

Es realmente difusa la barrera entre la revisión de la investigación de un tema especializado y una contribución para la actualización docente. Esta sección recoge artículos de revisión adecuados para la enseñanza.

La hemocianina: ¿existen los seres de sangre azul?

*Karina Almeida-Leñero, Alejandro Rosas-Zavala y Norah Barba-Behrens**

Abstract

Copper is essential to all forms of life, it occurs in trace quantities and performs a variety of physiological functions, it is associated to several proteins and is the active site in a variety of metalloenzymes. It is an important catalyst of biological redox processes and may be involved in electron transfer reactions; its redox properties are very important to be able to carry on these functions and they may vary according to several factors, as the coordinated ligands and the geometry around the metal ion. In living organisms copper usually presents oxidation states of I and II, but in certain cases a Cu (III) has been proposed.

Among the copper proteins, hemocyanin is a widely occurring oxygen transport protein for invertebrates, arthropods and mollusks, and forms a stable dioxygen adduct, oxyhemocyanin. Hemocyanin is always found in the blood. Unlike vertebrate hemoglobins, it is not confined to special cells, but exists as a freely dissolved solute. Its name is misleading, for unlike hemoglobin has not heme group, and the copper is directly bound to the protein. The colorless protein has two copper atoms per protein which are in an oxidation state of 1+, but upon oxygenation the protein becomes blue and the metal ions are now in a divalent state. The functional form of hemocyanin consists of large assemblies of subunits; no monomeric hemocyanins, analogous to myoglobin are known. For some hemocyanins the binding of oxygen is highly cooperative.

The structure of the active site has been proved to have each copper atom coordinated to three imidazole groups from histidine residues and the metal ions very near from each other. The coordination structures of the two copper ions consist of two short Cu-N bonds in a planar frame and two apical Cu-N from opposite sides of the plane. In earlier works, a bridging ligand between the copper atoms was proposed to explain their strong magnetic interaction and for the oxyhemocyanin, dioxygen was suggested to be bound at the dinuclear copper

site in a *cis*- coordination mode. However, the existence of the additional bridging ligand has not been proved experimentally, and from spectroscopy results the binding of the dioxygen to the dinuclear copper site in hemocyanin is interpreted by a simple dioxygen addition and its coordination mode is thought to be as a peroxide, $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2$, this coordination of the peroxide alone can mediate magnetic interactions between the two copper (II) ions, accounting for the diamagnetism.

Several compounds had been synthesised to study the unusual magnetic and spectral characteristics of oxyhemocyanin, to model the active site which has been a long-standing challenge in bioinorganic chemistry.

El cobre es uno de los metales traza esenciales para la vida. En pequeñísimas cantidades, el cobre es indispensable para un gran número de procesos, puesto que participa como catalizador de una gran variedad de reacciones y forma parte del sitio activo de muchas enzimas. Sin embargo, una cantidad excesiva de cobre es sumamente tóxica para los seres vivientes.

Muchos seres vivos, plantas y animales, utilizan proteínas que contienen cobre, las cuales parecen tener dos funciones principales: el transporte de electrones y el transporte de oxígeno. Por lo tanto, las propiedades redox del cobre son de suma importancia para entender el funcionamiento de estas proteínas.

Las propiedades redox del cobre varían considerablemente dependiendo de sus ligandos, su disposición en el espacio y el disolvente.

En los organismos vivos encontramos sobre todo especies con cobre en estado de oxidación I y II, aunque en ciertos casos se ha encontrado cobre (III). A continuación se describen las características generales de los compuestos de coordinación formados con cobre (Jameson, 1981).

Cobre (I)

El cobre (I) es un ácido sumamente blando, por lo que forma complejos fuertes con halógenos pesados y con ligandos por azufre e insaturados.

El número de coordinación más común en este caso es cuatro, aunque se conocen especies con dos, tres y cinco. El de dos es sumamente raro. De hecho, algunos

* Facultad de Química, UNAM, 04510 México, D.F.

Recibido: 2 de octubre de 1995;

Aceptado: 3 de noviembre de 1995.

compuestos que parecen presentarlo en realidad completan su esfera de coordinación con moléculas de disolvente; éste es el caso en Cl-Cu(I)-Cl . Sin embargo, el de tres es un poco más común, sobre todo en sistemas biológicos; estos compuestos se estabilizan con ligantes blandos. En el caso de un número de coordinación de cuatro, los compuestos formados por lo general son tetraédricos; con ligantes blandos y/o insaturados, como son el 2,2'-bipiridilo y la 1,10 fenantrolina.

Los únicos compuestos de cobre (I) con número de coordinación superior a cuatro son moléculas biológicas que incorporan cinco ligantes en su esfera de coordinación. Diversos estudios muestran que estos compuestos están formados generalmente por cuatro ligantes que fuerzan la coplanaridad con el cobre, lo que le permite coordinarse con una quinta molécula.

