 1 3	2 1 2	6273.28030	6273.27940	0.00090
3 0 3	2 0 2	6661.87610	6661.87538	0.00072
3 1 2	2 1 1	7239.49890	7239.49556	0.00334
4 1 4	3 1 3	8334.64580	8334.64742	-0.00162
4 1 3	3 1 2	9615.62890	9615.63124	-0.00234



**Figura A.20.** Ampliación de la transición  $3_{03} \leftarrow 2_{02}$ . Se identificó la misma transición para el conformero A sustituido isotópicamente por  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En el recuadro rojo se observa la transición correspondiente al conformero B.



**Figura A.21.** Ampliación de la transición  $4_{14} \leftarrow 3_{13}$ . Se identificó la misma transición para el conformero A sustituido isotópicamente por  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . En el recuadro rojo se observa la transición correspondiente al conformero B.

## 2. Nicotinamida

**Tabla A.10.**Coordenadas cartesianas para los átomos de los 2 confórmers de nicotinamida

Confórmero E					
Posición del átomo	N° atómico	Masa atómica	x	y	z
1	7	14	1.821718	-1.262013	-0.208297
2	6	12	2.517427	-0.134640	0.016188
3	6	12	1.923897	1.119887	0.205204
4	6	12	0.533319	1.214702	0.185942
5	6	12	-0.209219	0.046814	-0.024286
6	6	12	0.481905	-1.157315	-0.225529
7	6	12	-1.707272	0.139067	-0.045845
8	7	14	-2.365453	-1.000429	0.353483
9	8	16	-2.284515	1.147294	-0.426009
10	1	1	0.017139	2.161476	0.316367
11	1	1	3.599934	-0.240639	0.033777
12	1	1	2.544070	1.996032	0.369648
13	1	1	-0.060984	-2.075943	-0.439800
14	1	1	-3.364689	-0.907408	0.473807
15	1	1	-1.893556	-1.645866	0.967941
Confórmero Z					
Posición del átomo	N° atómico	Masa atómica	x	y	z
1	7	14	1.880800	-1.204452	0.249765
2	6	12	2.521380	-0.039575	0.042560
3	6	12	1.868373	1.171100	-0.211060
4	6	12	0.472335	1.187080	-0.247977
5	6	12	-0.210123	-0.016252	-0.031049
6	6	12	0.540093	-1.178622	0.203764
7	6	12	-1.705671	-0.125821	-0.057741
8	7	14	-2.371749	0.989464	0.401954
9	8	16	-2.276821	-1.115179	-0.490418
10	1	1	-0.070893	2.102654	-0.467361
11	1	1	3.607777	-0.081981	0.077950
12	1	1	2.444242	2.074963	-0.386479
13	1	1	0.025366	-2.123826	0.358022
14	1	1	-3.369175	0.877293	0.523877
15	1	1	-1.904428	1.589794	1.064321

**Tabla A.11.** Constantes espectroscópicas *Ab Initio* para los conformeros de nicotinamida calculadas con MP2/6-311+ + G(d,p) variando la posición del C $\alpha$ .

	Eg-5	Eg-3	E(Nda2)	Eg+3	Eg+5
A /MHz	3846.3981	3846.9722	3847.1560	3848.1722	3846.3981
B /MHz	1220.4513	1220.4304	1221.1086	1220.4504	1220.4513
C /MHz	956.6712	956.5695	956.3493	956.3210	956.6712
$\mu_T$ /D	2.393	2.361	2.272	2.267	2.236
$\mu_a$ /D	-0.292	-0.244	-0.287	-0.242	-0.234
$\mu_b$ /D	0.472	0.501	0.603	0.565	0.588
$\mu_c$ /D	-2.327	-2.294	-2.171	-2.174	-2.144
<b>N1</b>					
$\chi_{aa}$ /MHz	-0.0323	-0.0318	-0.0295	-0.0301	-0.0295
$\chi_{bb}$ /MHz	-3.2574	-3.2582	-3.2594	-3.2608	-3.2617
$\chi_{cc}$ /MHz	3.2897	-1.2531	3.2889	3.2909	3.2912
<b>N8</b>					
$\chi_{aa}$ /MHz	1.8353	1.8560	1.9355	1.8776	1.8712
$\chi_{bb}$ /MHz	0.0714	0.0706	0.3229	0.0791	0.0858
$\chi_{cc}$ /MHz	-1.9067	-1.9266	-2.2584	-1.9567	-1.9569
$E_{MP2}$ /h	-415.9466546	-415.9468733	-415.9472315	-415.9470664	-415.9469912
$\Delta E_{MP2}$ /cm <sup>-1</sup>			0		

**Tabla A.12.** Predicción de líneas tipo *b* con desdoblamiento hiperfino para el conformero  $E_g$  de nicotinamida. Se presentan parte de los resultados de la salida de la rutina de predicción SPCAT. La transición corresponde a la rama R ( $\Delta J = +1$ ).

