Fotosintesi

Ci occuperemo ora di quella che è probabilmente la reazione chimica più importante per la vita sulla terra, la fotosintesi, in quanto ogni forma di vita sulla terra dipende, direttamente o indirettamente da essa.

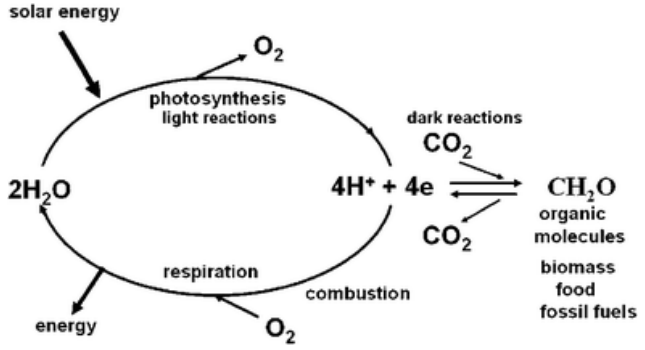
Complessivamente la fotosintesi produce composti organici ridotti e O_2 a partire da CO_2 e H_2O ed è ovviamente un **processo energeticamente sfavorito**:

$$H_2O + CO_2 \underset{\textbf{respirazione}\ (\textit{downhill catalysis})}{\overset{\textbf{fotosintesi}\ (\textit{uphill catalysis})}{\rightleftharpoons}} 1/n\ (CH_2O)_n + O_2 \qquad \Delta H = 470\ \text{kJ/mol}$$

I prodotti della fotosintesi sono dunque la sola fonte di cibo rinnovabile. Inoltre la fotosintesi ha generato, tramite l'ossidazione dell'acqua, l'atmosfera ricca di ossigeno (che tuttavia, in termini evolutivi, è stato inizialmente il prodotto più tossico che si potesse generare!), che ha avuto come conseguenza anche la formazione della fascia protettiva di ozono nella stratosfera. Questi eventi hanno consentito lo sviluppo della vita sulla terra, cioè fuori dagli oceani. Inoltre, tutti i combustibili fossili – carbone, petrolio, gas naturale – si sono formati a partire da prodotti della fotosintesi negli ultimi 2.5 miliardi di anni.

Si stima che la fotosintesi produca ogni anno più di 100 miliardi di tonnellate di biomassa (secca), che equivale a 100 volte il peso di tutta l'attuale popolazione mondiale, ed equivale anche alla produzione di circa 1 g di glucosio per m^2 di superficie fogliare all'ora. Tuttavia, l'efficienza del processo fotosintetico è modesta. Si è calcolata una efficienza massima del 4.5% per la conversione dell'energia solare in energia chimica (biomassa secca). Tuttavia nella realtà, anche in condizioni ottimali, **raramente si raggiungono efficienze dell'1%**, anche in coltivazioni intensive, adeguatamente fertilizzate e irrigate. Si stima che la fotosintesi immagazzini ogni anno 100 TW di energia, che è solo lo 0.1% di tutta l'energia solare che arriva sulla Terra in un anno. Questa energia è immagazzinata principalmente nel legno e nelle fibre di piante e alberi terrestri. L'attività fotosintetica che avviene negli oceani è quantitativamente simile, ma il carbonio così "fissato" viene rapidamente reintrodotto nella catena alimentare. Quindi, si può valutare un'efficienza complessiva globale per la fotosintesi di circa lo 0.2% però solo la metà di questa energia viene immagazzinata in biomassa.

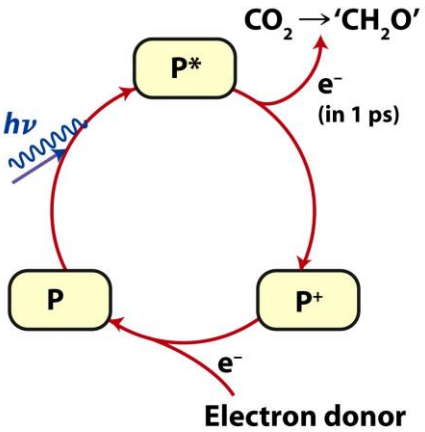
Il cuore del processo fotosintetico è lo *splitting* foto-indotto dell'acqua in ossigeno e "idrogeno". L'ossigeno viene rilasciato nell'atmosfera, e lo sfruttiamo per la respirazione e per tutte le combustioni. L' "idrogeno" (più correttamente coppie di elettroni energizzati e protoni) non viene normalmente rilasciato nell'atmosfera, ma viene invece combinato con CO_2 per produrre zuccheri e altre molecole organiche di vario tipo. Quando bruciamo i combustibili (fossili, biomassa…) per rilasciare energia, non facciamo altro che combinare l' "idrogeno" accumulato in queste molecole organiche con l'ossigeno atmosferico, completando un ciclo iniziato milioni, se non miliardi, di anni fa. La stessa cosa avviene nel processo della respirazione, che è una ossidazione controllata (metabolismo), all'interno del nostro organismo, delle molecole organiche che costituiscono il nostro cibo.



La fotosintesi viene estesamente studiata perché essa potrebbe essere la chiave per risolvere i problemi dello sviluppo mondiale. Infatti, a causa dell'aumento della popolazione mondiale e della crescita economica globale, la domanda di energia continuerà a crescere nei prossimi decenni. È quindi evidentemente necessario trovare fonti energetiche alternative ai combustibili fossili, rinnovabili e sostenibili dal punto di vista ambientale (i.e. emissione di CO_2). Un'idea ovvia è quella di sfruttare l'energia del sole. Infatti l'energia solare che raggiunge la superficie terrestre che

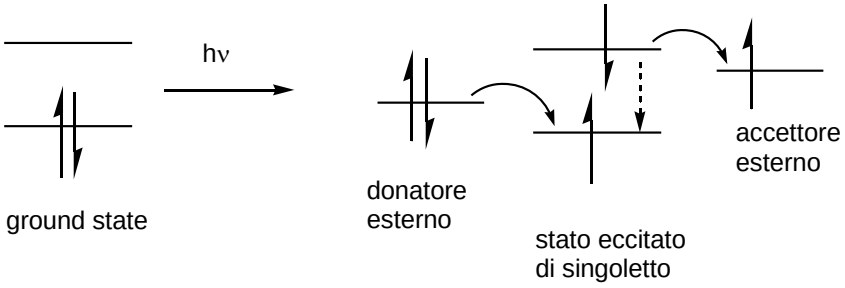
eccede di gran lunga le nostre necessità: ogni anno la terra riceve dal sole una quantità di energia pari a 100.000 TW, mentre il nostro consumo globale in un anno è circa 14 TW. Questo significa che l'energia ricevuta dalla terra in 1 ora equivale al consumo globale di un anno! L'energia solare è quindi potenzialmente una fonte di energia pulita, abbondante ed economica, ma prima deve essere catturata e convertita in forme di energie utilizzabili, come calore, elettricità ed energia chimica (cioè combustibili). In particolare la produzione efficiente di "combustibile solare" pulito e facilmente immagazzinabile sarebbe uno sviluppo di incredibile portata.

La fotosintesi avviene nelle piante, nelle alghe e anche in certi batteri (cianobatteri). Alcuni batteri primordiali, detti "*purple bacteria*" come la *Rhodopseudomonas viridis*, possiedono un apparato fotosintetico più semplice che non è in grado di ossidare l'H_2O. Per loro la fotosintesi porta alla fosforilazione di ADP ad ATP. La fotosintesi avviene nei cosiddetti sistemi fotosintetici (*photosystems*), il cui cuore è costituito dai centri di foto-reazione (P in figura).



