

ANALOGOS SINTETICOS DE LAS HEMOPROTEINAS
NATURALES DE TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO
DE OXIGENO

Carla Galli R.*

INTRODUCCION

“El hombre de ciencia no puede permitirse ser un naturalista, mirar a la naturaleza directamente, sino sólo de reojo... Mirarla de frente... convierte al hombre de ciencia en piedra” sostuvo en una oportunidad Thoreau.

El estudio de la compleja relación estructura-función de las hemoproteínas que ligan oxígeno exige justamente un **método indirecto** y uso de compuestos modelo, que son moléculas relativamente pequeñas (≥ 2000 uma) con características estructurales similares a las del centro activo, con las que se intenta emular su función. La comparación de sus propiedades espectroscópicas con las de las metaloproteínas en su centro activo ayuda a la correcta interpretación de estas últimas y a esclarecer detalles estructurales. Por otra parte, al ser sistemas mucho más simples que los naturales, se puede examinar fácilmente el efecto de variar sistemáticamente una sola variable (ligando axial, polaridad o entorno estérico en el sitio de unión al O_2 , solvente, etc.) sobre su reactividad y descubrir incluso nuevas funciones de la proteína.

* Sección Química, Departamento de Ciencias, PUCP.

En su fase inicial los estudios de análogos sintéticos se orientaron principalmente a su caracterización espectroscópica por una variedad de técnicas incluyendo IR, resonancia Raman, UV-visible, Mössbauer, EXAFS, encontrándose una excelente concordancia entre sus propiedades y las de las metaloproteínas en su centro activo. La tabla 1 muestra unos pocos ejemplos escogidos [1].

Tabla 1. Algunas comparaciones espectroscópicas entre hemoproteínas y análogos

Sistema	Raman	I.R.	Mössbauer ^b	
	$\nu(\text{Fe-O})$ (cm^{-1})	$\nu(\text{O-O})$ (cm^{-1})	δ (mm/s)	ΔE_q (mm/s)
Mb	0.91	2.17
Hb	0.92	2.22
FeTpivFP(1-MeIm) ^a	0.88	2.32
Mb (O ₂)	567	1103
Hb (O ₂)	1107	0.26	2.19
FeTpivFP (1-MeIm) (O ₂)	588	1159	0.27	2.04

a FeII-(Tetrapivaloilamidofenilporfirina) (1-metilimidazol); b A 77° K; δ =desplazamiento isomérico, una medida de la densidad electrónica en el núcleo de hierro; ΔE_q =desdoblamiento cuadrupolar, una medida de la asimetría de densidad electrónica en el núcleo de hierro.

Más adelante y hasta la actualidad, el interés principal radica más bien en el estudio de las propiedades funcionales de los modelos y su comparación con las hemoproteínas que ligan oxígeno.

El requisito fundamental para un modelo de hemoglobina (Hb) o mioglobina (Mb) es que ligue oxígeno en forma reversible 1:1. *El enlace al O₂ debe ser lo suficientemente fuerte para que lo transporte en forma eficiente, pero no tanto como para impedir la reacción inversa.*

Entre los pocos metales que con ligandos apropiados cumplirían con esta condición se encuentran Ti^{II}, V^{II}, Cr^{II}, Mn^{II}, Fe^{II} y Co^{II} [2]. Aunque existen algunos sistemas con otros metales que ligan O₂, el interés de la investigación en esta área se ha centrado en ciertos complejos de Co^{II}, pues han probado

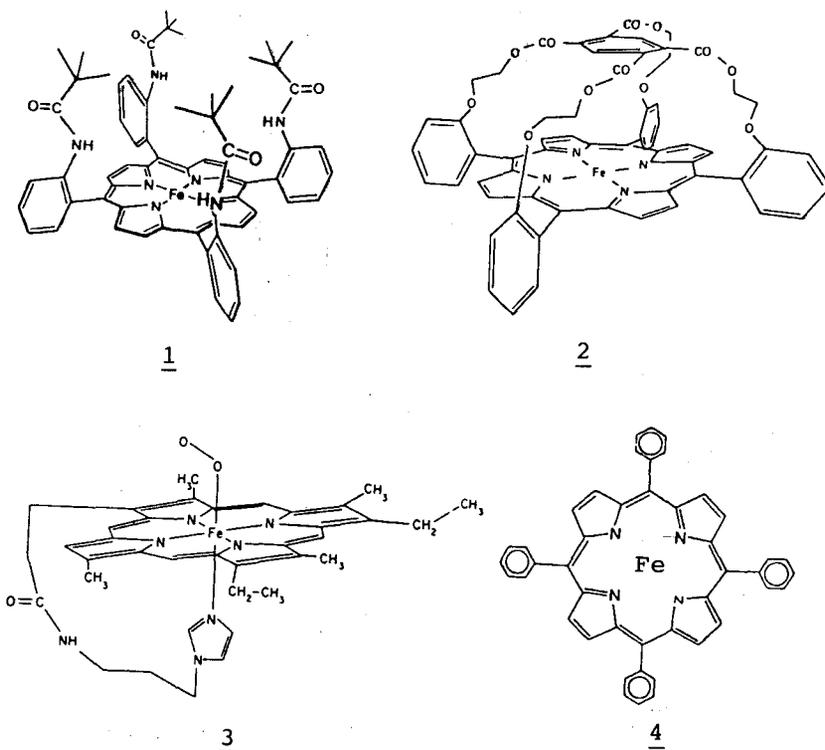
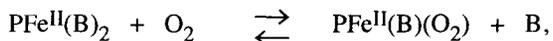