$L'$	$K'_{-1}$	$K'_{+1}$	$L''$	$K''_{-1}$	$K''_{+1}$	$I', F'$	$I'', F''$	$v_{cal}$	Intensidad
4	1	4	3	0	3	2, 3	1, 2	10122.0331	-.598490E+01
4	1	4	3	0	3	2,3	2,4	10122.0917	-.637140E+01
4	1	4	3	0	3	2, 3	2, 3	10122.2406	-.548710E+01
4	1	4	3	0	3	1, 5	2, 4	10122.4487	-.690610E+01
4	1	4	3	0	3	2, 3	0,3	10122.8611	-.699410E+01
4	1	4	3	0	3	1, 4	2, 4	10122.9882	-.499650E+01
4	1	4	3	0	3	1, 4	2, 3	10123.1371	-.602510E+01
4	1	4	3	0	3	2, 3	1, 3	10123.2144	-.507490E+01
4	1	4	3	0	3	1, 5	2, 5	10123.2618	-.523830E+01
4	1	4	3	0	3	2, 2	1, 2	10123.3263	-.533460E+01
4	1	4	3	0	3	2, 3	2, 2	10123.3785	-.420220E+01
4	1	4	3	0	3	1, 5	1, 4	10123.4622	-.394440E+01
4	1	4	3	0	3	2, 2	2, 3	10123.5338	-.631310E+01
4	1	4	3	0	3	1, 4	0, 3	10123.7576	-.573170E+01
4	1	4	3	0	3	1, 4	2, 5	10123.8013	-.674140E+01
4	1	4	3	0	3	1, 4	1, 3	10124.1108	-.407220E+01
4	1	4	3	0	3	2, 6	2, 5	10124.3047	-.384980E+01
4	1	4	3	0	3	0, 4	0, 3	10124.3523	-.407580E+01
4	1	4	3	0	3	2, 4	2, 3	10124.3615	-.412350E+01
4	0	4	3	1	3	2, 2	2, 1	10124.4126	-.437750E+01
4	0	4	3	1	3	0, 4	1, 3	10124.7056	-.550860E+01
4	1	4	3	0	3	2, 5	2, 4	10124.9500	-.394860E+01
4	1	4	3	0	3	2, 4	0, 3	10124.9820	-.506380E+01
4	1	4	3	0	3	2, 4	2, 5	10125.0257	-.655080E+01
4	1	4	3	0	3	1, 3	1, 2	10125.1416	-.419240E+01
4	1	4	3	0	3	1,3	2,4	10125.2002	-.692520E+01
4	1	4	3	0	3	2, 4	1, 4	10125.2261	-.499950E+01
4	1	4	3	0	3	2, 4	1, 3	10125.3353	-.588930E+01
4	1	4	3	0	3	1, 3	2, 3	10125.3491	-.509610E+01
4	1	4	3	0	3	2, 5	2, 5	10125.7630	-.520910E+01
4	1	4	3	0	3	2, 5	1, 4	10125.9635	-.608090E+01
4	1	4	3	0	3	1, 3	0, 3	10125.9696	-.549280E+01
4	1	4	3	0	3	1, 3	1, 4	10126.2137	-.645510E+01



## *Bibliografía*

---

Adrait, A.; Jacquamet, L.; Le Pape, L.; Gonzalez De Peredo, A.; Aberdam, D.; Hazemann, J.-L.; Latour, J.-M.; Michaud-Soret, I. (1999) *Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted fur (ferric uptake regulation) protein from Escherichia coli*. *Biochem.*: 19, 6248-6260.

Abraham, A. (1961) *The principles of nuclear magnetism*. Clarendon Press, Oxford, UK.

Aliev, Z. G.; Atovmyan, L. O.; Saratovskikh, E. A.; Krinichnii, V. I.; Kartsev, V. G. (1988) *Synthesis, structure, and spectral characteristics of copper complexes with picolinic acid derivatives*. *Phys. Chem. Bull. Acad. Sciences USSR*: 37, 11, 2246-2252.

Alonso, J. L.; Lorenzo, F. J.; López, J. C.; Lesarri, A.; Mata, S.; Dreizler, H. (1997) *Construction of a molecular beam Fourier transform microwave spectrometer used to study the 2,5-dihydrofuran-argon van der Waals complex*. *Chem. Phys.*: 218, 3, 267-276.

Alonso, J. L.; Cocinero, E. J.; Lesarri, A.; Sanz, M. E.; López, J. C. (2006) *The Glycine–Water Complex*. *Ang. Chem.*: 118, 21, 3551–3554.

Alonso, J. L.; Pérez, C.; Sanz, M. E.; López, J. C.; Blanco, S. (2009) *Seven conformers of L-threonine in the gas phase: a LA-MB-FTMW study*. *Phys. Chem. Chem. Phys.*: 11, 617-627.

Anderson, P. W.; Weiss, P. R. (1953) *Exchange Narrowing in Paramagnetic Resonance*. *Rev. Mod. Phys.* 25, 269-275.

Andrade, S. L. A.; Brondino, C. D.; Feio, M. J.; Moura, I.; Moura J. J. G. (2000) *Aldehyde oxidoreductase activity in Desulfovibrio alaskensis NCIMB 13491 EPR assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site*. *Eur. J. Biochem.*: 267, 2054-2061.

Antolini, L.; Marcotrigiano, G.; Menabue, L.; Pellacani, G. C.; Saladini, M.; Sola M. (1985) *Coordination Behavior of L-Glutamic Acid: Spectroscopic and Structural Properties of (L-Glutamato) (imidazole) copper(II), (L-Glutamato) (2,2'-bipyridine) copper (II), and Aqua (L-glutamato) (1,10-phenanthroline) copper (II) Trihydrate Complexes*. *Inorg. Chem.*: 24, 3621-3626.

Ashfold, M. N. R.; Claeysens, F.; Fuge, G. M.; Henley, S. J. (2004) *Pulsed laser ablation and deposition of thin films*. *Chem. Soc. Rev.*: 33, 23-31.

Atkins, P.; Overton, T.; Rourke, J.; Weller, M.; Armstrong, F. (2006) *Cap. 26, Biological Inorganic Chemistry. Shriver & Atkins Inorganic Chemistry 4<sup>th</sup> Edition*. Oxford University Press, New York. USA.

Aubert, C.; Leroy, G.; Bianco, P.; Forest, E.; Bruschi, M.; Dolla, A. (1998) *Characterization of the cytochromes C from Desulfovibrio desulfuricans G201*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: 242, 1, 213-218.