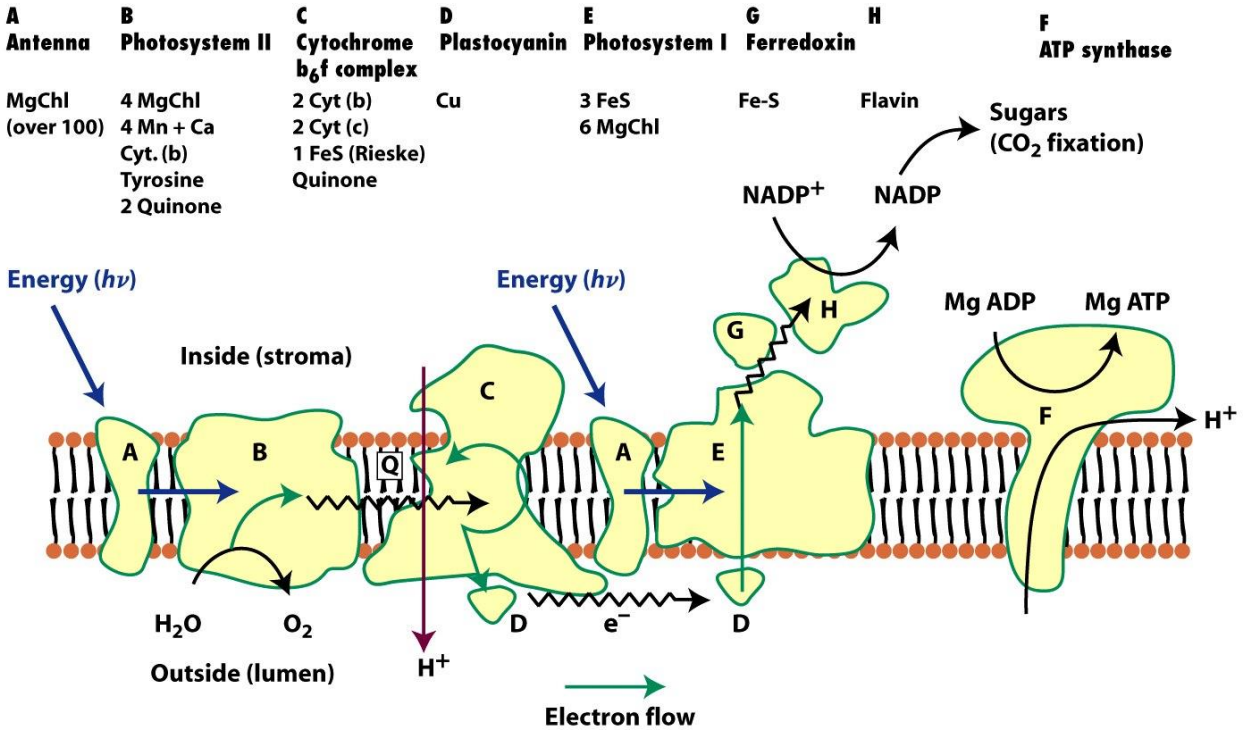
In generale, quando l'energia luminosa raggiunge un centro di reazione fotosintetico avviene lo stadio fondamentale del processo, cioè la **separazione di carica foto-indotta** che porta alla produzione separata di un componente ridotto e di uno ossidato che faranno reazioni chimiche differenti (figura).

Prima di procedere a un'analisi dettagliata delle reazioni condotte nei sistemi fotosintetici, facciamo alcune considerazioni generali: la capacità di uno stato elettronico eccitato a fungere sia come riducente che come ossidante è illustrato nel seguente diagramma di energia orbitalica:

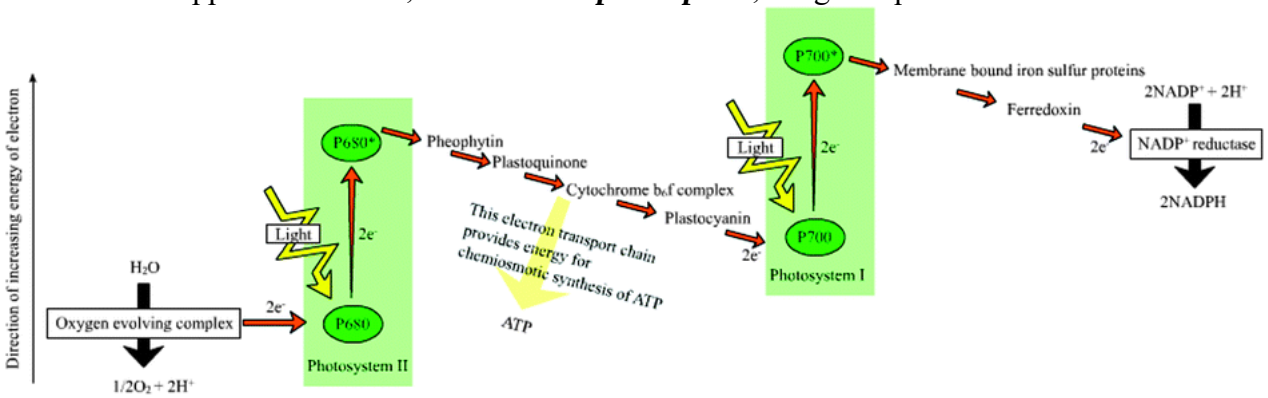


L'eccitazione elettronica crea un buco elettronico (o vacanza elettronica) in un orbitale a bassa energia che induce trasferimento elettronico da un donatore esterno (foto-ossidazione); simultaneamente, la presenza dell'elettrone eccitato in un orbitale ad alta energia precedentemente vuoto permette la foto-riduzione di un accettore esterno. Si può quindi dire che la molecola nello stato eccitato è sia un miglior riducente (con l'elettrone nell'orbitale di anti-legame) che un miglior ossidante rispetto alla molecola nel suo stato fondamentale. L'alternativa indesiderata è ovviamente la semplice ricombinazione elettrone – buco, radiativa o meno.

Gli organismi fotosintetici (piante, alghe e cianobatteri) utilizzano **due sistemi fotosintetici che operano in serie**, il cosiddetto Photosystem II (PSII) e il Photosystem I (PSI). Entrambi sono degli insiemi complessi di pigmenti e proteine costituiti da molte sub-unità e inseriti nella membrana tilacoide, la quale si trova nei cloroplasti (organuli presenti nelle cellule delle piante, al cui interno si svolge la fotosintesi). Quindi la fotosintesi è un **processo di membrana** che richiede l'immobilizzazione e la precisa orientazione dei pigmenti e dei centri di reazione coinvolti. Il processo complessivo richiede anche la presenza di molti componenti per electron-transfer, spesso a base di metalli (figura).



Sia PSII che PSI possiedono i propri "sistemi antenna", sia esterni che interni, che servono per la raccolta efficiente della luce solare e verranno descritti fra poco, e sono eccitabili separatamente, in quanto PSII ha un massimo di assorbanza a 680 nm mentre PSI lo ha a 700 nm. Questi due sistemi sono connessi in serie e vengono di solito rappresentati con un diagramma di potenziale redox detto "**a Z**" (figura). I veri centri di foto-reazione dove avviene la separazione di carica foto-indotta, sono costituiti da coppie di clorofille, i cosiddetti "***special pair***", vengono quindi chiamati **P680** e **P700**.



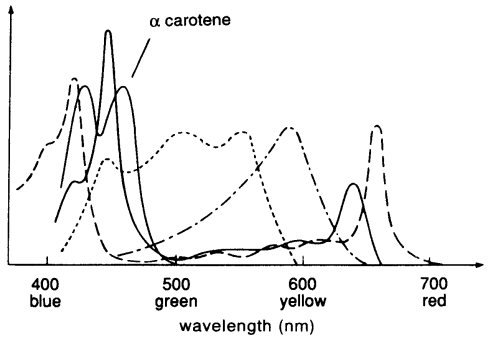
In sintesi, PSII usa l'energia della luce per estrarre coppie di protoni/elettroni dall'acqua (che diventa una fonte primaria inesauribile di equivalenti di riduzione), e il PSI sfrutta la luce per fornire ulteriore energia alle coppie protone/elettrone "energizzati" da PSII in modo da poter condurre il processo di riduzione di CO_2. Per ogni elettrone estratto dall'acqua e trasferito a CO_2 serve quindi l'energia di due fotoni. Il primo viene assorbito da PSII, che genera una specie fortemente ossidante ($P680^+$) che è in grado di operare l'ossidazione dell'acqua, e un chinone

ridotto, il plastochinolo (PQH_2) (questa parte verrà esaminata in dettaglio in seguito). L'altro fotone viene assorbito da PSI che genera una specie fortemente riducente, **NADPH** (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*), il *carrier* universale di equivalenti di riduzione, e il debole ossidante $P700^+$. In buona sostanza, dal momento che la produzione contemporanea di NADPH e O_2 richiede una differenza di potenziale più elevata di quella che può essere generata da un solo sistema fotosintetico, specialmente quando si considerino le perdite energetiche, la fotosintesi utilizza due sistemi fotosintetici in serie. Nel ciclo di Calvin (al buio) NADPH riduce CO_2 producendo zuccheri e altre molecole organiche, cioè biomassa. Il flusso di elettroni da PQH_2 a $P700^+$avviene tramite il cosiddetto "complesso citocromo b_6f" (Cyt b_6f) e una plastocianina (PC), rilasciando anche energia che converte ADP in **ATP**. L'ATP così prodotto è necessario, insieme al NADPH, per convertire CO_2 in zuccheri. Dal momento che la produzione di una molecola di O_2 richiede lo *splitting* di due molecole d'acqua, il processo complessivo comporta la rimozione di due elettroni da ogni molecola d'acqua e quindi quattro fotoni per ciascun centro di fotoreazione. In altre parole, per ciascuna coppia elettrone/protone estratta dall'acqua e usata per ridurre CO_2 serve l'energia di due fotoni (nello specifico "fotoni rossi", vedi dopo). Quindi la fotosintesi usa l'energia di almeno 8 fotoni per ciascuna molecola di O_2 che viene generata o per molecola di CO_2 che viene fissata.