Fig. 1 Algunas Fe^{II}-porfirinas sintéticas que ligan reversiblemente oxígeno.

ser excelentes modelos generales, y en los de Fe^{II}, por su evidente importancia biológica. El hecho de que el hierro haya sido el metal seleccionado por la naturaleza, se debe a que es mucho más abundante y accesible (particularmente en el agua de mar) que el cobalto y otros.

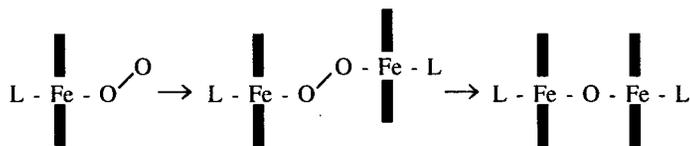
MODELOS HIERRO(II)-PORFIRINA

Se ha demostrado que las Fe^{II}-porfirinas pueden reaccionar reversiblemente con O₂ según:

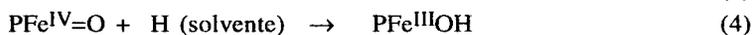
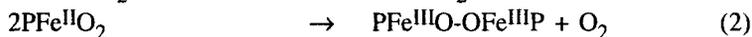


donde: P= porfirina; B= base axial.

Sin embargo, en las Fe^{II}-porfirinas simples se presenta un gran problema, que las imposibilita de fungir como transportadoras de O₂. La oxidación irreversible al dímero μ-oxo es un proceso competitivo, termodinámicamente muy favorable y extremadamente rápido a temperatura ambiente, que inhibe completamente la reacción inversa:



El mecanismo de la autoxidación en solución fue establecido por Balch y colaboradores por estudios de ¹H-RMN y confirmado posteriormente por otros grupos mediante la técnica de resonancia Raman [3]. La reacción procede así:



Se investigó mucho sobre cómo superar este problema, que no se presenta en las metaloproteínas naturales por el efectivo bloqueo estérico de la globina sobre la posición de coordinación del oxígeno, encontrándose tres tipos de soluciones generales [4]:

- (a) emular mediante sustitución adecuada en la porfirina el bloqueo estérico de la globina que impide la dimerización;
 - (b) uso de bajas temperaturas, de modo que las reacciones conducentes a la dimerización sean muy lentas;
 - (c) uso de soportes rígidos para el complejo de Fe^{II}, que impiden la reacción bimolecular.
- a) el uso de la restricción estérica fue demostrado elegantemente por Collman y Baldwin (1973).

Collman desarrolló el modelo 1, Fe^{II}-porfirina tipo “cerco” mostrado en la figura 1, con los cuatro grupos pivalamida, que sustituyen a los fenilos de la tetrafenilporfirina (TFP), apuntando hacia el mismo lado del plano

porfirínico. Usando como ligando axial una base con cierta demanda estérica como N-alkilimidazol, ésta coordinará al lado no impedido, por lo que el oxígeno se verá obligado a ocupar la posición vacante dentro del “cerco”. De esta manera se inhibe la reacción bimolecular y simultáneamente se evita que la sexta posición de coordinación alrededor del Fe^{II} sea ocupada también por la base, como es usual en las Fe^{II} - porfirinas simples.

Se aisló y caracterizó los complejos dioxígeno cristalinos con 1-metil y 1-n-butylimidazol como base axial, estableciéndose la reversibilidad y repetibilidad de la oxigenación en una disolución de benceno conteniendo un pequeño exceso de la base.

Baldwin y colaboradores sintetizaron otro tipo de modelo, el 2 de la Fe^{II}-porfirina con «cubierta» (fig. 1). En soluciones bencénicas del complejo de Fe^{II} conteniendo una base L (L = piridina, 1-metilimidazol) ocurre la serie de reacciones mostrada en la figura 2.

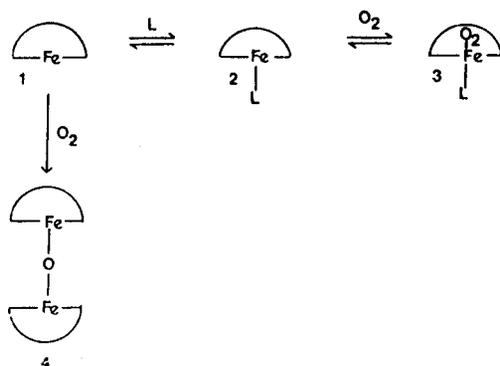


Fig. 2 Reacciones de la Fe^{II}-porfirina con “cubierta”.