- Baker, B. J.; Banfield J. F. (2003) *Microbial communities in acid mine drainage*. FEMS Microb. Ecol.: 44, 2, 139-152.
- Balle, T. J.; Flygare, W. H. (1981) *Fabry-Perot cavity pulsed Fourier transform microwave spectrometer with a pulsed nozzle particle source*. Rev. Sci. Instrum.: 1981, 52, 1, 33-45.
- Ballhausen, C. J. (1962) *Introduction to ligand field theory*. McGraw-Hill 1 edition
- Bandurski, R. S.; Wilson, L. G.; Squires, C. L. (1956) *The Mechanism of "Active Sulfate" Formation*. J. Am. Chem. Soc.: 78, 24, 6408-6409.
- Baneyx, F. (1999) *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Cur. Op. Biotech.: 10, 5, 411-421.
- Bayari, S.; Ahmet, A.; Yurdakul, Ş. (2003) *Coordination behaviour of nicotinamide: An infrared spectroscopic study*. J. Mol. Struc.: 655,1,163-170.
- Beynon, J. D.; MacRae, I. J.; Huston, S. L.; Nelson, D. C.; Segel, I. H.; Fisher, A. J. (2001) *Crystal structure of ATP sulfurylase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm Riftia pachyptila*. Biochem.: 40, 48, 14509-14517.
- Biswas, C.; Drew, M. G. B.; Ruiz, E.; Estrader, M.; Diaz, C.; Ghosh, A. (2010) *Synthesis, crystal structure and magnetic properties of three unprecedented tri-nuclear and one very rare tetra-nuclear copper(ii) Schiff-base complexes supported by mixed azido/phenoxo/nitrato or acetato bridges*. Dalton Trans.: 39, 32, 7474-7484.
- Blanco, S.; López, J. C.; Mata, S.; Alonso, J. L. (2010) *Conformations of gamma-Aminobutyric Acid (GABA): The Role of the n- $\pi$  interaction*. Angew. Chem. Int. Ed.: 49, 9187-9192.
- Botkin, D. B.; Keller, E. A. (2011) *Environmental Science: Earth as a Living Planet*, 9th Edition. Wiley
- Bramlett, R. N.; Peck Jr., H. D. (1975) *Some physical and kinetic properties of adenylyl sulfate reductase from Desulfovibrio vulgaris*. J. Biol. Chem.: 250, 8, 2979-2986.
- Born, M.; Oppenheimer, R. (1927) *Zur Quantentheorie der Molekeln* Ann. Physik, 84, 457.
- Brondino, C. D.; Casado, N. M. C.; Passeggi, M. C. C.; Calvo, R. (1993) *Exchange Interaction between Copper (II) Ions through Glutamic Acid Molecules*. Inorg. Chem.: 32, 2078-2084.
- Brondino, C. D.; Calvo, R.; Atria, A. M.; Spodine, E.; Peña, O. (1995) *Magnetic interactions in aqua (L-aspartato)-(2,2'-bipyridine) copper (II) trihydrate*. Inorg. Chim. Acta: 228, 261-266.
- Brondino, C. D.; Calvo, R.; Baran, E. J. (1997) Chem. Phys. Lett., 271, 51-54.

- Brondino, C. D.; Calvo, R.; Atria, A. M.; Spodine, E.; Nascimento, O. R.; Peña, O. (1997) *Magnetic Interactions in the Copper Complex (L-Aspartato)(1,10-phenanthroline) copper (II) Hydrate. An Exchange-Coupled Extended System with Two Dissimilar Copper Ions*. Inorg. Chem.: 36, 14, 3183-3189.
- Brondino, C. D.; Rivas, M. G.; Romão, M. J.; Moura, J. J. G.; Moura, I. (2006a) *Structural and electron paramagnetic resonance (EPR) studies of mononuclear molybdenum enzymes from sulfate-reducing bacteria*. Acc. Chem. Res.: 39, 10, 788-796.
- Brondino, C. D.; Romão, M. J.; Moura, I.; Moura, J. J. G. (2006b) *Molybdenum and tungsten enzymes: The xanthine oxidase family*. Cur. Op. Chem. Biol.: 10, 2, 109-114.
- Brown, D. A.; Errington, W.; Glass, W. K.; Haase, W.; Kemp, T. J.; Nimir, H.; Ostrovsky, S. M.; Werner, R. (2001) *Magnetic, spectroscopic, and structural studies of dicobalthydroxamates and model hydrolases*. Inorg. Chem., 40, 23, 5962-5971.
- Brown, G. G.; Dian, B. C.; Douglass, K. O.; Geyer, S. M.; Shipman, S. T.; Pate, B. H. (2008) *A broadband Fourier transform microwave spectrometer based on chirped pulse excitation*. Rev Sci Instrum.: 79, 5, 53103.
- Butcher, S. S.; Charlson, R.J.; Orians, G. H.; Wolfe, G.V. (1992) *Global Biogeochemical Cycles*. xvi + 379 pp.
- Calvo, R. (2007) *EPR Measurements of Weak Exchange Interactions Coupling Unpaired Spins in Model Compounds*. Mag. Res.:31, 271-299.
- Carroll, K. S.; Gao, H.; Chen, H.; Stout, C. D.; Leary, J. A.; Bertozzi, C. R. (2005) *A Conserved Mechanism for Sulfonucleotide Reduction*. PLoS Biol.: 3, 8, 250, 1418-1435.
- Carvalho, E.; Aasa, R.; Göthe, P.-O. (1996) *Electron paramagnetic resonance studies of cobalt-substituted angiotensin I-converting enzyme*. J. Inorg. Biochem.: 62, 2, 1, 147-153.
- Chiang, Y.-L.; Hsieh, Y.-C.; Fang, J.-Y.; Liu, E.-H.; Huang, Y.-C.; Chuankhayan, P.; Jeyakanthan, J.; Liu, M.-Y.; Chan, S. I.; Chen, C.-J. (2009) *Crystal Structure of Adenylylsulfate Reductase from Desulfovibrio gigas Suggests a Potential Self-Regulation Mechanism Involving the C Terminus of the  $\beta$ -Subunit*. J. Bact.: 191, 24, 7597-7608.
- Cocinero, E. J.; Lesarri, A.; Sanz, M. E.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2006) *Conformations of  $\alpha$ -aminobutyric acid in gas-phase*. Chem. Phys. Chem.: 7, 1481-1487.
- Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. (1995) *A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules*. J. Am. Chem. Soc.: 117, 19, 5179-5197.
- Crichton, R. R. (2008) *Biological Inorganic Chemistry: An Introduction*. 1<sup>st</sup> Edition. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands. p. 1-2.

Cotton, F. A.; Wilkinson, G. (1988) *Advanced Inorganic Chemistry*. 5<sup>th</sup> Edition. Ed John Wiley & Sons, Inc. USA.

Dahl, C.; Trüper, H. G. (1994) *Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic sulfur bacteria*. Meth. Enzym.: 400-421.