Cobre (II)

A pesar de que el estudio de la química de coordinación del Cu(II) se inició hace bastantes años, durante mucho tiempo se tuvo la creencia de que sus compuestos presentaban casi invariablemente una geometría plana cuadrada. Sin embargo, desde la década de los 70 se han descubierto una gran cantidad de compuestos con otras geometrías.

El cobre (II) tiene una configuración electrónica de $(\text{Ar})3d^9$, lo que permite estudiarlo por una gran variedad de técnicas espectroscópicas y magnéticas. Además, su configuración es responsable de que los compuestos de coordinación del cobre presenten el efecto Jahn-Teller, provocando que los compuestos existan en una serie de configuraciones con energías prácticamente iguales. Esto se manifiesta de dos maneras: los compuestos de coordinación de cobre (II) presentan distorsiones aun con los ligantes más sencillos, porque las distancias metal-ligante no son iguales; por otro lado, presentan una enorme variedad de geometrías, lo cual es aprovechado en sistemas biológicos. Esto se debe a que el Cu(II) permite que sean los ligantes (con sus requerimientos estéricos y electrónicos) los que determinen la geometría del complejo, a diferencia de otros iones metálicos que imponen determinada geometría y fuerzan cambios conformacionales en los ligantes.

Los complejos de cobre (II) presentan números de coordinación cuatro, cinco y seis, aunque se conocen algunos compuestos con número de coordinación dos o superiores a seis.

Para el número de coordinación de cuatro, la geometría plana cuadrada no es tan común como mucho tiempo se pensó. En realidad algunos compuestos clasificados como cuadrados tienen moléculas lo suficiente-

mente cerca como para ser consideradas dentro de la esfera de coordinación. Esto significa que su geometría es en realidad pirámide cuadrada u octaedro distorsionado. Es también frecuente que los cuatro ligantes no se encuentren en un plano, sino que se distorsionen hacia una geometría tetraédrica. Sin embargo, no se han encontrado compuestos de cobre (II) que formen un tetraedro regular.

El número de coordinación cinco es bastante común y la geometría preferida es la pirámide cuadrada. En esta geometría es común que el ligante axial se encuentre a mayor distancia que los cuatro ligantes en el plano y que el ion cobre salga ligeramente del plano formado por éstos en dirección del quinto ligante. De la misma manera que en el número de coordinación cuatro, estos compuestos tienden a extender su esfera de coordinación a seis, ya sea uniéndose a otro ligante o mediante enlaces metal-metal, formando dímeros. Existen algunos compuestos que forman una bipirámide trigonal, sobre todo con ligantes sencillos como Cl^- , aunque las distancias axiales son menores que las ecuatoriales.

El número de coordinación más común es el de seis. Sin embargo, debido al efecto Jahn-Teller, prácticamente no se forman octaedros regulares. La distorsión más común es la elongación tetragonal, pero la versatilidad del Cu(II) permite la existencia de una gran variedad de distorsiones, muchas de las cuales se encuentran en sistemas biológicos.

Cobre (III)

Durante mucho tiempo el estado de oxidación III para el cobre fue considerado raro y sin importancia y, por lo tanto, fue estudiado escasamente. Actualmente se sabe que el Cu(III) participa en reacciones redox catalíticas en muchos sistemas biológicos.

La química de coordinación del cobre (III) es similar a la de otros iones con configuración d^8 , como Co(I) , Ni(II) , Pt(II) y Au(III) . Sus compuestos presentan usualmente números de coordinación cuatro, cinco y seis.

El número de coordinación cuatro es relativamente común y los complejos presentan la geometría plana cuadrada. A diferencia del Cu(II) , los compuestos de Cu(III) con número de coordinación seis forman octaedros regulares. Esta geometría se ha observado con ligantes que tienen átomos de oxígeno y nitrógeno, como la etilendiamina y el agua. Por lo tanto, el Cu(III) tiene una menor variedad de geometrías que el Cu(II) . Se ha observado que la mayoría de los compuestos de coordinación con Cu(III) son cinéticamente inertes, lo que limita (pero no excluye) su participación en sistemas biológicos.

La hemocianina

La historia de la hemocianina data del año de 1867, cuando fue reportado que la sangre de los cefalópodos se tornaba azul al pasar ésta a través de las branquias (Bert, 1867). En la siguiente década, en 1878, el fisiólogo belga León Frederiq mostró que el color azul era causado por la oxigenación del cobre que contenía la proteína, proceso que era reversible. A esta proteína le llamó hemocianina. Para 1932, ya había sido investigada la asimilación de oxígeno por la hemocianina en 13 especies de animales. Para cada caso se encontró que la molécula de hemocianina poseía n átomos de cobre, y cuando la molécula estaba totalmente oxigenada contenía una molécula de oxígeno por cada dos átomos de cobre (Senozan, 1976).