La estabilidad del aducto de O₂ es muy dependiente de la naturaleza y concentración de la base L. En ausencia de L ocurre rápida formación del dímero μ-oxo, mientras que un gran exceso de L desplaza el equilibrio hacia el complejo pentacoordinado con la consiguiente reducción en la velocidad de autoxidación. La vida del complejo dioxígeno en piridina como solvente es de ca. 20 horas; al cabo de este tiempo tiene lugar su oxidación completa al dímero μ-oxo. El complejo se desoxigena aplicando

vacío a su solución congelada en piridina y se vuelve a formar rápidamente al airear, pudiendo resistir varios de estos ciclos con mínimo deterioro.

- b) Se han sintetizado varios complejos Fe^{II} -porfirinas que desde un punto de vista estérico no poseen ningún tipo de impedimento para formar el dímero μ -oxo y que, sin embargo, sufren oxigenación reversible a bajas temperaturas.

Traylor y colaboradores (1973) prepararon un complejo Fe^{II} - porfirina, en el que una de las posiciones de coordinación axial vacante era ocupada por un imidazol N-alquilsustituído por una larga cadena que lo conectaba al plano de la porfirina, como se muestra en la figura 1. Este compuesto modelo 3 toma en forma reversible O_2 al estado sólido; en disolventes apróticos como DMF y CH_2Cl_2 lo hace a -45°C , temperatura a la que la oxidación irreversible es lenta.

Basolo demostró que Fe^{II} -tetrafenilporfirinas simples en CH_2Cl_2 a -79°C , modelo 4 (fig.1), son excelentes transportadores de O_2 . Son posibles varios ciclos de oxigenación y desoxigenación a -79°C sin que ocurra oxidación irreversible.

- c) El tercer método exitoso de evitar la dimerización es preparar un complejo capaz de unirse firmemente a la superficie de un sólido, de modo que los centros Fe^{II} no puedan acercarse.

Wang reportó en 1958 el primer sistema Fe^{II} -porfirina sintético capaz de enlazar reversiblemente oxígeno. Mediante un clásico experimento obtuvo el 1-(2-feniletil)imidazol hemo dietiléster inmovilizado en una película de poliestireno. Expuesto al aire se combinaba rápidamente con O_2 para dar un producto rojo con propiedades espectroscópicas muy similares a la hemoglobina. La oxigenación es reversible, sometido a una corriente de nitrógeno por varias horas pierde el O_2 [5].

Basolo y colaboradores encontraron que por adhesión de Fe^{II} -TFP a un soporte rígido de sílica gel modificada, se obtiene un sistema eficiente de transporte de O_2 . La sílica gel usada contenía un grupo 3-imidazoilpropil unido al silicio de la superficie. Reacción con Fe^{II} -TFP(B)₂ a bajas temperaturas seguida de calentamiento para eliminar la base axial daba el complejo pentacoordinado capaz de ligar reversiblemente O_2 . En la figura 3 se ilustra claramente este caso.

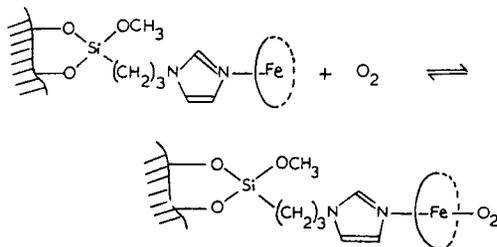


Fig. 3 Sistema de transporte reversible de O_2 por inmovilización en un soporte rígido de sílica gel modificada

Por último, algunos complejos Fe^{II} -porfirinas, como aquél con la base axial incorporada de Traylor modelo 3, y otros, así como también la ftalocianina de Fe^{II} , adicionan reversiblemente O_2 al estado sólido. El fundamento es el mismo: la inherente extrema lentitud de la reacción bimolecular de formación del intermediario μ -peroxo $PFe^{III}-O-O-Fe^{III}P$.

RECONOCIMIENTO DEL SUSTRATO EN LOS ANALOGOS SINTETICOS

Los estudios realizados con los complejos modelo que acabamos de discutir confirmaron dos funciones fundamentales de la proteína globina en los transportadores y almacenadores naturales de oxígeno, hemoglobina y mioglobina:

- 1) prevención de la oxidación bimolecular irreversible del Fe^{II} ;
- 2) preservación de una posición de coordinación vacante al Fe^{II} .