Deisenhofer, J.; Michel, H. (1989) *Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodospseudomonas viridis*. EMBO J.: 8, 8, 2149-2170.

Devanathan, M.; Stachurski, Z. (1962) *Proceeding of the Royal Society of London* Vol. 270 (1962), p. 90.

Dewar, M. J. S.; Merz, K. M. (1985) *The development and use of Quantum molecular models .77. MNDO calculations for the dehydrocyclooctatetraenes*, J. Am. Chem. Soc.: 107, 6175-6179.

El-Sonbati, A. Z.; El-Bindary, A. A.; Mabrouk, E. -S. M.; Ahmed, R. M. (2001) *Spectral studies on metal-ligand bonding of novel rhodanine azodye sulpha drugs*. Spect. Act. A: Mol. and Biom. Spectr.: 57, 9, 1751-1757.

Falkowski, P. G.; Fenchel T.; Delong, E. F. (2008) *The Microbial Engines That Drive Earth's Biogeochemical Cycles*. Scien.: 320, 1034-1039.

Fang, J. -Y.; Chiang, Y. -L.; Hsieh, Y. -C.; Wang, V. C. -C.; Huang, Y. -C.; Chuankhayan, P.; Yang, M. -C.; Liu, M. -Y.; Chan, S. I.; Chen, C. -J. (2011) *Crystallization of Adenylylsulfate Reductase from Desulfovibrio gigas: A Strategy Based on Controlled Protein Oligomerization*. Cryst. Grow. Des.: 11, 6, 2127-2134.

Filippelli, G. M. (2009) *Phosphorus Cycle*. Encyc. Earth Scien.: 780-783.

Foster, B. A.; Thomas, S. M.; Mahr, J. A.; Renosto, F.; Patel, H. C.; Segel, I. H. (1994) *Cloning and sequencing of ATP sulfurylase from Penicillium chrysogenum. Identification of a likely allosteric domain*. J. Biol. Chem.: 269, 31, 19777-19786.

Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. (2001) *"The Biological Chemistry of the Elements. The inorganic chemistry of life"*, 2<sup>nd</sup> Ed. Clarendon Press, Oxford.

Fraústo da Silva, J. J. R.; Williams, R. J. P. (2003) *Evolution was Chemically Constrained*. J. Theor. Biol.: 220, 3, 323-343.

Frey, P. A.; Hegeman, A. D. (2007) *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Hardcover Ed. Oxford University. p 1-3.

Friedrich, C.; Rother, D.; Bardischewsky, F.; Quentmeier, A.; Fischer, J. (2001) *Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by Bacteria: Emergence of a common Mechanism?* Appl. Environ. Microbiol.: 67, 7, 2873-2882.

Fritz, G.; Büchert, T.; Huber, H.; Stetter, K. O.; Kroneck, P. M. H. (2000) *Adenylylsulfate reductases from archaea and bacteria are 1:1  $\alpha\beta$ -heterodimeric*

*iron-sulfur flavoenzymes – high similarity of molecular properties emphasizes their central role in sulfur metabolism.* FEBS Lett.: 473, 1, 63-66.

Fritz, G.; Roth, A.; Schiffer, A.; Buchert, T.; Bourenkov, G.; Bartunik, H. D.; Huber, H.; Stetter, K. O.; Kroneck, P. M. H.; Ermler, U. (2002) *Structure of adenylylsulfate reductase from the hyperthermophilic Archaeoglobus fulgidus at 1.6-Å resolution.* PNAS: 99,1836-1841.

Furusaka, C. (1961) *Sulphate transport and metabolism Desulphovibrio desulphuricans.* Nature: 192, 4801, 427-429.

Fusari, C.; Demonte, A. M.; Figueroa, C. M.; Aleanzi, M.; Iglesias, A. A. (2006) *A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase.* Anal. Biochem.: 352, 1, 145-147.

Galloway, J. M.; Dentener, F. J.; Capone, D. G.; Boyer, E. W.; Howarth, R. W.; Seitzinger, S. P.; Asner, G. P.; Cleveland, C. C.; Green, P. A.; Holland, E. A.; Karl, D. M.; Michaels, A. F.; Porter, J. H.; Townsend, A. R.; Vöosmarty, C. J. (2004) *Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future.* Biogeochem.: 70, 2, 153-226.

Gatteschi, D.; Caneschi, A.; Pardi, L.; Sessoli, R. (1994) *Large clusters of metal ions: the transition from molecular to bulk magnets.* Science: 265, 5175, 1054-1058.

Gavel, O. Y.; Bursakov, S. A.; Calvete, J. J.; George, G. N.; Moura, J. J. G.; Moura, I. (1998) *ATP sulfurylases from sulfate-reducing bacteria of the genus Desulfovibrio. A novel metalloprotein containing cobalt and zinc.* Biochem.: 37, 46, 16225-16232.

Gay, S. C.; Fribourgh, J. L.; Donohoue, P. D.; Segel, I. H.; Fisher, A. J. (2009) *Kinetic properties of ATP sulfurylase and APS kinase from Thiobacillus denitrificans.* Arch. Biochem. Biophys.: 489, 1-2, 110-117.

Germán-Acacio, J. M.; Hernández-Ortega, S.; Aakeröy, C. B.; Valdés-Martínez, J. (2009) *Using Lewis acidity differences in chelating ligands to control molecular structure and supramolecular assembly of Cu(II) complexes.* Inorg. Chim. Acta: 362, 4087-4090.

González, P. J.; Barrera, G. I.; Rizzi, A. C.; Moura, J. J. G.; Passeggi, M. C. G.; Brondino, C. D. (2009) *EPR studies of the Mo-enzyme aldehyde oxidoreductase from Desulfovibrio gigas: An application of the Bloch–Wangness–Redfield theory to a system containing weakly-coupled paramagnetic redox centers with different relaxation rates.* J. Inorg. Biochem.: 103, 1342-1346.

Gordy, W.; Cook, R. L. (1984) *Techniques of Chemistry, Microwave Molecular Spectra.* Hardcover Wiley-Interscience; Volume 18 ed.

Grant, R. S.; Coggan, S. E.; Smythe, G. A. (2009) *The physiological action of picolinic acid in the human brain.* Int. J. Tryp. Res., 2, 71-79.