De los siete pigmentos respiratorios producidos en la naturaleza, cuatro de ellos contienen un grupo hemo: hemoglobina, mioglobina, eritrocruorina y clorocruorina, y transportan una molécula de oxígeno por cada átomo metálico. Los otros tres: hemocianina, hemoritrina y hemovanadina, no poseen el grupo hierro-hemo. La hemoritrina, pigmento de bajo peso molecular, ha sido encontrado en algunos animales marinos primitivos. Esta molécula, al igual que la hemocianina, toma una molécula de oxígeno por cada dos átomos metálicos. Otro caso es el de la hemovanadina, en donde se ha especulado sobre la posibilidad de un comportamiento similar al de la hemocianina, pero hasta la fecha no se ha podido establecer este comportamiento.

En 1976, Senozan llevó a cabo una investigación acerca de la hemocianina, nombre que está mal utilizado ya que no tiene ningún grupo hemo: el cobre está unido directamente a la proteína. Esta unión es fuerte, como se puede apreciar de la constante de disociación calculada para la pérdida de un átomo de cobre, la cual es del orden de 10^{-20} . Sin embargo, el sitio de unión del átomo de cobre no estaba bien esclarecido, aun cuando se contaba

con evidencia circunstancial de que posiblemente los grupos sulfhidrilos del aminoácido cisteína y los anillos imidazólicos de la histidina estuvieran involucrados en el enlace con el metal.

En el estado en el que la hemocianina no contiene oxígeno, el cobre está en estado de oxidación $1+$. Esto se ha comprobado por diversos experimentos. Por ejemplo, diversos agentes quelantes específicos para el Cu^+ pueden sacar al metal de la proteína y las moléculas activas de hemocianina que han perdido el metal pueden ser regeneradas utilizando iones cuprosos.

La hemocianina siempre se encuentra en la sangre, pero a diferencia de la hemoglobina no se encuentra confinada dentro de células especiales, sino que existe como un soluto libre en el disolvente. La concentración puede ser apreciable en algunos animales que pueden tener más de 10 g de hemocianina/100 mL.

La hemocianina se encuentra sólo en dos *phyla* del reino animal: en los moluscos y en los artrópodos (Figura 1). Dentro de los artrópodos se ha encontrado en todos los crustáceos decápodos y dentro de los moluscos en todos los cefalópodos. No obstante, en estos dos *phyla* la distribución de hemocianina es errática. En el caracol comestible se encuentra en grandes cantidades, pero en la especie equivalente de agua dulce *Planorbis* no se ha encontrado hemocianina; asimismo, se ha encontrado hemocianina en cierto tipo de escorpiones y arañas.

El proceso mediante el cual se irriga la sangre en los organismos que utilizan como pigmento respiratorio la hemocianina (Ville *et al.*, 1987) se conoce como sistema circulatorio abierto, por el hecho de que el corazón bombea la sangre hacia vasos sanguíneos cuyos extremos están abiertos. La sangre, por tanto, escurre hacia afuera de ellos llenando la cavidad del cuerpo y bañando de esta manera las células. La sangre regresa al corazón a través de unos orificios de la pared de éste (o a través de vasos sanguíneos que conducen al corazón). El movimiento de

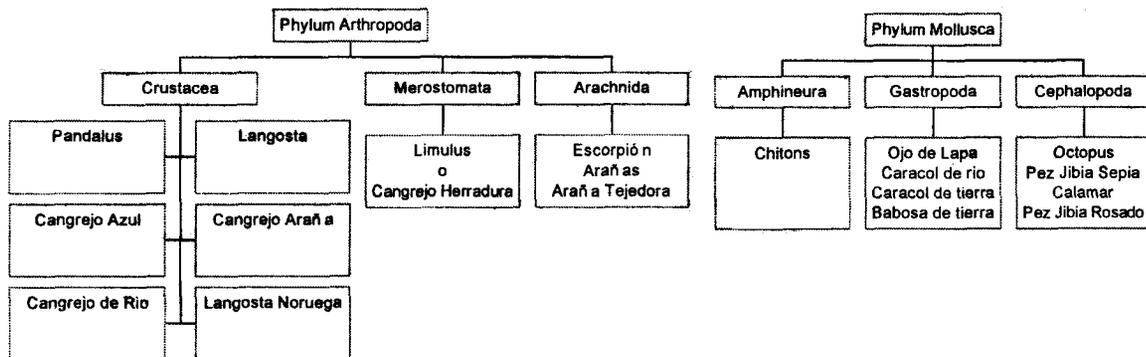


Figura 1. *Phyla* en los que se encuentra la hemocianina como pigmento sanguíneo.

la sangre a través de un sistema abierto no es tan rápido y eficaz como el que ocurre en el interior de un sistema cerrado.