Pero faltaba estudiar un tercer aspecto, el rol de la globina en la generación del reconocimiento del sustrato, específicamente oxígeno vs monóxido de carbono. Esta habilidad está increíblemente bien desarrollada en las hemoproteínas naturales, pero en su infancia en los modelos sintéticos. Se trata de discriminar, como se explicó ya ampliamente, en contra del CO y a favor del O_2 [6]. Para ello se deben aprovechar diferencias sutiles entre el O_2 y CO enlazados, de las cuales las más importantes han probado ser sus capacidades relativas de enlace de hidrógeno, sus diferentes interacciones con grupos polares en las cercanías del sitio de enlace y con el solvente. También juegan un papel significativo factores estéricos de diversos tipos.

En las hemoproteínas naturales el rol del entorno inmediato sobre la afinidad por oxígeno y por CO se puede determinar por un estudio comparativo de especies y mutantes, o mejor aún, por mutagénesis dirigida. Un equivalente

de esto en los estudios con modelos es una variación sistemática de la superestructura de la porfirina en el lado distal.

Un **problema** común a ambos tipos de estudios es la gran dificultad que se presenta al intentar **analizar uno de los efectos de una determinada variación estructural**, por mínima que sea, **en forma independiente de los otros que puedan haberse introducido**. Por ejemplo, se puede reemplazar la histidina distal en la mioglobina por glicina o valina vía mutagénesis dirigida, para estudiar la influencia del **enlace de hidrógeno** sobre su afinidad por O_2 . Sería deseable que una mutación reemplazara un resto proteínico y no afectara en absoluto el resto de la molécula, pero en realidad pueden ocurrir muchos sutiles ajustes estructurales: moléculas de H_2O pueden llenar vacíos, dipolos se pueden reorientar, restos voluminosos del grupo reemplazante pueden inhibir el enlace al O_2 y la entidad de FeO_2 puede incluso cambiar su orientación angular con respecto al plano porfirínico. Todos estos ajustes estructurales influenciarán **también** la afinidad por O_2 y podrían atenuar el efecto del cambio nominal. Esto explicaría el ΔG° de sólo 1,3 kcal/mol producido por la mutación en cuestión (reduce 10 veces la afinidad por O_2 de la Mb), bastante pequeño para valores usuales de enlace de hidrógeno. Por otra parte, no se excluye que se trate por diversos motivos de un enlace particularmente débil [6]. Situaciones similares son frecuentes en estudios con sistemas modelo.

Polaridad local y enlace de hidrógeno

Estudios de **espectroscopía de 1H -RMN** de los complejos con O_2 y CO de los **compuestos modelo 5 y 6** (fig. 4) demostraron la presencia de **enlace de hidrógeno entre el grupo amido de la cadena puente distal y la molécula de O_2 ligada al Fe^{II} en 6** [7].

El efecto neto de la introducción de los grupos amido en **6** es un **aumento en 10 veces de la afinidad por O_2** con respecto a **5**, lo que corresponde a una estabilización de 1,3 kcal/mol (a $25^\circ C$) del oxocomplejo de **6**.

En el espectro de 1H -RMN del **complejo carbonilo de 6** (con piridina en vez de imidazol como base axial) aparecen dos señales muy cercanas (6,7 y 6,9 ppm) correspondientes a los **protones amídicos** de las cadenas “distal” y “proximal”. En el **complejo oxigenado de 6** una de estas señales está desplazada en **más de 1 ppm hacia campo bajo** (altar), consistente con un mayor apantallamiento del grupo de protones amídicos “distal” por enlace de hidrógeno al O_2 ligado.

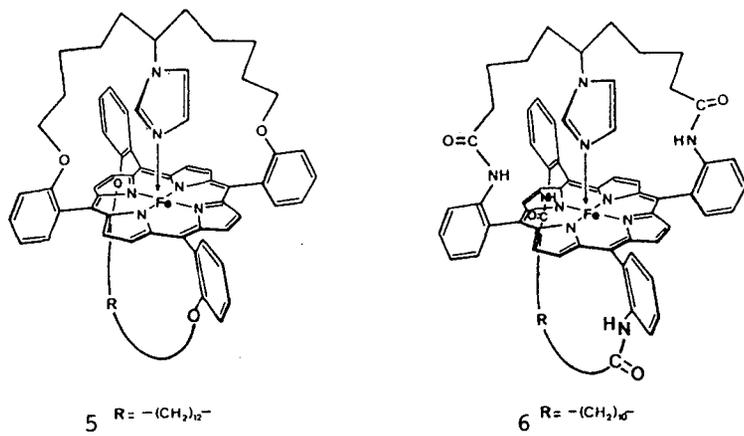
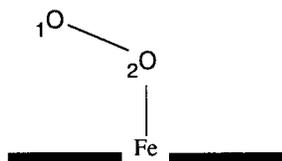