- Grabow, J. U.; Stahl, W.; Dreizler, H. (1996) *A multioctave coaxially oriented beam-resonator arrangement Fourier-transform microwave spectrometer*. Rev. Sci. Instrum.: 67, 4072.
- Gregersen, L. H.; Bryant, D. A.; Frigaard, N. U. (2011) *Mechanisms and Evolution of Oxidative Sulfur Metabolism in Green Sulfur Bacteria*. Front. Microbiol.: 2, 116.
- Harjes, S.; Bayer, P.; Scheidig, A. J. (2005) *The crystal structure of human PAPS synthetase I reveals asymmetry in substrate binding*. J. Mol. Biol.: 347, 3, 623-635.
- Hawes, C. S.; Nicholas, D. J. (1973) *Adenosine 5'-triphosphate sulphurylase from Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J.: 133, 3, 541-550.
- Hitchman, M. A.; Kwan, L.; Engelhardt, L. M.; White, A. H. J. (1987) *Electron spin resonance and electronic spectra and crystal and molecular structures of copper(II) amino acid complexes* Chem. Soc. Dalton Trans.: 457-465.
- Hoffmann, S. K.; Grosjar, J.; Szezepaniak, L. S. (1988) *Weak exchange interaction in cis-Cu(NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O single crystal: EPR studies*. Phys. Rev. 37, 7331.
- Hollas, J. M. (2004) *Modern Spectroscopy*. 4th Edition Copyright by John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England.
- Jellinek, H. H. G.; Gordon, A. (1949) *The Hydrolysis of Nicotinamide in Hydrochloric Acid Solutions*. J. Phys. Chem.: 53, 7, 996-1009.
- Jellinek, H. H. G.; Wayne, M. G. (1951) *Nicotinamide; ultraviolet absorption spectra and dissociation constants*. J. Phys. Colloid Chem.: 55, 2, 173-180.
- Jellinek, H. H. G.; Urwin, J. R. (1954) *Ultraviolet Absorption Spectra and Dissociation Constants of Picolinic, Isonicotinic Acids and their Amides*. J. Phys. Chem.: 58, 7, 548-550.
- Johnson, M. K. (1998) *Iron-sulfur proteins: New roles for old clusters*. Curr. Opin. Chem. Biol.: 2, 2, 173-181.
- Karlin, K. D. (1993) *Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models*. Science: 261, 5122, 701-708.
- Klotz, M. G.; Bryant, D. A.; Hanson, T. E. (2011) *The microbial sulfur cycle*. Front. Microb.: 2, 241.
- Koczoń, P.; Dobrowolski, J. Cz.; Lewandowski, W.; Mazurek, A.P. (2003) *Experimental and theoretical IR and Raman spectra of picolinic, nicotinic and isonicotinic acids*. J. Mol. Struct.: 655, 1, 89-95.
- Kopriva, S.; Büchert, T.; Fritz, G.; Suter, M.; Benda, R.; Schünemann, V.; Koprivova, A.; Schürmann, P.; Trautwein, A. X.; Kroneck, P. M.; Brunold, C. (2002) *The presence of an iron-sulfur cluster in adenosine 5'-phosphosulfate reductase separates organisms utilizing adenosine 5'-phosphosulfate and phosphoadenosine 5'-phosphosulfate for sulfate assimilation*. J. Biol. Chem.: 277, 24, 21786-21791.

- Krishnan, R.; Pople, J. A. (1978) *Approximate fourth-order perturbation theory of the electron correlation energy*. Int. J. Quant. Chem.: 14, 1, 91-100.
- Kuo, L. C.; Makinen, M. W. (1985) *Ground term splitting of high-spin  $Co^{2+}$  as a probe of coordination structure. 2. The ligand environment of the active site metal ion of carboxypeptidase A in ester hydrolysis*. J. Am. Chem. Soc.: 107, 18, 5255-5261.
- Lalor, D. J.; Schnyder, T.; Saridakis, V.; Pilloff, D. E.; Dong, A.; Tang, H.; Leyh, T.S.; Pai, E. F. (2003) *Structural and functional analysis of a truncated form of Saccharomyces cerevisiae ATP sulfurylase: C-terminal domain essential for oligomer formation but not for activity*. J. Prot. Eng.: 16, 1071-1079.
- Lampreia, J.; Moura, I.; Teixeira, M.; Peck, H. D. Jr; Legall, J.; Huynh, B. H.; Moura, J. J. (1990) *The active centers of adenylylsulfate reductase from Desulfovibrio gigas*. Eur. J. Biochem.: 188, 3, 653-664.
- Lampreia, J.; Pereira, A. S.; Moura, J. J. G. (1994) *Adenylylsulfate reductases from sulfate-reducing bacteria*. Met. Enzym.: 243, 241-260.
- Larrabee, J. A.; Alessi, C. M.; Asiedu, E. T.; Cook, J. O.; Hoerning, K. R.; Klingler, L. J.; Okin, G. S.; Santee, S. G.; Volkert, T. L. (1997) *Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy as a Probe of Geometric and Electronic Structure of Cobalt(II)-Substituted Proteins: Ground-State Zero-Field Splitting as a Coordination Number Indicator*. J. Am. Chem. Soc., 119, 18, 4182-4196.
- Latt, S. A.; Vallee, B. L. (1971) *Spectral properties of cobalt carboxypeptidase. Effects of substrates and inhibitors*. Biochem.: 10, 23, 4263-4270.
- Lehn, J.-M. (1988) *Supramolecular Chemistry - Scope and Perspectives Molecules, Supramolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture)*. Ang. Chem. Ed. Int.: 27, 1, 89-112.
- Lesarri, A.; Mata, S.; Cocinero, E. J.; Blanco, S.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2002) *The Structure of Neutral Proline*. Ang. Chem.: 114, 24, 4867-4870.
- Lesarri, A.; Cocinero, E. J.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2004) *The Shape of Neutral Valine*. Ang. Chem. Int. Ed. 43, 5, 605-610.
- Leyh, T. S.; Taylor, J. C.; Markham, G. D. (1988) *The sulfate activation locus of Escherichia coli K12: Cloning, genetic, and enzymatic characterization*. J. Biol. Chem.: 263, 5, 2409-2416.
- Leyh, T. S. (1993) *The physical biochemistry and molecular genetics of sulfate activation*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.: 28, 6, 515-542.
- Levy, H. A.; Corey, R. B. (1941). *The crystal structure of dl-alanine*. J. Am. Chem. Soc., 63, 8, 2095-2108.
- Lippard, S. J.; Berg, J. M. (1994) *Principles of Bioinorganic Chemistry*. University Science Books: Mill Valley, CA, USA.