La cantidad de hemocianina contenida en la sangre varía grandemente en las diferentes especies y también puede variar aun dentro de los miembros de la misma especie. En algunos casos la hemocianina desaparece completamente durante la época de muda, como es el caso del cangrejo araña *Maia*.

Existen grandes diferencias entre la hemocianina de los moluscos y los artrópodos. En los primeros se tiene aproximadamente un 0.25% en peso de cobre y en los crustáceos un 0.17%. Esta diferencia ha hecho que ciertos zoólogos consideren desde el punto de vista evolucionista que ambas hemocianinas no están relacionadas y que los artrópodos y moluscos han desarrollado sus pigmentos respiratorios independientemente. Otros consideran que existe una relación entre ambos tipos de hemocianinas y consideran que ambas están constituidas de la misma "unidad fundamental".

Oxígeno y hemocianina

El equilibrio entre el oxígeno y la hemocianina se puede describir de mejor manera mediante la asociación o disociación del oxígeno. En la figura 2 se muestra la oxigenación de la hemocianina en comparación con la oxigenación de otros pigmentos respiratorios. La oxigenación se da en términos de porcentaje de saturación, es decir, por el cociente entre el número de moles de O₂ que posee el pigmento, en las condiciones dadas, entre el máximo número de moles de O₂ que puede asimilar. En esta gráfica se puede observar cómo la saturación sucede a menor presión en la hemoglobina humana (Hb) y la mioglobina humana (Mb), que en la hemocianina del caracol *Helix pomatia* y la langosta Maine (Hc). Cada una de estas moléculas tienen diferentes afinidades hacia el oxígeno. Esta afinidad puede incrementarse a medida que se incorporan las moléculas de oxígeno, como es el caso de la hemoglobina humana que posee cuatro sitios de unión por molécula. Este incremento progresivo en la afinidad por el oxígeno conforme los sitios son ocupados se conoce como "cooperatividad positiva". Sin embargo, la hemocianina presenta otro mecanismo para incrementar su afinidad por el oxígeno.

Disociación y asociación de la hemocianina

Las moléculas de hemocianina existen como agregados de una unidad fundamental. En los artrópodos, la unidad fundamental tiene un peso molecular de cerca de 75,000, que es igual al peso de un sitio de unión; en los moluscos el peso de la unidad fundamental está en el intervalo de

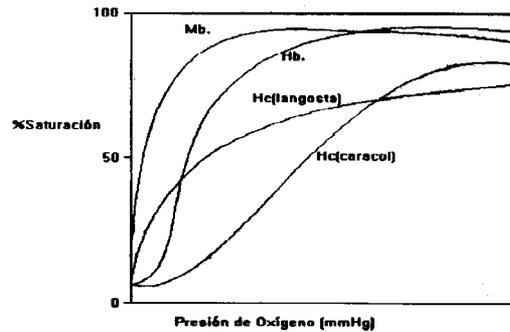


Figura 2. Porcentaje de saturación para distintos pigmentos respiratorios.

380,000-450,000. El patrón de agregación para ambos *phyla* es muy distinto; en los artrópodos las moléculas están formadas de 6, 12, 24 ó 48 unidades fundamentales y en los moluscos de 2, 10 y 20 unidades fundamentales (Van Holde, Van Bruggen, 1971).

La agregación o disociación de las moléculas de hemocianina está influenciada por el pH y por la presencia de sales. Los iones de magnesio y calcio promueven la agregación. En soluciones casi neutras se favorecen grandes agregaciones y a pHs altos y bajos las unidades fundamentales se disocian completamente.

Van Holde y sus colaboradores descubrieron que el estado de agregación también depende del grado de oxigenación. Para la hemocianina de calamar encontraron que en ambas especies, la totalmente oxigenada y la totalmente desoxigenada, existen como agregados de 59 unidades. Sin embargo, a aproximadamente 80% de oxigenación, el pigmento se rompe en agregados de veinte y once unidades. Este comportamiento no es igual en la hemocianina de todos los organismos, ya que en algunos casos a medida que la oxigenación aumenta se puede disociar en agregados más pequeños o, por el contrario, se puede agregar en grandes unidades.