Vediamo ora i principali processi della fotosintesi e soprattutto il ruolo in essi svolto dai metalli.

1) Assorbimento della luce (acquisizione di energia)

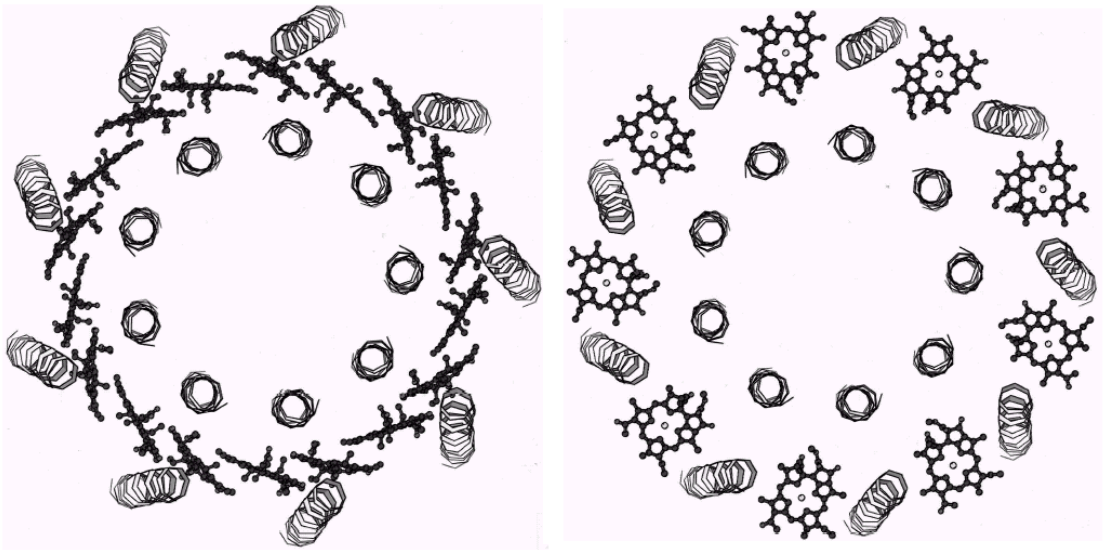
Il primo stadio della fotosintesi è l'assorbimento della luce solare. I fotoni della luce sulla superficie terrestre hanno lunghezze d'onda da circa 380 nm a più di 1000 nm, cioè coprono la zona del visibile e anche la regione del vicino IR. Per aumentare l'efficienza del processo e assorbire il maggior numero di fotoni possibili, sono presenti diversi pigmenti organici, clorofille e carotenoidi, collocati in una membrana fortemente ripiegata, la già citata **membrana tilacoide**, e quindi con elevata area superficiale per aumentare la sezione d'urto per la cattura dei fotoni. Le clorofille contengono un sistema tetrapirrolico coniugato che assorbe luce ad entrambi gli estremi dello spettro visibile (blu e giallo-arancio); le batterio-clorofille, che contengono due anelli pirrolici parzialmente idrogenati anziché uno come le normali clorofille, assorbono luce a più bassa energia, oltre il rosso nel NIR (*Near InfraRed*). I carotenoidi (che appaiono colorati in giallo e rosso) fungono da complemento alle clorofille, in modo che l'assorbimento copra tutto lo spettro; i pigmenti carotenoidi diventano visibili dopo che avviene la degradazione della clorofilla alla fine di ogni ciclo di crescita, cioè in autunno.



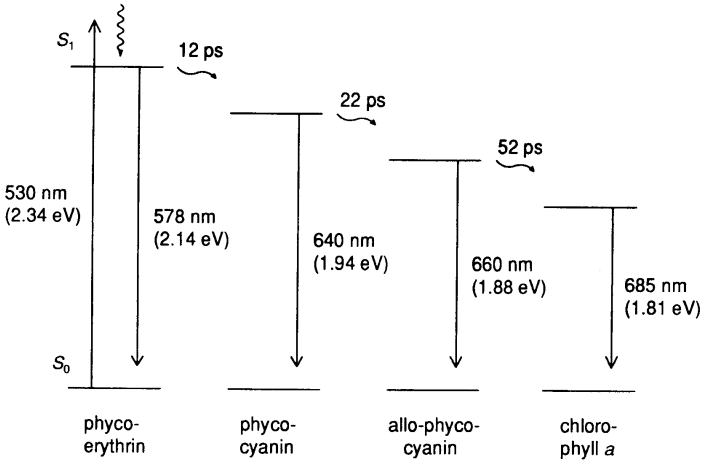
Absorption spectra of various pigments from algae and plants (according to [11]): chlorophyll *a* (— —), chlorophyll *b* (——), α-carotene (——), phycocyanin (–·–·), phycoerythrin (– – – –)

2) Trasporto diretto di energia

L'assorbimento dei fotoni da parte dei pigmenti genera stati elettronici eccitati (di singoletto) che, in linea di principio, possono dare origine a separazione di carica. A causa della densità fotonica piuttosto bassa della luce diffusa (viene assorbito meno di un fotone per pigmento per secondo), è più conveniente utilizzare la maggior parte delle molecole di clorofilla (più del 98%) in **sistemi antenna** (*light harvesting systems*, **LH**) per raccogliere i fotoni disponibili. Questo implica tuttavia che ci deve essere un trasferimento efficiente e spazialmente ben orientato dell'energia assorbita (nella forma di stati elettronici eccitati, "*excitons*") verso i veri centri di reazione, che conterranno meno del 2% delle molecole di clorofilla. Il **trasferimento di energia**, "*exciton transfer*", che non comporta movimento né di massa né di cariche, è reso possibile dalla speciale disposizione spaziale di molti cromofori di clorofilla nei sistemi antenna; essi sono spazialmente vicini gli uni agli altri e con una certa ben definita orientazione relativa. In figura sono riportate due immagini complementari della struttura ai raggi X dello stesso sistema-antenna, dalle quali si vede la disposizione spazialmente ordinata delle clorofille "infilate" nelle proteine (le "spirali").



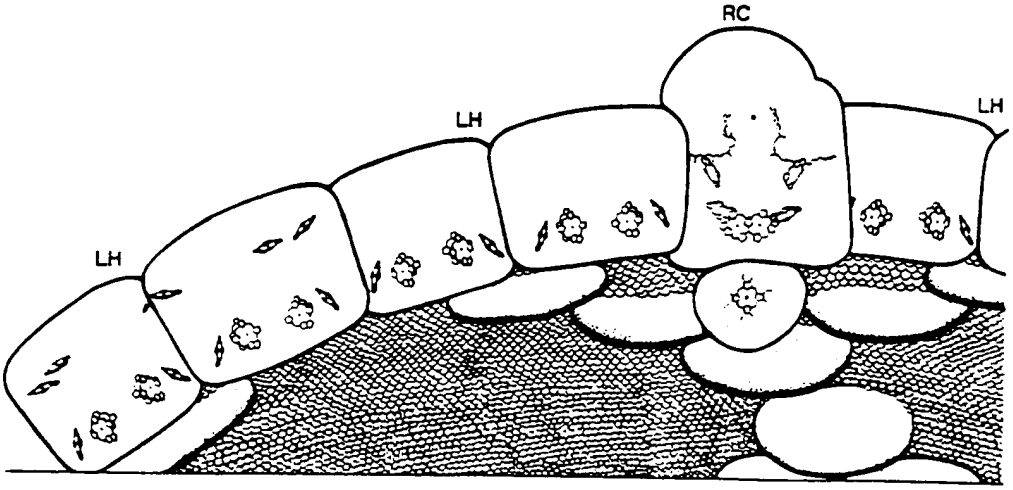
Questi sistemi sono in grado di convogliare l'energia assorbita ai centri di reazione con **efficienza del 95%** in **tempi di 10 – 100 ps** (picosecondi). Per avere il trasferimento di energia allo stato eccitato ci deve essere una sovrapposizione spettrale tra le bande di emissione della sorgente di eccitoni e le bande di assorbimento dell'accettore di eccitoni (meccanismo tipo Förster) (figura).