- López, J. C.; Alonso, J. L.; Peña, I. Vaquero, V. (2010). *Hydrogen bonding and structure of uracil-water and thymine-water complexes*. Phys. Chem. Chem. Phys.: 12, 42, 14128-14134.
- López-Cortés, A.; Bursakov, S.; Figueiredo, A.; Thapper, A. E.; Todorovic, S.; Moura, J. J. G.; Ollivier, B.; Moura, I.; Fauque, G. (2005) *Purification and preliminary characterization of tetraheme cytochrome c<sub>3</sub> and adenylylsulfate reductase from the peptidolytic sulfate-reducing bacterium Desulfovibrio aminophilus DSM 12254*. Bioinorg. Chem. App.: 1, 2, 81-91.
- Lovley, D. R. (2002) *Dissimilatory Metal Reduction: from Early Life to Bioremediation. Diverse bacteria and Archea use a novel form of respiration-oxidizing hydrogen or organic compounds with the reduction of metals*. ASM News: 68, 5, 231-237.
- Lovley, D. R. (2003) *Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation*. Nat. Rev. Microb.: 1, 35-44.
- Lunn, J. E.; Droux, M.; Martin, J.; Douce, R. (1990) *Localization of ATP Sulfurylase and O-Acetylserine(thiol)lyase in Spinach Leaves*. Plant Physiol.: 94, 1345-1352.
- Makinen, M. W.; Yim, M. B. (1981) *Coordination environment of the active-site metal ion of liver alcohol dehydrogenase*. PNAS: 78, 10, 6221-6225.
- Makinen, M. W.; Kuo, L. C.; Yim, M. B.; Wells, G. B.; Fukuyama, J. M.; Kim, J. E. (1985) *Ground term splitting of high-spin cobalt(2+) ion as a probe of coordination structure. 1. Dependence of the splitting on coordination geometry*. J. Am. Chem. Soc.: 107, 5245-5255.
- Maret, W.; Vallee, B. L. (1993) *Cobalt as probe and label of proteins (Review)*. Meth. Enzym.: 226, 52-70.
- Mata, S.; Vaquero, V.; Cabezas, C.; Peña, I.; Pérez, C.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2009) *Observation of two new conformers of proline in the gas phase: A LA-MB-FTMW study*. Phys. Chem. Chem. Phys.: 11, 4141-4144.
- Mata, S.; Peña, I.; Cabezas, C.; López, J. C.; J. L. Alonso (2012) *A broadband Fourier-transform microwave spectrometer with laser ablation source: The rotational spectrum of nicotinic acid*. J. Mol. Spectrosc.: 280, 91-96.
- Miessler, G. L.; Fischer, P. J.; Tarr, D. A. (2013). *Inorganic Chemistry*. Prentice Hall. p. 696.
- Miwa, Y.; Mizuno, T.; Tsuchida, K.; Taga, T.; Iwata, Y. (1999) *Experimental charge density and electrostatic potential in nicotinamide*. Acta Cryst. B: 55, 78-84.
- Moller, C.; Plesset, M. S. (1934) *Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems*. Phys. Rev.: 46, 618.

Mougous, J. D.; Lee, D. H.; Hubbard, S. C.; Schelle, M. W.; Vocadlo, D. J.; Berger, J. M.; Bertozzi, C. R. (2006) *Molecular basis for G protein control of the prokaryotic ATP sulfurylase*. *Mol Cell.*: 21, 1, 109-122.

Needleman, S. B.; Wunsch, C. D. (1970) *A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins*. *J. Mol. Biol.*: 48, 3, 443-453.

Nelson D. L.; Cox, M. M. (2001) *Lehninger. Principles of Biochemistry*. 4th. Edition; Ediciones Omega S. A.; p. 204-206, 520-521.

Neuman, N. I.; Perec, M.; González, P. J.; Passeggi, M. C. G.; Rizzi, A. C.; Brondino, C. D. (2010) *Single Crystal EPR Study of the Dinuclear Cu(II) Complex [Cu(tda)(phen)]<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>tda (tda) Thiodiacetate, phen) Phenanthroline): Influence of Weak Interdimeric Magnetic Interactions*. *J. Phys. Chem. A*: 114, 13069-13075.

Neuman, N. I.; Franco, V. G.; Ferroni, F. M.; Baggio, R.; Passeggi, M. C. G.; Rizzi, A. C.; Brondino, C. D. (2012) *Single crystal EPR of the mixed-ligand complex of copper(II) with L-glutamic acid and 1,10-phenanthroline: A study on the narrowing of the hyperfine structure by exchange*. *J. Phys. Chem. A*: 116, 50, 12314-12320.

Ogata, H., Agrawal, A. G.; Kaur, A. P.; Goddard, R.; Gärtner, W.; Lubitz, W. (2008) *Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of adenylylsulfate reductase from Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F*. *Acta Crystal. Sect. F: Struct. Biol. Crystal. Comm.*: 64, 11, 1010-1012.

Osslund, T.; Chandler, C.; Segel, I. H. (1982) *ATP sulfurylase from higher plants: purification and preliminary kinetics studies on the cabbage leaf enzyme*. *Plant Physiol.*: 70, 1, 39-45.

Parey, K.; Demmer, U.; Warkentin, E.; Dahl, C.; Ermler, U. (2012) *The crystal structure of the ATP sulfurylase from Allochromatium vinosum in the open state*. PDB: DOI: 10.2210/pdb4dinx/pdb.