En la actualidad se sabe que la molécula de hemocianina puede adoptar dos conformaciones distintas: la forma agregada y la disgregada (Miller, Van Holde, 1974), cada una de las cuales posee distinta afinidad por el oxígeno: la desoxi-hemocianina se encuentra preferentemente en la conformación de poca afinidad hacia el oxígeno (forma disgregada), a saturación intermedia las dos formas conformacionales están presentes, y en soluciones altamente saturadas la conformación de alta afinidad es la predominante (forma agregada). Esto se explica con base en la cooperatividad, mediante la cual progresivamente aumenta la afinidad por O₂ a medida que transcurre la oxigenación. Asimismo, para la existen-

cia de estas conformaciones se requiere la presencia de iones divalentes calcio y magnesio.

En 1976, Sullivan y su equipo de trabajo informaron del aislamiento de los componentes y la diferenciación estructural de la hemocianina del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*). Esta proteína es de alto peso molecular y está compuesta por aproximadamente ocho tipos de subunidades, todas con pesos moleculares similares entre 65,000 y 70,000. Por cromatografía de intercambio iónico a pH alto, en presencia de EDTA, se separaron cinco fracciones de hemocianina, tres de las cuales se pudieron analizar por electroforesis. De las conclusiones más importantes de estos experimentos se encontró que todas las hemocianinas aisladas poseían dos átomos de cobre por cada cadena polipeptídica, es decir, cada una de las hemocianinas separadas poseía un sitio activo. Además, en las fracciones de menor peso molecular la afinidad por el O₂ y el CO se vieron alteradas.

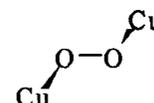
Estructura de la hemocianina

Uno de los problemas más interesantes en el estudio de las hemocianinas ha sido la determinación de la estructura del complejo formado cuando el oxígeno se coordina a la hemocianina (oxi-hemocianina). Este estudio ha involucrado a diversos grupos de investigación y ha durado muchos años. Aún en la época actual se siguen haciendo experimentos que permitan confirmar o refutar las estructuras propuestas para la oxi-hemocianina. Debido a las dificultades existentes para estudiar al sistema *in vivo*, la mayoría de estos estudios consisten en sintetizar compuestos que modelen el centro metálico de la hemocianina y de la oxi-hemocianina y caracterizarlos por medio de técnicas espectroscópicas y de rayos X.

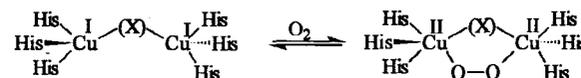
En 1977, Thamann *et al.* llevaron a cabo un estudio por resonancia Raman de la molécula de oxi-hemocianina utilizando la hemocianina del *Cancer magister* y del *Bussycon canaliculatum* con oxígeno marcado. Previamente habían determinado la frecuencia de vibración en la molécula de O-O de las proteínas, asignando las bandas en 744 cm⁻¹ y 749 cm⁻¹; cuando utilizaron ¹⁸O₂ las bandas se desplazaron hacia 704 cm⁻¹ y 708 cm⁻¹, respectivamente. Estas frecuencias indicaban que el oxígeno estaba unido como un ion peróxido en la oxi-hemocianina y que la unión del oxígeno se llevaba a cabo por un proceso de adición oxidativa, en el cual la molécula de O₂ era reducida y los dos átomos centrales de Cu(I) de la desoxi-hemocianina eran oxidados a Cu(II). Al llevarse a cabo este proceso la hemocianina cambiaba de incolora a un color azul.

En los espectros de UV-visible no se observan bandas para el cobre en la desoxi-hemocianina, y tampoco en los espectros de RSE (resonancia del espín electrónico), lo que indica que el cobre tiene una configuración *d*¹⁰ correspondiente a un ion cuproso.

Posteriores análisis de rayos X revelaron que la distancia Cu-Cu en la oxi-hemocianina es de 3.6 Å. Así, la estructura que mejor explicaba las propiedades espectrales y la descripción de orbitales moleculares del sitio activo de la hemocianina era la estructura no plana:



A pesar de que la oxi-hemocianina contiene dos iones Cu(II) con configuración *d*⁹, es una molécula diamagnética. Esto se ha explicado proponiendo un acoplamiento entre los dos núcleos metálicos que da lugar a un arreglo electrónico antiferromagnético, lo que hace que la oxi-hemocianina no exhiba paramagnetismo. Esta característica había hecho suponer que los dos núcleos de cobre estaban enlazados mediante un ligante puente, además de la molécula de oxígeno, siendo este ligante el responsable del acoplamiento antiferromagnético. La estructura propuesta para la oxi-hemocianina era:



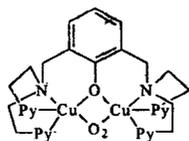
Los primeros ligantes propuestos como puente (X), fueron residuos de proteínas como fenóxido de tirosina o alcóxido de serina. Sin embargo, los análisis de rayos X permitieron descartar esta hipótesis y se propuso que el ligante fuera el ion hidroxilo. Esta hipótesis se mantuvo hasta 1992, dado que los datos experimentales no permitían rechazarla ni confirmarla.