Energy-transfer cascade for antenna pigments in light-harvesting complexes of the algae *Porphyridium cruetum* (according to [5]). The data on the vertical arrows indicate absorption (↑) and emission (↓) wavelengths; S_0 denotes the singlet ground states, S_1 the lowest excited singlet states

Sebbene, come visto, gli organismi fotosintetici sono in grado di catturare con elevata efficienza la radiazione solare di tutto lo spettro del visibile, l'energia usata per effettuare lo *splitting* dell'acqua

e la riduzione di CO_2 equivale solo alla regione spettrale del rosso (*red photons*). I fotoni a più alta energia vengono "degradati" all'interno dei *Light Harvesting Systems*, convertendo parte dell'energia in calore, per arrivare al livello di energia di circa 1.8 eV dei "fotoni rossi" (i.e. 680 e 700 nm).
La figura successiva mostra la disposizione dei sistemi antenna (LH) e del centro di fotoreazione (RC) nella membrana di un *purple bacterium*.



Il **ruolo del magnesio nella clorofilla** è quello di contribuire alla particolare disposizione dei pigmenti; come già detto, il trasferimento efficiente di eccitoni tra i pigmenti di un'antenna richiede un elevato grado di ordine tridimensionale, cioè una orientazione spaziale relativa dei cromofori ben definita. Queste orientazioni ben definite non possono essere garantite esclusivamente dall'ancoraggio alle membrane tramite le catene alifatiche delle clorofille, ma richiedono anche la coordinazione di catene laterali amminoacidiche di proteine trans-membrana ai due siti di coordinazione assiale del metallo, in modo da garantire **tre siti** per fissare i pigmenti nella orientazione spaziale desiderata. Il Mg^{2+} è stato "selezionato" per questo compito in quanto ha le giuste dimensioni per entrare nelle clorofille, ha una sufficiente abbondanza naturale, non è redox-attivo, non ha funzioni catalitiche ed ha una elevata tendenza alla esa-coordinazione. Metalli di transizione più pesanti non sarebbero adatti perché hanno costanti di accoppiamento spin-orbita decisamente più elevate del magnesio e quindi favoriscono *intersystem crossing* dagli stati eccitati di singoletto (a tempo di vita molto breve) a stati eccitati di tripletto a tempo di vita decisamente più lungo, rallentando quindi gli eventi primari della fotosintesi, necessariamente molto rapidi. Il risultato sarebbe una competizione tra i processi chimici della fotosintesi e processi indesiderati che producono calore e/o luce.

Ossidazione dell'H_2O ad O_2 catalizzata da Mn

La fotosintesi usa un singolo sistema per condurre lo "*splitting*" dell'acqua, il cosiddetto PSII di cui vedremo in seguito in dettaglio la struttura, ma è interessante notare subito che questo sistema complesso, sviluppatosi nei cianobatteri circa 3 miliardi di anni fa, è praticamente lo stesso in tutti gli organismi fotosintetici, cioè l'evoluzione ha generato un unico catalizzatore (PSII) in grado di effettuare lo *splitting* foto-indotto dell'acqua. Come già detto, oltre al PSII gli organismi fotosintetici possiedono nella stessa membrana un altro centro fotosintetico, PSI, e i due operano in serie.
La parte ossidativa della fotosintesi delle piante,

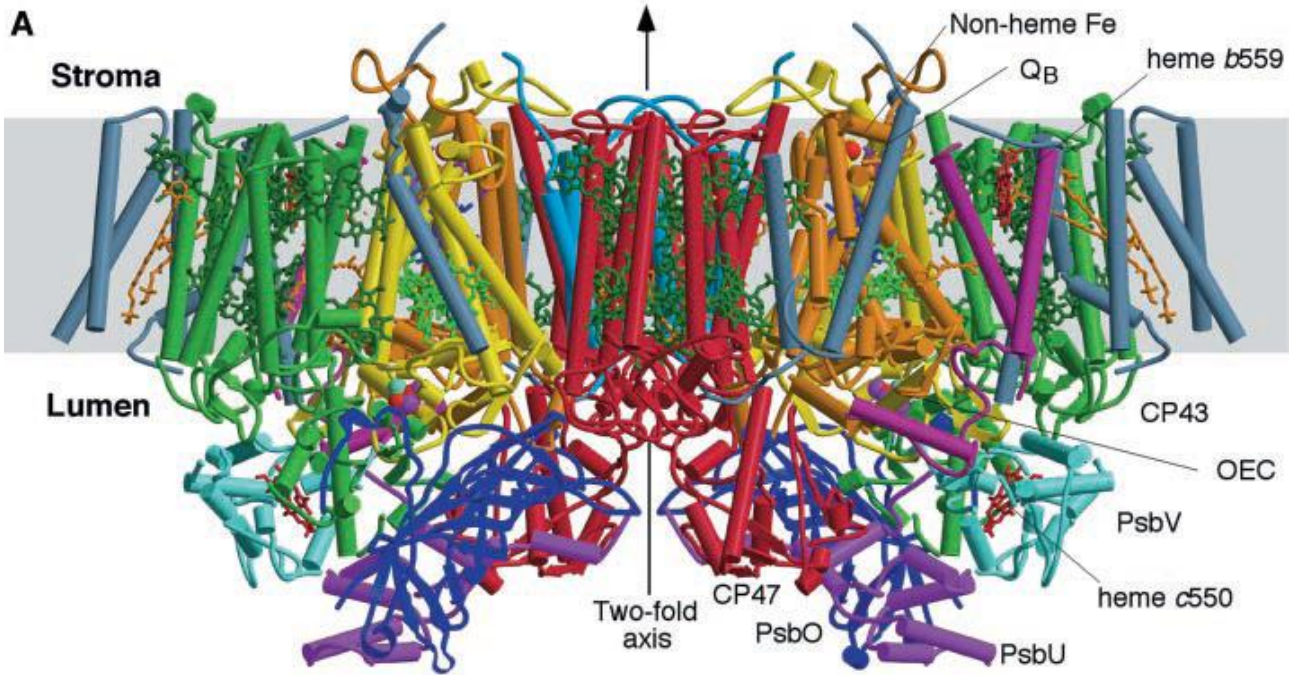
$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$$

è molto studiata dai chimici inorganici, in quanto è catalizzata da un complesso polinucleare di Mn, Mn_4Ca, il cosiddetto ***oxygen evolving complex*** (OEC, vedi dopo). Oltre a catalizzare l'ossidazione dell'acqua, PSII compie alcune funzioni comuni agli altri centri di reazione fotosintetici:

assorbimento della luce, trasferimento di energia, separazione di carica e stabilizzazione della carica.
Una funzione importante del OEC è anche quella di evitare che vengano rimossi meno di 4 elettroni, per dare specie altamente reattive (e pericolose) come OH·, H_2O_2 o O_2^- (come la citocromo c ossidasi, ma all'inverso!); deve inoltre garantire la specificità del substrato H_2O, dal momento che ci sono molte molecole più facilmente ossidabili dell'acqua.