Peck, H. D. Jr.; Deacon, T. E.; Davidson, J. T. (1965) *Studies on adenosine 5'-phosphosulfate reductase from desulfovibrio desulfuricans and thiobacillus thioparus I. The assay and purification*. *BBA Sec. Nucl. Ac. Prot. Synth.*: 96, 3, 429-446.

Pelletier, H.; Kraut, J. (1992) *Crystal structure of a complex between electron transfer partners, cytochrome c peroxidase and cytochrome c*. *Science.*: 258, 5089, 1748-1755.

Peña, M. I.; Varela, M.; Franco, V. G.; López, J. C.; Cabezas, C.; Alonso, J. L. (2014) *Picolinic and Isonicotinic Acids: A Fourier Transform Microwave Spectroscopy Study*. *J. Phys. Chem. A*: 118, 11373-11379.

Phillips, R.; Quake, S. R. (2006) *The Biological Frontier of Physics*. *Phy. Today*: 59, 5, 38-43.

Pickett, H. M. (1991) *The fitting and prediction of vibration-rotation spectra with spin interactions*. *J. Mol. Spectrosc.*: 148, 371-377.

- Pilbrow, J.R. (1991) *Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance*. Oxford University Press, USA.
- Postgate, J. R. (1968) *Fringe biochemistry among microbes*. Proc. Roy. Soc. B: 171, 67-76.
- Renosto F, Schultz T, Re E, Mazer J, Chandler CJ, Barron A, Segel IH.(1985) *Comparative stability and catalytic and chemical properties of the sulfate-activating enzymes from Penicillium chrysogenum (mesophile) and Penicillium duponti (thermophile)*. J. Bacteriol. 164(2):674-83.
- Renosto, F.; Martin, R. L.; Wailes, L. M.; Daley, L.A.; Segel I. H. (1990) *Regulation of inorganic sulfate activation in filamentous fungi. Allosteric inhibition of ATP sulfurylase by 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate*. J. Biol. Chem.; 265(18):10300-10308.
- Renosto, F.; Patel, H. C.; Martin, R. L.; Thomassian, C.; Zimmerman, G.; Segel, I. H. (1993) *ATP sulfurylase from higher plants: kinetic and structural characterization of the chloroplast and cytosol enzymes from spinach leaf*. Arch. Biochem. Biophys.: 307, 2, 272-85.
- Rizzi, A. C.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Nascimento, O. R.; Brondino, C. D. (2000) *Structure and single crystal EPR study of Cu(II)(L-threonine)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O*. Inorg.Chim. Acta 305, 19-25.
- Rizzi, A.C.; Baggio, R.; Garland, M.T.; Peña, O.; Pereg, M. (2003a) *New homobinuclear carboxylate-bridged gadolinium (III) complexes*. Inorg. Chimica Acta: 353, 315-319.
- Rizzi, A. C.; Brondino, C. D.; Calvo, R.; Baggio, R.; Garland, M. T.; Rapp, R. E. (2003b) *Structure and Magnetic Properties of Layered High-Spin Co(II)(L-threonine)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>*. Inorg. Chem.: 42, 4409-4416.
- Robbins, P. W.; Lipmann, F. (1958) *Enzymatic synthesis of adenosine-5'-phosphosulfate*. J. Biol. Chem.: 233, 3, 686-690.
- Rosa, V.; González, P. J.; Avilés, T.; Gomes, P. T.; Welter, R.; Rizzi, A. C.; Passeggi, M. C. G.; Brondino, C. D. (2006) *Synthesis, solid-state structures, and EPR spectroscopic studies on polycrystalline and single-crystal samples of α-diimine cobalt(II) complexes*. Eur. J. Inorg. Chem.: 23, 4761-4769.
- Rother, D.; Ringk, J.; Friedrich, C. G. (2008) *Sulfur oxidation of Paracoccus pantotrophus: the sulfur-binding protein SoxYZ is the target of the periplasmic thiol-disulfide oxidoreductase SoxS*. Microbiol.: 154, 1980-1988.
- Rousk, J.; Bengtson, P. (2014) *Microbial regulation of global biogeochemical cycles*. Front. Microbiol.: 5, 103.
- Sack, R. A. (1958) *A contribution to the theory of the exchange narrowing of spectral lines*. Mol. Phys., 1, 163-167.

Sanz, M. E.; Lesarri, A.; Peña, I.; Vaquero, V.; Cortijo, V.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2006a) *The shape of  $\beta$ -alanine*. J. Am. Chem. Soc.: 128, 11, 3812-3817.

Sanz, M. E.; Cortijo, V.; Caminati, W.; López, J. C.; Alonso, J. L. (2006b) *The conformers of phenylglycine*. Chem. Eur. J. 12, 2564-2570.

Schimel, D. S. (1995). *Terrestrial ecosystems and the carbon-cycle*. Glob. Chan. Biol.: 1, 77-91.

Schrader, N.; Fischer, K.; Theis, K.; Mendel, R. R.; Schwarz, G.; Kisker, C. (2003) *The crystal structure of plant sulfite oxidase provides insights into sulfite oxidation in plants and animals*. Structure: 11, 10, 1251-1263.

Schveigkardt, J. M.; Rizzi, A. C.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Costa de Santana, R. Calvo, R.; Brondino, C. D. (2002) *Structural and Single Crystal EPR Studies of the Complex Copper L-Glutamine: A Weakly Exchange-Coupled System with syn-anti Carboxylate Bridges*. Eur. J. Inorg. Chem.: 2913-2919.

Segel, I. H.; Renosto, F.; Seubert, P. A. (1987) *Sulfate-activating enzymes*. Meth. Enzymol.: 143, 334-349.

Sekulic, N., Paarmann, I., Konrad, M., Lavie, A. (2007) *Elucidation of the active conformation of the APS-kinase domain of human PAPS synthetase I*. J. Mol. Biol.: 367, 2, 488-500.

Sieburg, H. B.; J. Allen Mc Cutchan, Oliver K. Clay, Lisa Cabalero, James J. Ostlund (1990) *Simulation of HIV infection in artificial immune systems* Phys. D: Non linear Phenom. 45, 1-3, 208-227.

Stetter, K. O. (1988) *Archaeoglobus fulgidus gen. nov., sp. nov.: a New Taxon of Extremely Thermophilic Archaeobacteria*. System. Appl. Microb.: 10, 2, 172-173.