Con respecto al estado de oxidación de los iones cobre, los resultados eran muy confusos; entre los experimentos que se llevaron a cabo se hizo reaccionar la biquinolina (Klotz y Klotz, 1955), que es un agente que forma distintos complejos de color rosa con los iones cuprosos, con la hemocianina. Se encontró que la mitad de los átomos de cobre reaccionaban con el reactivo; esto sugería que la mitad del cobre en la molécula de la oxi-hemocianina estaba en estado de oxidación 1+, y la otra mitad en estado de oxidación 2+. Los espectros de UV-visible para la oxi-hemocianina revelaron que efectivamente la molécula contenía cobre 2+. Sin embargo, por espectroscopía de resonancia de espín electró-

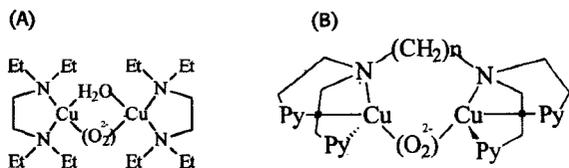
nico no se observó la señal esperada para cobre (II). Para explicar este hecho, se consideró que el cobre en la oxi-hemocianina se encontraba como iones cúpricos y se atribuyó la "incongruencia" de este espectro a un efecto antiferromagnético acoplado entre los dos átomos de cobre (Gray, 1971). Esto se puede interpretar como si el metal fuese en parte covalente, con lo que su comportamiento podría parecer que en algunos momentos fuera el de un ion cuproso y en otros como un ion cúprico.

Los compuestos sintetizados como modelos de la hemocianina deben de reproducir las propiedades químicas y espectroscópicas, además de llevar a cabo las principales reacciones de la proteína; en este caso unirse reversiblemente al oxígeno.

Aun cuando se conoce desde hace tiempo la presencia del ion peróxido en la oxi-hemocianina, fue a partir de 1984 que se tuvo más información acerca del complejo de cobre peroxo dinuclear, cuando el grupo de investigación dirigido por K.D. Karlin aportó la primera evidencia sólida de este complejo. Este grupo sintetizó un complejo dinuclear de cobre (I), el cual reaccionaba reversiblemente con oxígeno dando lugar al siguiente compuesto:

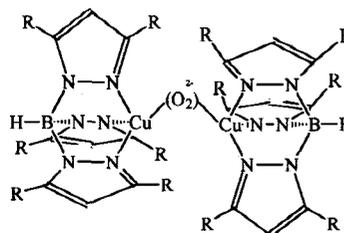


Los estudios por espectroscopía de resonancia Raman demostraron que el oxígeno estaba formando un complejo peroxo dinuclear. Sin embargo, el ion peróxido resultó estar coordinado asimétricamente, a diferencia de la coordinación simétrica propuesta para la oxi-hemocianina. Posteriormente, el mismo grupo preparó dos complejos de cobre peroxo dinucleares con las siguientes estructuras:



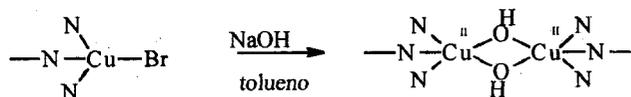
El compuesto A reproducía razonablemente bien el comportamiento magnético y espectroscópico de la oxi-hemocianina, pero su inestabilidad impidió confirmar el enlace O-O; mientras que el compuesto B presentaba propiedades espectroscópicas diferentes a las de la oxi-hemocianina.

De esta manera, hasta 1988 aún no se conocía ningún sistema bien caracterizado que reprodujera el comportamiento fisicoquímico de la oxi-hemocianina. Entre 1988 y 1989 el grupo de investigación de Kitajima (Kitajima *et al.*, 1994) sintetizó complejos de cobre (II) peroxo dinucleares utilizando como ligante al tris(pirazolil)borato:

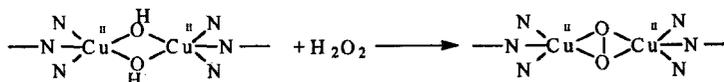


Este compuesto tiene características muy similares a las de la oxi-hemocianina: es diamagnético, el ion peróxido se coordina simétricamente, su espectro electrónico presenta las mismas bandas de absorción características de la hemocianina y las distancia entre los dos núcleos de cobre es de 3.6Å. Esto hizo pensar que el oxígeno en la oxi-hemocianina se puede coordinar de la misma forma que en este compuesto, por lo que se profundizó la investigación sintetizando compuestos similares para caracterizarlos totalmente y obtener su estructura cristalina.