Struttura e funzionamento del PSII

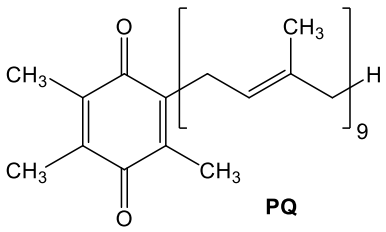
In anni relativamente recenti sono state determinate una serie di strutture ai raggi X di PSII a risoluzione progressivamente migliore, a partire dalla prima struttura pubblicata nel 2001 (risoluzione a 3.8 Å) fino a quella pubblicata su *Nature* nel 2011, con una risoluzione a 1.9 Å. I dati strutturali, insieme a una miriade di studi spettroscopici molto sofisticati, soprattutto EPR e EXAFS (*Extended X-ray Absorption Fine Structure*), e calcoli teorici hanno permesso di fare degli enormi passi avanti nel comprendere la struttura e il funzionamento di PSII.
La struttura ai raggi X del 2011 ha dimostrato che PSII è un dimero, con un asse di pseudo-simmetria C_2 perpendicolare alla membrana (dimensioni: profondità 105 Å, di cui 45 nella membrana, lunghezza 205 Å e larghezza 110 Å), in cui ciascuna unità monomera (peso molecolare 350 kDa) è composta da almeno 19 subunità proteiche. Ogni monomero contiene 36 clorofille (Chl), 2 feofitine, 11 β-caroteni, più di 20 lipidi, 2 plastochinoni, un OEC (Mn_4CaO_5), 3 o 4 ioni calcio (uno dei quali associato all'OEC), 2 ferro-eme (un eme *b*, un eme *c*), un ferro non-eme, 3 cloruri (due dei quali nelle vicinanze dell'OEC) e un bicarbonato. Il dimero contiene inoltre ben 2795 molecole di H_2O, la maggior parte delle quali formano 2 strati, uno verso la superficie del lumen e uno verso quella dello stroma. Alcune molecole d'acqua sono all'interno della membrana e la maggior parte di esse funge da legante assiale al Mg nelle clorofille. La maggior parte delle proteine di membrana sono disposte come α-eliche trans-membrana (in totale 35), cioè perpendicolari alla membrana. Fra le molte proteine che attraversano la membrana fotosintetica citiamo in particolare le proteine **D1** (cilindri gialli in figura) e **D2** (cilindri arancio) che formano il centro del PS II, sede del centro di fotoreazione (RC). Le tre proteine estrinseche Psb formano una capsula sopra il sito dove avviene la formazione di ossigeno, situata verso il lato della membrana rivolto verso il lumen, cioè l'esterno, presumibilmente per prevenire l'avvicinamento di altre molecole che potrebbero ridursi al posto dell'acqua. Le regioni trans-membrana indicate come CP 43 e CP47 contengono dei sistemi antenna.



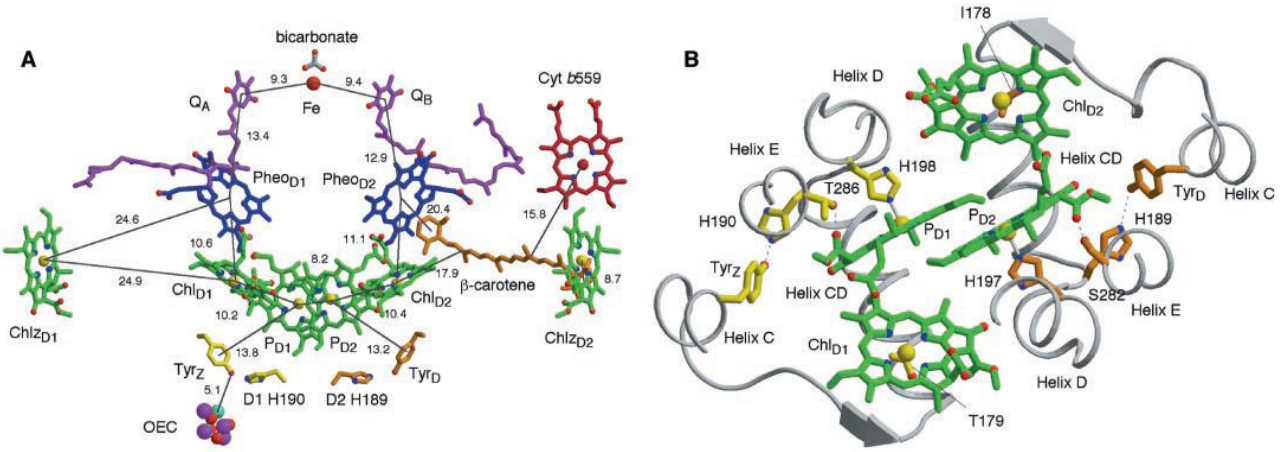
L'ossidazione dell'acqua nel PS II è gestita da una "triade" formata da un multimero di clorofille chiamato P680, un amminoacido redox-attivo (tirosina Z, Y_Z) e dall'*Oxygen Evolving Complex*,

OEC, un cluster Mn_4Ca composto da quattro ioni Mn in alto stato di ossidazione. Oltre al calcio, il cluster di Mn contiene anche ioni Cl^- strettamente accoppiati agli ioni Mn. Come appena visto, PS II attraversa tutta la membrana tilacoide nei cloroplasti e la triade per l'ossidazione dell'acqua è collocata verso il lato della membrana rivolto verso il lumen, cioè l'esterno.
Vediamo ora in dettaglio come avviene la conversione della luce in energia chimica nel PS II. La reazione complessiva condotta da PSII è l'ossidazione foto-indotta dell'acqua accoppiata alla riduzione di un chinone, il plastochinone (PQ, figura), a plastochinolo (PQH_2):

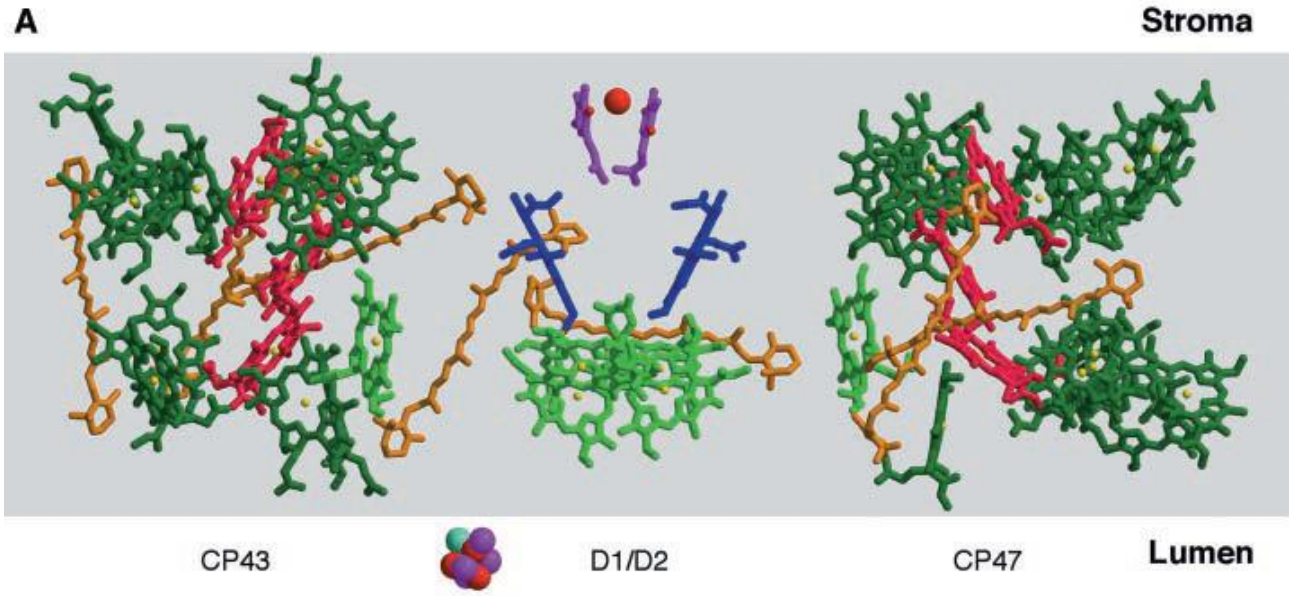
$$2H_2O + 2PQ + 4H^+_{\text{inside (stroma)}} \xrightarrow{4h\nu} O_2 + 2PQH_2 + 4H^+_{\text{outside (lumen)}}$$



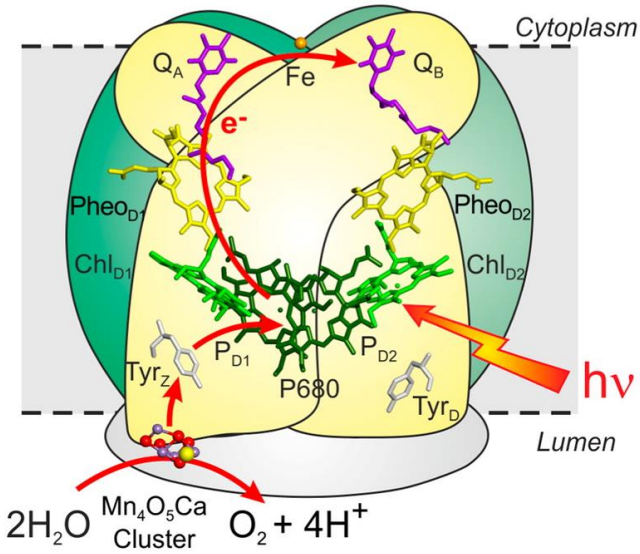
Il centro di foto-reazione (*Reaction Center*, RC) è composto da 4 molecole di clorofilla-α e 2 molecole di feofitina-α. La figura ne mostra due immagini perpendicolari (a sinistra la membrana è vista in sezione) e riporta anche le distanze in Å. Si vede che i cofattori coinvolti nei processi di trasferimento elettronico formano due rami organizzati in modo simmetrico. Infatti, il sistema è caratterizzato da un asse di pseudo-simmetria 2 perpendicolare alla membrana (e quindi alla figura) e passante attraverso il ferro non-eme che correla le eliche trans-membrana delle proteine D_1 e D_2. Le due clorofille dello *special pa*ir, P_{D1} e P_{D2}, hanno una distanza Mg···Mg di 8.2 Å; i piani delle due clorofille sono paralleli fra loro e distanziati di circa 5 Å.