Stewart, J. P (1989) *Optimization of parameters for semiempirical methods II. Applications*. J. Comp. Chem.: 10, 2, 221-264.

Suenram, R. D.; Lovas, F. J.; Fraser, G. T. (1988) *Microwave spectrum and  $^{14}\text{N}$  quadrupole coupling constants of indole*. J. Mol. Spec.: 127, 2, 472-480.

Suter, M.; Von Ballmoos, P.; Kopriva, S.; Op Den Camp, R.; Schaller, J.; Kuhlemeier, C.; Schurmann, P.; Brunold, C. (2000) *Adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'-phosphosulfate reductase are identical enzymes*. J. Biol. Chem.: 275, 2, 930-936.

Takusagawa, F.; Shimada, A. (1973) *The crystal structure of picolinic acid*. Chem. Let.: 2, 10, 1089-1090.

Taguchi, Y.; Sugishima, M.; Fukuyama, K. (2004) *Crystal Structure of A Novel Zinc-Binding ATP Sulfurylase from Thermus thermophilus HB8*. Biochem: 43, 14, 4111-4118.

Thapper, A.; Rivas, M. G.; Brondino, C. D.; Ollivier, B.; Fauque, G.; Moura, I.; Moura, J. J. G. (2006) *Biochemical and spectroscopic characterization of an aldehyde oxidoreductase isolated from Desulfovibrio aminophilus*. J. Inorg. Biochem: 100, 44-50.

Tippler, Paul (1998). *Physics for Scientists and Engineers: Vol. 1 (4th ed.)*. W. H. Freeman.

Ullrich, T.C.; Blaesse, M.; Huber, R. (2001) *Crystal structure of ATP sulfurylase from Saccharomyces cerevisiae, a key enzyme in sulfate activation*. EMBO J.: 20, 3, 316-329.

Urich, T.; Bandeiras, T. M.; Leal, S. S.; Rachel, R.; Albrecht, T.; Zimmermann, P.; Scholz, C.; Teixeira, M.; Gomes, C. M.; Kletzin, A. (2004) *The sulphuroxygenase reductase from Acidianus ambivalens is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-hem iron centre*. Biochem. J.: 381, 137-146.

Venegas-Yazigi, D.; Brown, K. A.; Vega, A.; Calvo, R.; Aliaga, C.; Santana, R. C.; Cardoso-Gil, R.; Kniep, R.; Schnelle, W.; Spodine, E. (2011) *Exchange Interactions Through pi-pi Stacking in the Lamellar Compound  $\{[Cu(bipy)(en)]\{Cu(bipy)(H_2O)\}\{VO_3\}_4\}_n$* . Inorg. Chem., 50, 11461-11471.

Venkatachalam, K. V. (2003) *Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) Synthase: Biochemistry, Molecular Biology and Genetic Deficiency*. IUBMB Life: 55, 1-11.

Vincent, J. F. V.; Bogatyreva, O. A.; Bogatyrev, N. R.; Bowyer, A.; Pahl, A-K. (2006) *Biomimetics: its practice and theory*. J. R. Soc. Interf.: 3, 9, 471-482.

Vogelsanger, B.; Brown, R. D.; Godfrey, P. D.; Pierlot, A. P. (1990) *The Microwave Spectrum of a Vitamin: Nicotinamide*. J. Mol. Spect.: 145, 1, 1-11.

Voronkova, V.; Galeev, R.; Korobchenko, L.; Madalan, A. M.; Andruh, M.; Kravtsov, V. C.; Simonov, Y. A. (2005) *Exchange interaction at the supramolecular level. EPR investigation of two copper (II) compounds:  $[Cu_2(acac)_2(phen)_2(bpe)](ClO_4)_2 \cdot (bpe) \cdot CH_3CN \cdot H_2O$  and  $[Cu_2(acac)_2(phen)_2(bpp)](ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$  ( $bpe = \text{trans-1,2-bis(4-pyridyl)ethylene}$ ,  $bpp = \text{bis(4-pyridyl)propane}$ )*. Appl. Magn. Reson.: 28, 297-310.

Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E. (1995) *Electron paramagnetic resonance. Elementary theory and practical applications*. 1<sup>st</sup> Edition. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.

Weil, J. A.; Bolton, J. R. (2006) *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.

Weinkauff, R.; Schermann, J. -P.; De Vries, M. S.; Kleinermanns, K. (2002) *Molecular physics of building blocks of life under isolated or defined conditions (Review)* Eur. Phys. J. D.: 20, 3, 309-316.

---

Werth, M. T.; Tang, S.-F.; Formicka, G.; Zeppezauer, M.; Johnson, M. K. (1995) *Magnetic Circular Dichroism and Electron Paramagnetic Resonance Studies of Cobalt-Substituted Horse Liver Alcohol Dehydrogenase*. *Inorg. Chem.* 34, 218-228.

Wilson, L.G.; Bandurski, R.S. (1958) *Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate and molybdate*. *J. Biol. Chem.*: 233, 4, 975-981.

Whitten, K. W.; Gailey, K. D.; Davis, R. E. (1996) "*General Chemistry*". 3<sup>rd</sup> Edition. Ed. McGraw-Hill. p. 771-772.

Wu, Y. D.; Houk, K. N. (1993) *Theoretical study of conformational features of NAD<sup>+</sup> and NADH analogs: protonated nicotinamide and 1,4-dihydronicotinamide*. *J. Org. Chem.*: 58, 8, 2043-2045.

Yu, M.; Martin, R. L.; Jain, S.; Chen, L. J.; Segel, I. H. (1989) *Rat liver ATP-sulfurylase: purification, kinetic characterization, and interaction with arsenate, selenate, phosphate, and other inorganic oxyanions*. *Arch. Biochem. Biophys.*: 269, 1, 156-174.

Yu, Z.; Lansdon, E. B.; Segel, I. H.; Fisher, A. J (2007) *Crystal structure of the bifunctional ATP sulfurylase-APS kinase from the chemolithotrophic thermophile Aquifex aeolicus*. *J. Mol. Biol.*: 365, 732-743.