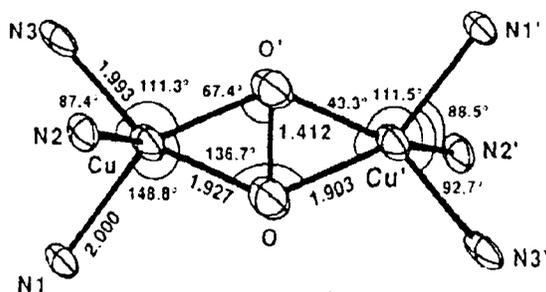
En 1993 este mismo grupo sintetizó el siguiente compuesto, donde el ligante es el tris(pirazolil)borato:



En esta estructura, los dos monómeros están puenteados por dos grupos hidroxilo formando el complejo dinuclear. Posteriormente este compuesto fue tratado con agua oxigenada a baja temperatura, obteniendo así el complejo peroxodinuclear deseado:



Un estudio de rayos X del compuesto permitió conocer la geometría del centro metálico:

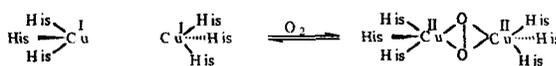


Aquí se puede ver que los dos iones cobre están unidos entre sí por un ion peróxido formando la estructura dinuclear. La distancia O-O y Cu-O se encuentra dentro de los intervalos esperados, pero este tipo de estructura es completamente diferente de la esperada. Dos de los enlaces Cu-N son cortos (2.0Å, N1 y N3), mientras que el tercero (N2) es considerablemente más largo (2.58Å), lo que reproduce la estructura conocida de la hemocianina. Los ligantes se acomodan alrededor del cobre formando una pirámide cuadrada distorsionada, donde la base está formada por los dos átomos de oxígeno y los dos nitrógenos más cercanos del tris(pirazoil)borato, mientras que la punta la forma el nitrógeno más alejado.

Por lo tanto, este ligante parece coordinarse de manera muy similar a la histidina, el ion peróxido se coordina de manera bidentada con el cobre de un modo denominado $\mu\text{-}\eta^2\eta^2$. Es importante notar que, tanto en este compuesto como en la oxi-hemocianina, la frecuencia de vibración oxígeno-oxígeno es inusualmente baja, 741 cm^{-1} , cuando el valor normal de esta vibración se encuentra entre 800 y 900 cm^{-1} . Una explicación para este comportamiento se puede obtener a partir de cálculos de orbitales moleculares para el complejo peroxo-dicúprico, en donde se muestra una interacción de retrodonación entre el cobre (II) y el orbital σ de antienlace del oxígeno de considerable importancia. Como esta interacción se lleva a cabo con un orbital de antienlace de ion peróxido, debilita el enlace oxígeno-oxígeno, lo que provoca que su frecuencia de vibración disminuya.

Otro resultado importante con este compuesto es la demostración de que, contrariamente a lo que se pensaba anteriormente, el ion peróxido permite el acoplamiento antiferromagnético del los iones Cu (II), provocando que la oxi-hemocianina sea diamagnética. Por lo tanto, no hay necesidad de un ligante extra que sirva de puente entre los iones cobre. El compuesto sintetizado es diamagnético con una susceptibilidad magnética de

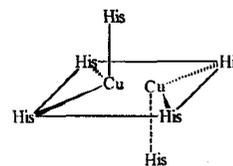
$0\text{ m}_B/\text{mol}$. La reacción de oxigenación de la hemocianina puede representarse como:



A partir de sus resultados y haciendo comparaciones con los datos conocidos para la oxi-hemocianina, estos investigadores propusieron que ésta se coordina al oxígeno de la misma manera que en los compuestos que ellos sintetizaron, es decir en el modo $\mu\text{-}\eta^2\eta^2$.

Como ésta, existen muchas otras investigaciones recientes que permiten tener cada vez más información y por lo tanto más conocimientos sobre estas importantes proteínas de cobre. Los resultados de más de dos décadas de investigaciones sobre la hemocianina y la oxi-hemocianina han permitido llegar a las siguientes conclusiones sobre la estructura del sitio activo: cada ion cobre en la desoxi-hemocianina se encuentra coordinado a tres nitrógenos imidazólicos de las cadenas proteicas, con una distancia Cu-Cu de 3.54Å .

Las esferas de coordinación de los dos iones cobre consisten de dos enlaces cortos Cu-N (1.95 a 2.10Å) y de uno notablemente más largo Cu-N (2.66 a 2.77Å). Los cuatro nitrógenos con enlaces cortos y los dos iones cobre forman un plano y los otros dos ligantes son axiales, y se encuentran en extremos opuestos del plano, es decir, que la configuración de los ligantes axiales es *trans*, como lo muestra la siguiente figura:



Esta estructura del sitio activo en la desoxi-hemocianina es bastante similar a la del centro dinuclear del compuesto del cual se obtuvo la estructura por rayos X, en donde el ion peróxido puede entrar fácilmente entre los dos iones cobre sin causar grandes cambios estructurales.