La figura sotto, sempre guardando la membrana in sezione (proteine rimosse), mostra anche i due sistemi antenna interni, composti da clorofille (in verde scuro e rosso) e β-caroteni (in giallo) adiacenti a P680, da dove arriva l'*exciton transfer*.



Le reazioni che avvengono in PSII (schematizzate in figura) possono venire divise nei processi che avvengono dalla parte dell'accettore (a) e da quella del donatore (b).

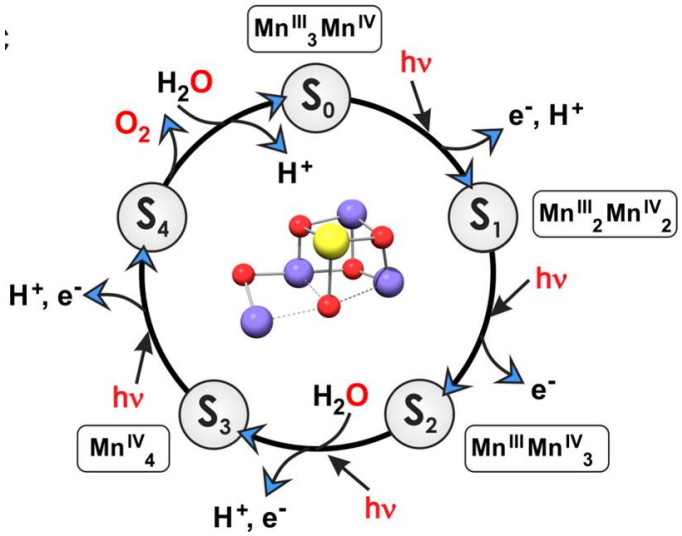


L'eccitazione del RC da parte dell'energia luminosa, o meglio dell'energia "eccitonica" convogliata dai sistemi antenna esterni ed interni, induce una separazione di carica primaria, un singolo processo di trasferimento elettronico (figura) che genera una coppia di radicali (radical-catione e radical-anione). Il radical-catione (donatore primario) è localizzato su una molecola di clorofilla ($P680^+$) e possiede un potenziale di ossidazione stimato tra +1.2 e 1.3 V (rispetto all'elettrodo standard a idrogeno), il più alto conosciuto nei sistemi biologici. Il radical-anione (accettore-primario) è un pigmento di feofitina (la feofitina-α legata alla proteina D1), ed esiste solo come transiente a vita molto breve. Lo stato a cariche separate viene stabilizzato da una serie di trasferimenti consecutivi della coppia elettrone/buco positivo che li allontanano.

a) L'accettore primario trasferisce l'elettrone in alcune centinaia di picosecondi verso lo stroma (cioè la superficie interna) a molecole di PQ legate (Q_A e poi Q_B, tramite il ferro non-eme). Il trasferimento elettronico da Q_A a Q_B avviene in tempi dell'ordine dei millisecondi. Il Fe non-eme che media il trasferimento elettronico fra Q_A e Q_B (posizionato sull'asse di pseudo-simmetria binaria) è legato a quattro istidine e a un bicarbonato. Il plastochinolato Q_B^{2-}, dopo aver preso anche due protoni (oltre ai due elettroni), viene rilasciato (Q_BH_2) nel *pool* dei plastochinoni che fa parte della membrana e viene rimpiazzato da un nuovo Q_B dal *pool* per un nuovo ciclo di riduzione e rilascio. Il plastochinolo Q_BH_2 verrà quindi ossidato dal PS I tramite

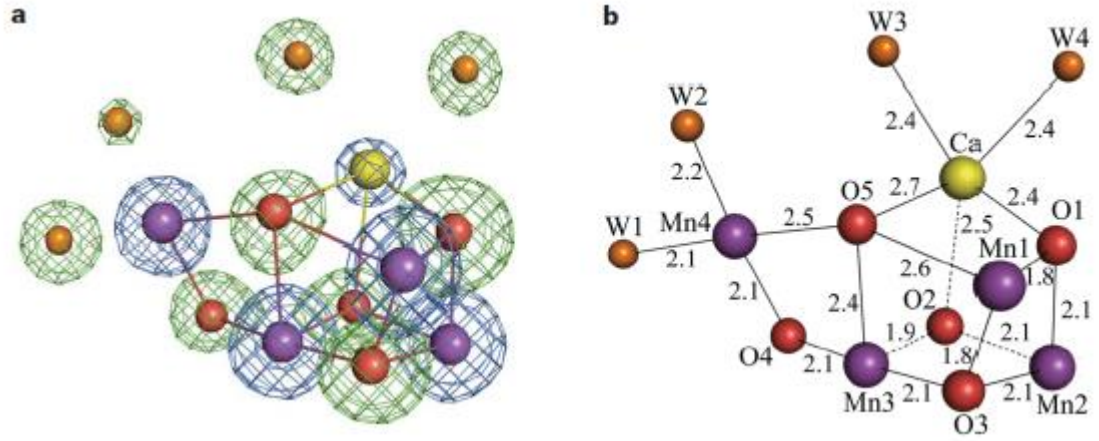
il citocromo B_6f. In altre parole, gli equivalenti di riduzione generati in questo processo sono immagazzinati temporaneamente nel plastochinolo (Q_BH_2), un trasportatore di elettroni mobile, generato dopo due eventi di assorbimento di luce/separazione di carica.

b) Intanto, $P680^+$ viene ridotto entro 100 μs dal gruppo fenolico di una tirosina redox-attiva (Y_Z) appartenente alla proteina D1 (D1-Tyr161). In questo modo la distanza tre l'elettrone e il buco aumenta progressivamente, sopprimendo le reazioni di ricombinazione. Affinché possa avvenire l'ossidazione di *splitting* dell'acqua, che deve asportare 4 elettroni, è necessario che si accumulino equivalenti di ossidazione dalla parte del donatore, in quanto RC genera soltanto una "vacanza elettronica" per ogni fotone assorbito. Gli equivalenti di ossidazione (o vacanze elettroniche, o buchi) vengono immagazzinati nel cluster tetranucleare di manganese, l'OEC, che è connesso al RC tramite Y_Z•, che è un trasportatore di una vacanza elettronica alla volta. Ossia Y_Z agisce da donatore elettronico primario nei confronti del radical-catione $P680^+$ e media il trasferimento elettronico fra OEC e $P680\cdot^+$. Per mantenere la neutralità di carica, l'**OEC rilascia protoni durante l'accumulo di equivalenti di ossidazione**. Ciò comporta un livellamento delle transizioni redox nell'OEC, a tal punto che lo stesso potenziale di ossidazione (circa 1 V) può essere usato per tutti gli eventi ossidativi. La serie di intermedi redox ben distinti che vanno a costituire il ciclo della reazione di *splitting* dell'acqua sono decritti come stati S_i nel cosiddetto **Ciclo di Kok** (figura), dove *i* indica il numero di equivalenti di ossidazione accumulati (i = 0 – 4) nel cluster Mn_4CaO_5. Lo stato S_4, che non è stato ancora caratterizzato spettroscopicamente, decade rapidamente allo stato S_0 rilasciando una molecola di O_2 (in stato di tripletto, cioè normale ossigeno molecolare) e, forse, legando una nuova molecola di acqua che fungerà da substrato nel ciclo successivo. La seconda molecola d'acqua che funge da substrato è legata labilmente al cluster Mn_4CaO_5 fino a uno stadio avanzato del ciclo, cioè tra S_2 ed S_4. Lo stato stabile al buio, cioè il *resting state* dell'enzima, è S_1. Infatti S_0 ha un potenziale così basso che viene ossidato da un altro residuo di tirosina redox-attivo, Y_D (D2-Tyr161), che non partecipa ulteriormente nel ciclo di Kok. Si ritiene che il lato D2 (destro) del PSII, detto *protective branch*, che non è esattamente simmetrico rispetto al D1 (solo D1 contiene l'OEC, e solo D2 contiene un β-carotene ed un citocromo b) funga da protezione contro possibili danni foto-indotti. Diventerebbe attivo quando l'ossidazione dell'acqua non avvenga con sufficiente velocità, per evitare che $P680^+$ (fortissimo ossidante) possa fare danni all'intero sistema in mancanza del suo substrato naturale.