Fig. 4 Compuestos modelo 5 y 6

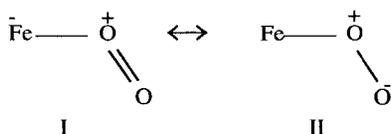
En el compuesto **6**, la **cadena puente fuerza a los H-amídicos hacia el centro de la porfirina**, como lo demuestra el hecho de que las resonancias correspondientes en el complejo carbonilo estén a campo mucho más alto (ca. 3ppm) que el típico para amidas aromáticas. En base a la magnitud de este desplazamiento, producido por la corriente diamagnética del anillo porfirínico, se ha estimado la posición espacial de los H-amídicos y por ende de los átomos de nitrógeno, resultando así una **distancia N(H)... O-terminal de ca. 3Å**. Esta distancia es típica para amidas involucradas en **fuerte enlace de hidrógeno** y mucho más corta que aquella determinada por cristalografía de rayos X en el complejo oxo de la porfirina tipo “cerco” de Collman. La distancia tan larga (ca.4Å), el arreglo no lineal de los átomos N-H...O y las sustanciales repulsiones estéricas entre los grupos metilo de las pivalamidas y el ligando O₂ son responsables del débil enlace de hidrógeno en este último caso [8].

La **espectroscopía de ¹⁷O-RMN** es una técnica muy útil para determinar cambios electrónicos, como los producidos por enlace de hidrógeno o interacciones dipolo-dipolo con el entorno, en el grupo Fe-O₂ de las hemoproteínas naturales o sus análogos sintéticos. Esto se demostró en un estudio con varios modelos relacionados, entre los cuales estaban los anteriormente discutidos **5** y **6**, así como la porfirina de Collman [9].

Los espectros ¹⁷O-RMN de todos ellos mostraron **dos** resonancias bien diferenciadas, próximas a 1750 y 2500 ppm para el O(2) y O(1) respectivamente, en concordancia con el enlace “*end-on*” angular de Pauling.



En el complejo oxo de la porfirina de Collman los desplazamientos químicos correspondientes al O(1)-terminal y O(2)-unido al Fe^{II} son muy similares a aquéllos en el modelo **5**, en que la superestructura del lado distal donde liga el O₂ contiene grupos éter incapaces de formar enlace de hidrógeno. Esto demuestra un enlace de hidrógeno, a lo sumo muy débil, en la porfirina “cerco” y concuerda con estudios IR previos de los mismos autores. Por otra parte, en el espectro ¹⁷O-RMN del oxocomplejo de **6** se observa un desplazamiento de ca. 15ppm en la resonancia del O(1) hacia menor frecuencia (campo alto) y de ca. 15 ppm en la del O(2) hacia mayor frecuencia. Esto es consistente con la presencia de un fuerte enlace de hidrógeno en **6**, que favorece la estructura resonante II:



Chang y colaboradores, en un elegante estudio sistemático con una serie de porfirinas como las del modelo **3** pero sustituidas con grupos de diferente polaridad en la cadena lateral, encontraron que grupos polares en inmediata proximidad al sitio de enlace de O₂ ó CO afectan dramáticamente k_{as} y k_{dis} para el O₂, mas no para el CO.

El aumento en k_{as} y disminución en k_{dis} observados concuerda con el efecto estabilizante del ambiente polar sobre el enlace polar Fe-O₂. El efecto adicional de añadir un grupo prótico que se encuentra a distancia enlazante del O₂ coordinado, disminuyó aún más k_{dis} como era de esperar [1].

En una investigación reciente se sintetizó una extensa serie de Fe^{II}-porfirinas tipo “cerco”, con uno de los cuatro restos terbutilo reemplazados por un sustituyente capaz de formar enlace de hidrógeno [10]. Los modelos **7a** y **7b** son representativos (fig.5).

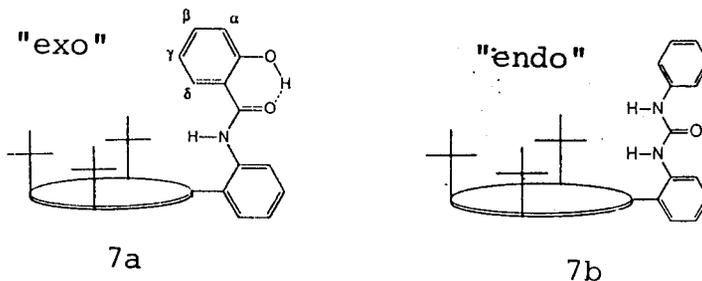


Fig. 5 Influencia de la conformación sobre la capacidad de enlace de hidrógeno a la entidad Fe-O₂

Se determinó la conformación (exo o endo) de los diferentes apéndices por ¹H-RMN, encontrándose que sólo **7b** poseía la conformación requerida para enlace de H a un O₂ ligado. En los otros casos, incluyendo a **7a**, el enlace de H intramolecular en la forma desoxigenada impide una orientación óptima y no puede ser superado por el mucho más débil enlace de H a la entidad de FeO₂. Consistente con esto, la afinidad por O₂ de **7b** con respecto al modelo "cerco" normal aumenta 10 veces. En cuanto al aspecto cinético, se observa una fuerte disminución en la k_{dis} ; sin embargo la k_{as} también disminuye, aunque en mucho menor grado, lo cual sugiere una desestabilización del estado de transición vía un efecto estérico. Este originaría también la disminución observada en k_{as} para el CO.