Finalmente, aunque en este trabajo, así como en las investigaciones mencionadas, la atención se ha centrado en la estructura del sitio activo de la hemocianina y en

la forma de coordinación del ion metálico, no hay que olvidar que la parte orgánica formada por las proteínas es también de suma importancia para el funcionamiento de la hemocianina y que su conformación puede afectar la estructura del sitio activo, por lo que aún queda mucho por conocer acerca de estas proteínas.

Esto quiere decir que para poder comprender la estructura y funcionamiento de ésta y otras metaloproteínas es necesario el trabajo conjunto de químicos de muchas ramas y no se debe subestimar la importancia de ninguno de los constituyentes de la molécula.

Referencias

Bert, P., *C.R., Hebd. Sciences Acad. Sci.*, **65**, 300 (1867).
 Gagné, R.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **98:21**, 6709 (1976).
 Gray, H.B., *Bioinorganic Chemistry*, Eds. Gould, R.F., American Chemical Society, Washington, 1971.
 Jameson, R.F., "Coordination Chemistry of Copper with Regard to Biological Systems", en *Metal Ions in Biological Systems. Volume 12. Properties of Copper*, Eds. Siegel H., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1981.
 Kitajima, N., Fujisawa, K., Fujimoto, C., Moro-oka, Y.,

Hashimoto S., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1277 (1992).
 Kitajima, N., Fujisawa, K., Hikichi, S., Moro-oka, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7874-7875 (1993).
 Kitajima, N., Moro-oka, Y., *Chem. Rev.*, **94:3**, 737 (1994).
 Klotz, I.M., Klotz, T.A., *Science*, **121**, 477 (1955).
 Lontie, R. y Witters, R., "The Active Sites of Molluscan and Arthropodan Hemocianins", en: *Metal Ions in Biological Systems. Volume 13. Copper Proteins*, Eds. Siegel H., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1981.
 Magnus, K., Ton-That, H., Carpenter, J.E., *Chem. Rev.*, **94:3**, 727 (1994).
 Miller, K., Van Holde, K.E., *Biochemistry*, **13**, 1668 (1974).
 Senozan, N.M., *J. Chem. Educ.*, **53:11**, 684 (1976).
 Sullivan, B., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Godette, G., *J. Biol. Chem.* **251:23**, 7644 (1976).
 Thamann, T.; Loehr, J.S., Loehr, T.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **99:12**, 4187(1977).
 Van Holde, K.E., Van Bruggen, E.F.J., *Subunits in Biological Systems, Part A*, Eds. Timasheff, S.N., Fasman, G.D., Marcel Dekker, Inc., New York, 1971.
 Ville, C.A., Solomon, E.P., Davis, P.W., *Biología, Interamericana*, México, 1987.

Respuestas al calendario de EDUCACIÓN QUÍMICA

NOVIEMBRE

- 1 Ir al chorro del agua y enjuagar generosamente hasta que no sientas ardor en la parte afectada.
- 2 Lavoisier. Fue decapitado por ser recaudador de impuestos para la monarquía.
- 3 En 1749, Daniel Rutherford. Se le atribuye el descubrimiento por ser el primero en publicarlo.
- 4 4.0
- 5 Rh In. Y el río Po sólo necesita uno.
- 6 La yema no contiene vitamina C.
- 7 Verdadero. El calentamiento es más uniforme que en las sartenes de aluminio.
- 8 Sí, en Uruguay.
- 9 5,730 años.
- 10 Del Real Seminario de Minería de México.
- 11 Priestley, Cavendish, Sheele.
- 12 Nitrógeno, fósforo y potasio.
- 13 El aluminio.
- 14 La baquelita, de ahí su nombre.
- 15 Vanadio.
- 16 El flúor se utiliza para reducir la formación de caries.
- 17 A María, por supuesto.

- 18 $C_{36}H_{70}CuO_4$.
- 19 El uranio.
- 20 Sí, el xenón se descubrió en 1898.
- 21 Óxido de aluminio con suficiente óxido crómico par darle el color rojo.
- 22 Americio, Berkelio y Californio.
- 23 Johannes D. van der Waals.
- 24 El germanio, el galio.
- 25 Vitamina E.
- 26 Principalmente de fosfato de calcio.
- 27 Termodinámica de procesos irreversibles.
- 28 Extranjero o extraño.
- 29 Veintinueve.
- 30 Clorotetraciclina.

DICIEMBRE

- 1 El ácido benzoico (122.12).
- 2 Dos.
- 3 A toda acción corresponde una reacción.
- 4 La vitamina C y la vitamina E.

continúa en la pág. 49