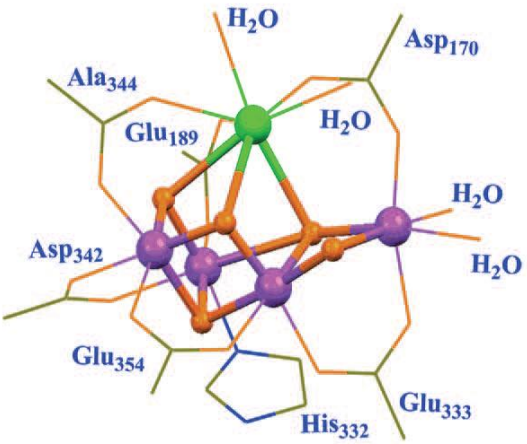


Il centro del cluster di **quattro ioni Mn**, che è situato verso il lumen, dista 18.5 Å dal centro di P_{D1} e 25.1 Å da quello di P_{D2}. La struttura ai raggi X a maggior risoluzione (1.9 Å, *Nature* 2011),

relativa allo stato S_1, attribuisce all'OEC una stechiometria **Mn_4CaO_5** con gli atomi di ossigeno a ponte fra quelli metallici (figura: Mn in viola, O in rosso e Ca in giallo, acqua in arancio). Il cluster Mn_4Ca è fortemente asimmetrico. Otto dei 10 atomi complessivi, 3 Mn, il Ca e 4 O formano una struttura a **cluster cubanoide**, in cui gli atomi metallici occupano 4 vertici e gli atomi di ossigeno gli altri 4, così che ogni atomo metallico ha tre ponti μ-osso. Le distanze di legame Ca–O sono dell'ordine di 2.4 – 2.5 Å, mentre quelle Mn–O sono più corte, 1.8 – 2.1 Å. Il quarto ione Mn (**Mn4**), collocato esternamente al cluster (*dangler*), è connesso a Mn1 e Mn3 tramite uno degli atomi di ossigeno del cubano a ponte (O5, che quindi, al contrario degli altri tre, ha una coordinazione μ_4 e infatti le sue distanze dal Ca e dai Mn sono maggiori delle altre e il cluster cubanoide non è simmetrico) e tramite l'ultimo ossigeno (O4, coordinato μ). La struttura è in ottimo accordo con i modelli ottenuti tramite spettroscopia EXAFS. In base ai dati EPR, in tutti gli stadi S_i **gli ioni Mn sono sempre ad alto spin**.

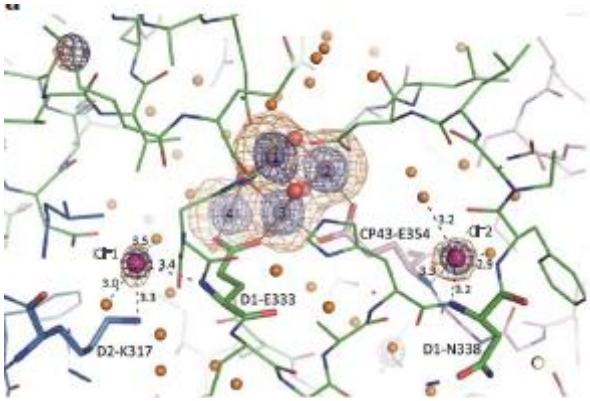


Oltre ai 5 atomi di O a ponte, sono state individuate 4 molecole d'acqua (W1 – W4) associate al cluster, due legate a Mn4 e due al Ca. Dal momento che non sono state trovate altre molecole di acqua associate agli altri tre atomi di manganese, si ritiene che alcune di queste quattro possano essere quelle che vengono ossidate, cioè le molecole substrato.

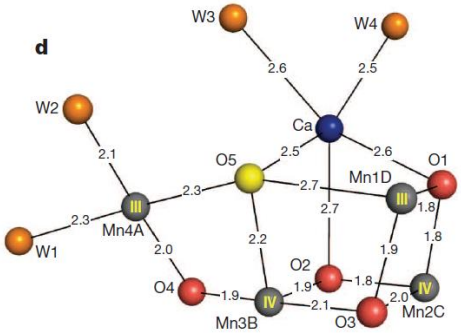


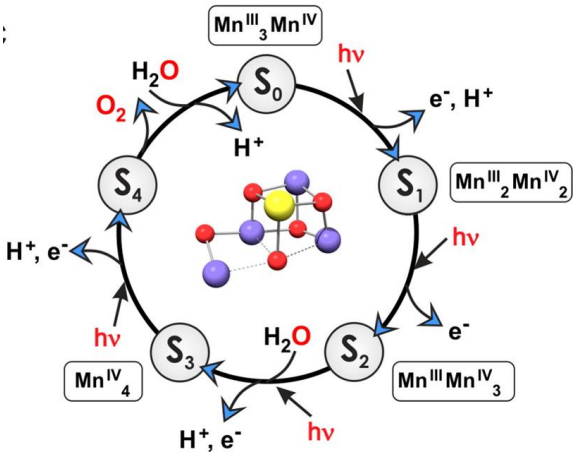
Il cluster Mn_4CaO_5 è legato alle proteine (figura) tramite 1 imidazolo (His332) e 6 gruppi carbossilato (2 Asp, 3 Glu e una alanina terminale), 5 dei quali con coordinazione bidentata a ponte fra coppie Mn⋯Mn, o Mn⋯Ca già uniti da μ-O, e uno monodentato, Glu189 che è monodentato su Mn1. Da notare che manca un carbossilato a ponte proprio fra Mn4 e Mn1, quelli connessi da O5, che sono invece distanziati essendo legati a due amminoacidi adiacenti di D1, cioè His332 e Glu333. Combinando insieme gli O a ponte, le molecole d'acqua e i residui amminoacidici, **ogni atomo metallico nell'OEC risulta coordinativamente saturo**: ogni Mn ha numero di coordinazione 6, e il Ca^{2+} ha 7 leganti. Questi sono i tipici numeri di coordinazione di Mn e Ca. In realtà, una caratteristica di spicco della struttura dell'OEC è la posizione inusuale di O5, che è legato molto debolmente in particolare a Mn1, tanto che i due atomi potrebbero non essere legati e quindi il cluster sarebbe aperto. In altre parole, Mn1 potrebbe essere penta-coordinato e il sito di coordinazione disponibile potrebbe essere essenziale per la coordinazione di una delle molecole di acqua substrato. Un'altra possibilità è che in realtà O5 sia un idrossido, OH^- anziché O^{2-}, e che possa essere uno dei due ossigeni substrato. In questa seconda ipotesi tutti gli ioni manganese sarebbero esa-coordinati.

Sono stati individuati anche due ioni Cl^-, ognuno dei quali interagisce con due molecole di acqua e col *backbone* di residui aminoacidici (figura); dal momento che due di questi amminoacidi, D1-Glu 333 e CP43-Glu 354, sono coordinati direttamente al cluster di Mn, i due anioni cloruro potrebbero avere la funzione di mantenere l'intorno coordinativo del cluster Mn_4CaO_5 e quindi il suo funzionamento. In precedenza era stato proposto che il ruolo dei Cl^- potrebbe essere quello di coordinarsi temporaneamente al posto del substrato H_2O (che è anche il solvente) o OH^-. Questi ioni Cl^- debolmente coordinati potrebbero evitare possibili ossidazioni della catena proteica (mentre il cluster Mn non lavora sul substrato) e non correrebbero il rischio di venire essi stessi ossidati a causa del potenziale elevato (+ 1.36 V) per l'ossidazione a Cl_2.