Efecto del solvente

Suslick y colaboradores realizaron un estudio sistemático de la influencia de la polaridad del solvente sobre las afinidades por CO y O₂ del (5,10,15,20-tetrakis(2',4',6'-trifenilfenil)porfirinato)hierro(II), Fe-TTFPP, una porfirina de doble cavidad no polar modelo **8** (fig. 6). Se utilizó una serie bien análoga de solventes para minimizar cualquier variación debida a otras características del solvente, como enlace de hidrógeno, capacidad coordinativa, etc. Los resultados principales de dicho estudio se muestran en la tabla 2 [11].

Se observa en primer lugar que, debido a la naturaleza no polar del sitio de enlace en la Fe-TTFPP (1,2-Me₂Im), sus afinidades por O₂ son bajas ($P^{1/2}$ alta) en comparación con análogos sintéticos con un ambiente más polar como la porfirina de Collman Fe-TpivFP (1,2-Me₂Im). Contrastando con esto, las afinidades por CO de la Fe-TpivFP (1,2-Me₂Im) no se ven disminuidas.

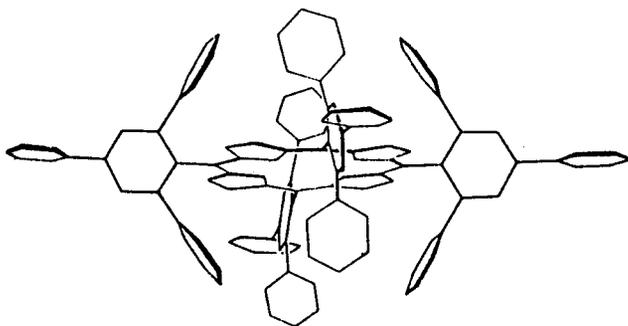


Fig. 6 Compuesto modelo 8

Tabla 2. Dependencia del solvente de las afinidades por CO y O₂

Sistema	Solvente	π^*	P ^{1/2} (CO) torr	P ^{1/2} (O ₂) torr	M
Fe-TTFPP (1,2-Me ₂ Im)	mesitileno	0,41	0,0080	640	80 000
	tolueno	0,54	0,0091	508	55 800
	benceno	0,59	0,0092	473	51 400
	clorobenceno	0,71	0,0120	299	24 900
	o-diclorobenceno	0,80	0,0160	227	14 200
Fe-TpivFP (1,2-Me ₂ Im)	tolueno	0,54	0,0089	38	4 280
Hb (humana, estado T)	H ₂ O, pH7	1,09	ca.0,3	ca. 40	ca. 150

T = 300°K; π^* = escala empírica de polaridad del solvente; M = P^{1/2}(O₂)/P^{1/2}(CO)

En lo que se refiere a la influencia del solvente, se nota claramente que el **efecto de un aumento de la polaridad del solvente es aumentar la afinidad por O₂ (menor P) y disminuir aquélla por CO**. Para la porfirina no protegida Fe-TFP (1,2-Me₂Im) se observó exactamente la misma tendencia, lo que indica que este efecto es independiente del entorno en el sitio de enlace.

Por último, M , que es un índice de la discriminación relativa CO vs. O_2 (a menor M , menor preferencia por CO), disminuye considerablemente con creciente polaridad del solvente, lo que demuestra que el hecho de que el **solvente sea H_2O en las hemoproteínas naturales**, representa una contribución importante al mecanismo discriminativo en dichos sistemas, que **previene el envenenamiento endógeno por CO**.

El efecto favorable de un entorno polar (ya sea local o del solvente) en el sitio de enlace sobre la afinidad por O_2 , es consecuencia de la polaridad del enlace $Fe(\delta^+) - O_2(\delta^-)$, que causa un aumento en el momento dipolar neto del complejo. En cambio, parece ser que el enlace Fe-CO más bien involucra una disminución en el μ neto del complejo hexacoordinado.

Efectos estéricos

Estudios estructurales comparativos de los complejos con O_2 y CO de las porfirinas “cerco” de Collman, mioglobina y hemoglobina, demuestran que, mientras que la geometría del enlace $Fe^{II}-O-O$ es la angular normal en los tres casos, el **arreglo $Fe^{II}-C-O$ es el lineal ideal en el complejo de Collman**, pero angular en MbCO y HbCO [1]. Esta distorsión de la linearidad es atribuida a cierto impedimento estérico por parte de los grupos distales histidina (E7) y valina (E11), como se mencionó anteriormente [6]. La ausencia de restricción estérica para un enlace lineal normal del CO en la porfirina de Collman sería responsable en parte de su **mucho mayor afinidad por CO respecto a Hb** (ver tabla 2).

Collman y colaboradores compararon las afinidades por CO y O_2 del modelo “cerco” con las del modelo relacionado **9** (fig. 7), que imita por medio de una cubierta la congestión estérica del lado distal en Mb y Hb. La **afinidad por CO** de este último **disminuyó 30 veces** mientras que aquella por O_2 se mantuvo aproximadamente constante, como se esperaba. Cinéticamente **ambos**, CO y O_2 , experimentaron una disminución en sus respectivas k_{as} ; la k_{dis} del O_2 disminuyó mientras que la k_{dis} del CO permaneció constante [1]. Estos resultados no concuerdan con un impedimento estérico selectivo CO vs O_2 del modelo **9**. Además el enlace de H más fuerte en **9** sería el principal responsable de la disminución en k_{dis} del O_2 .

Chang y colaboradores compararon una serie de porfirinas con una sola cadena puente de la misma naturaleza pero de diferente longitud. Se observó que conforme crece la cadena, aumenta la afinidad por CO (aprox. 10 veces de la tirante a la holgada) [1].

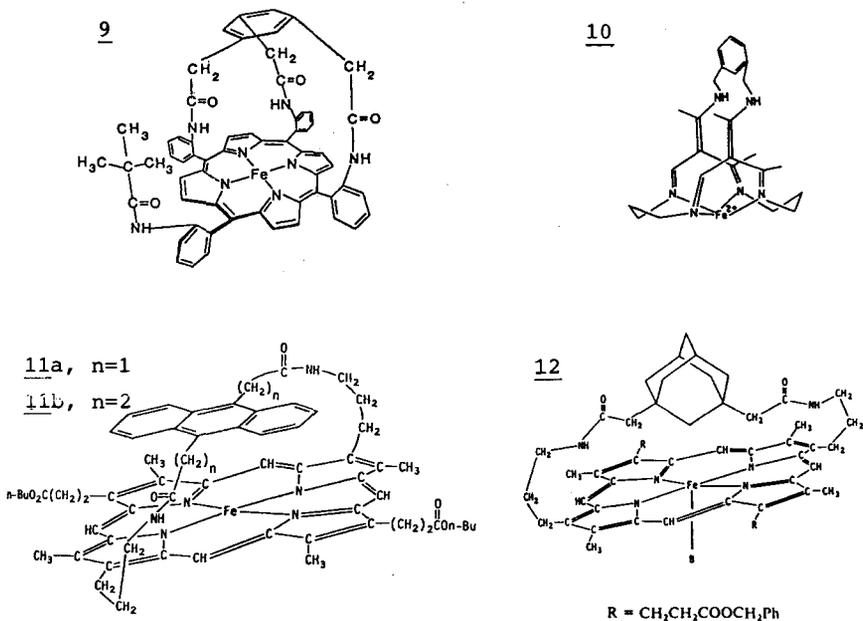


Fig. 7 Algunos sistemas modelo Fe^{II}-porfirina útiles en el estudio de efectos estéricos

Busch y colaboradores sintetizaron un tipo de complejos no porfirínicos, los Fe^{II}-macrociclos "lacunar", como el mostrado en la figura 7, modelo **10**, que poseen una especie de "tapa". Por alteración de ésta se pasa de una cavidad abierta en el sitio de enlace a una con restricción estérica, observándose que la afinidad por CO disminuyó 20 veces. La estructura cristalina del complejo carbonilo restringido confirma el impedimento estérico mostrando una desviación de 10° respecto al arreglo lineal para el enlace Fe-C-O.

Traylor y colaboradores han cuestionado a través de una serie de publicaciones la importancia del factor estérico distal como medio de discriminar entre CO y O₂ en las hemoproteínas y en sus análogos sintéticos. Su contribución al mecanismo discriminativo de estos sistemas sería mucho menor que las del enlace de hidrógeno, polaridad local y solvente.

En uno de sus trabajos determinaron las constantes de equilibrio para enlace a CO, O₂, isonitrilos RNC e imidazoles de dos antraceno hemo-ciclofanos, el Fe(6,6-ciclofano) y el Fe(7,7-ciclofano) en solución bencénica. Estos sistemas modelo, **11a** y **11b**, contienen, como se observa en la figura 7, un antraceno conformacionalmente móvil extendido simétricamente sobre el grupo hemo. El modelo **11a** muestra una reducción de ca. 300 veces en sus afinidades por **ambos**, CO y O₂ (sin mayor diferencia entre ellos), comparado con sistemas hemo no impedidos estéricamente, como el mesohemo quelatado, muy similar al modelo **3**. El modelo **11b**, de cadena más larga y por tanto menos impedido, muestra sólo ligeros efectos estéricos hacia CO y O₂, pero efectos mayores hacia ligandos isonitrilo voluminosos. Los efectos se manifiestan principalmente sobre las k_{as} y no sobre las k_{dis} , como sucede también en las hemoproteínas naturales, lo que es consistente con el mecanismo de enlace de los ligandos mencionados a sistemas impedidos estéricamente establecido posteriormente [12,13].

En otra investigación más reciente, Traylor y colaboradores estudiaron mediante la técnica de fotólisis flash de picosegundos el efecto del bloqueo estérico en el 1,3-adamantano-3,13-porfirina-6,6-ciclofano, modelo **12** (fig. 7) sobre la cinética del enlace a ligandos isonitrilo RNC. Se observó una fuerte reducción en la constante de velocidad **global** de enlace k_{as} (ca.1000 veces) que es atribuible a un **cambio conformacional** en el compuesto modelo previo a la formación del par de contacto y del enlace en sí. La conformación normal **cerrada** del modelo no enlazado, sin cavidad libre entre el grupo adamantano y el anillo porfirínico, impide del todo el enlace. Es necesario su paso a una conformación **abierta**, tal como se muestra en la figura 8.

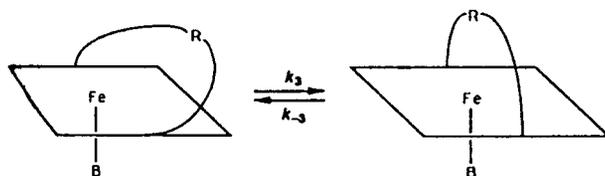
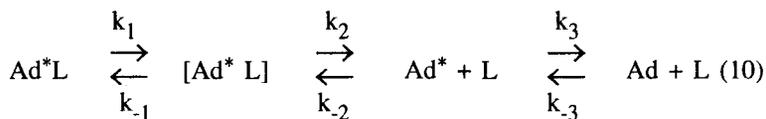


Fig. 8 Conformaciones “abierta” y “cerrada” en sistemas hemo impedidos estéricamente

Esta activación correspondería al paso inicial y más lento dentro del esquema de enlace propuesto:



En cambio, el bloqueo estérico por adamantano influye mínimamente en el paso de formación del enlace mismo (k_{-1} sólo varía en un factor de 2). En este paso no hay prácticamente diferencia con sistemas hemo no impedidos ni Mb. Resultados similares se obtuvieron con los ligandos CO y O₂. Esto cuestionaría la interpretación previa del efecto estérico distal en el sentido que k_{as} para CO se retarda por distorsión del arreglo lineal ideal Fe-C-O, pues esto afectaría considerablemente k_{-1} .

Es interesante el hecho de que el modelo en cuestión no discrimina estéricamente en base al tamaño del ligando entrante RCN, la reducción en k_{as} global es similar para los sustituyentes metilo y terbutilo. Esto se interpreta como que el modelo pasa en cualquiera de los casos de una conformación completamente cerrada a una completamente abierta.

El mecanismo de enlace propuesto sería general para sistemas impedidos estéricamente. Estudios de la cinética del enlace a O₂ y CO en mutantes de mioglobina con diversos grupos bloqueador distal muestran efectos muy similares sobre las k_{as} de **ambos** ligandos; en ese caso lo que se movería es el imidazol distal para dejar acercarse al ligando al sitio de enlace.

BIBLIOGRAFIA

1. Suslick, K.S., Reinert, T.J. (1985) *J. Chem. Ed.*, **62**, 974-983.
2. Ei-Ichiro Ochiai (1987) **General Principles of Biochemistry of the Elements** - 1ra. Edición (Plenum Press)
3. Mizutani, Y., Hashimoto, S., Tatsuno, Y., Kitagawa, T., (1990) *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6809.
4. Robert W. Hay (1984) **Bio-Inorganic Chemistry** - 1ra. Edición - (Ellis Horwood Limited).

5. M.N. Hughes (1981) **The Inorganic Chemistry of Biological Processes.** John Wiley Sons - 2da. Edición.
6. Galli Rigo-Righi,C. (1994) *Revista de Química.*, Vol.VIII, N°1, 85.
7. Mispelter, J., Momenteau, M., Lavalette, D., Lhoste, J-M., (1983) *J.Am.Chem.Soc.*, **105**, 5165-5166.
8. Jameson, G.B., Drago, R.S., (1985) *J.Am.Chem.Soc.*, **107**, 3017-3020.
9. Gerothanassis, I.P., Momenteau,M., Lock, B., (1989) *J.Am.Chem. Soc.* **111**, 7006-7012.
10. Wuenschell,G.E., Tetreau,C., Lavalette,D., Reed,C.A.,(1992) *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 3346-3355.
11. Suslick,K.S., Fox,M.M., Reinert,T.J., (1984) *J.Am.Chem.Soc.* **106**, 4522-4525.
12. Traylor, T.G., Tsuchiya,S., Campbell, D.,Mitchell,M., Stynes, D., Koga, N., (1985) *J.Am.Chem.Soc.*, **107**, 604-614.
13. Traylor,T.G., Koga, N., Deardurff,L.A., Swepston, P.N., Ibers, J.A., (1984) *J.Am.Chem.Soc.*, **106**, 5132-5143.
14. Traylor,T.G., Taube,D.J., Jongeward, K.A., Magde,D., (1990) *J.Am.Chem.Soc.*, **112**, 6875-6880.