Da tenere presente che la struttura ai raggi X si riferisce allo stato stabile al buio, cioè S_1, e che la struttura dell'OEC così come gli stati di ossidazione dei 4 ioni manganese, subiscono delle variazioni durante il ciclo di ossidazione dell'acqua (ciclo degli stati S). Inoltre, studi EXAFS molto dettagliati dell'OEC hanno dimostrato che i cationi Mn sono facilmente ridotti dai raggi X (i quali, interagendo con la componente proteica, generano degli elettroni solvatati), anche a bassa temperatura, e si sono riscontrate piccole ma significative differenze fra le distanze Mn⋯Mn determinate tramite raggi X (sincrotrone), EXAFS e studi teorici. Nel 2015 è stata riportata (*Nature*) una nuova struttura del PSII (risoluzione 1.95 Å, quindi da questo punto di vista non migliore di quella del 2011) priva di danni dovuti alla radiazione, ottenuta utilizzando impulsi di raggi-X della durata di femtosecondi generati da un *X-ray free-electron laser* (XFEL) e centinaia di grossi cristalli isomorfi di PSII. L'esatta determinazione delle distanze nello stato S_1 è fondamentale anche per determinare lo stato di ossidazione degli ioni Mn nell'OEC: Infatti il Mn(III), d^4, alto spin, presenta effetto Jahn-Teller e quindi la presenza di eventuali distorsioni lungo un asse permette di assegnare lo stato di ossidazione (III) a quel Mn. In effetti, nella struttura determinata con lo XFEL, il cluster dell'OEC ha sempre la stessa forma, ma alcune distanze Mn–O sono più corte di 0.1 – 0.2 Å rispetto a quella determinata nel 2011 con la luce di sincrotrone (raggi X), suggerendo che in quel caso fosse appunto avvenuta parziale riduzione degli ioni Mn (al diminuire dello stato di ossidazione il raggio ionico aumenta e quindi le distanze di legame si allungano). In particolare, la struttura del 2011 riportava una distanza Mn4–O5 più lunga di 0.2 Å (2.5 vs 2.3 Å), suggerendo che lo ione Mn *dangler* fosse stato in parte ridotto dall'attacco degli elettroni idratati generati dai raggi X. In base alle nuove misure è stato possibile assegnare lo stato di ossidazione ad ogni singolo ione Mn nello stato S_1 (Figura).

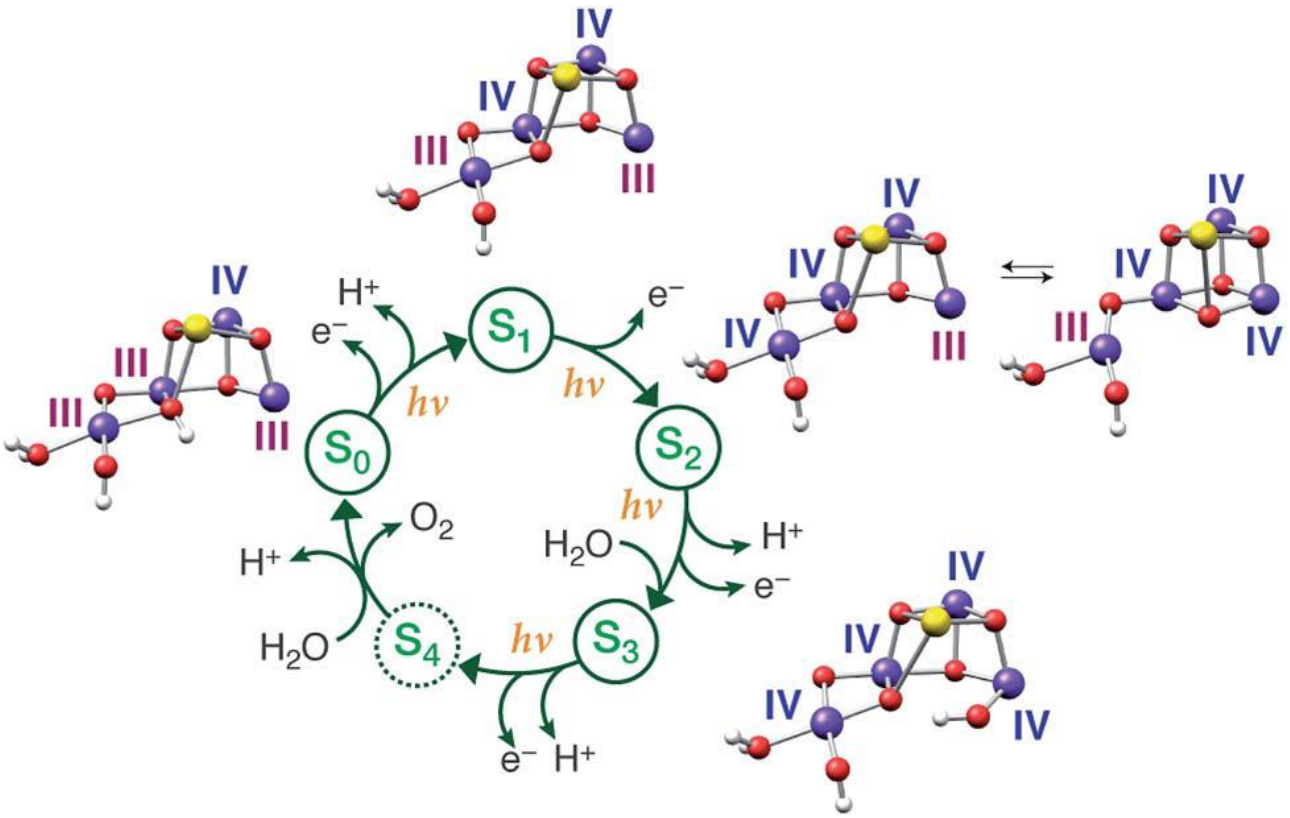




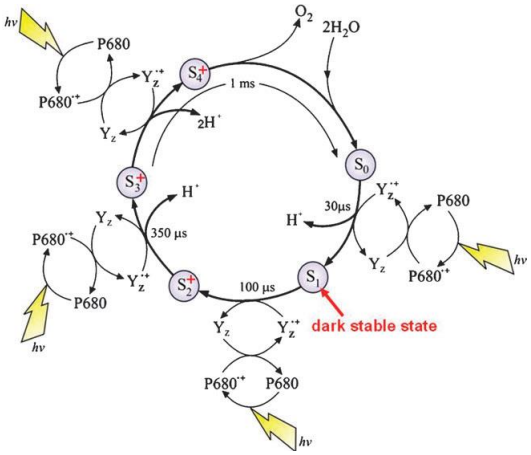
Meccanismo di ossidazione dell'acqua

Negli ultimi anni il meccanismo di ossidazione dell'acqua è stato oggetto di moltissimi studi; da notare che l'OEC di PSII, quando lavora a pieno regime, è in grado di compiere fino a 500 cicli al secondo, il che significa ossidare fino a **1000 molecole di H_2O per secondo** e quindi deve evitare

grossi riarrangiamenti della proteina o del substrato, che alzerebbero l'energia di attivazione. Si valuta però che il TON dell'EOC sia ca. 10^6 e il cluster di Mn deve venire rinnovato ogni pochi minuti. Indipendentemente dalla esatta natura del meccanismo, nel tempo richiesto ad ossidare due molecole d'acqua ad O_2 (millisecondi) tramite successivi stadi di eccitazione luminosa/separazione di carica (sono richiesti almeno 4 fotoni), sono stati osservati spettroscopicamente **5 stati di ossidazione per il cluster di Mn**, indicati da S_0 a S_4 (figura, ciclo di Kok).
Le principali domande a cui bisogna cercare di rispondere per capire come funziona l'OEC sono le seguenti: 1) tutti e quattro gli equivalenti di ossidazione necessari per ossidare l'acqua a diossigeno si accumulano sui quattro ioni Mn dell'OEC? 2) Avvengono anche ossidazioni centrate sui leganti, incluse molecole d'acqua coordinate, prima della formazione e del rilascio di O_2? 3) Quali sono gli stati di ossidazione per gli ioni Mn durante il procedere degli stati S?
Chiaramente una questione fondamentale per comprendere il meccanismo di *water-splitting* è quella degli stati di ossidazione di ogni singolo ione Mn dell'OEC nei 5 stadi del ciclo.
L'ossigeno molecolare viene rilasciato durante il passaggio da S_4 a S_0 e quindi lo stato S_0 deve essere quattro volte più ridotto dello stato S_4. Le variazioni strutturali dell'OEC durante il ciclo fra questi stati sono in genere minime, in accordo con la bassa energia di attivazione complessiva, tranne che nel passaggio da S_2 ad S_3, dove si osservano variazioni nelle distanze Mn··Mn e Mn··Ca, attribuite al coinvolgimento dei ponti μ-osso nel processo ossidativo. Si ritiene che la Y_Z ossidi il cluster Mn_4 con un processo a stadi tramite semplici reazioni di trasferimento elettronico; di conseguenza il cluster di Mn servirebbe come sistema per immagazzinare carica positiva e diventa via via più ossidante al procedere del trasferimento di elettroni verso la tirosina, fino a quando raggiunge il suo stato più ossidante (lo stato S_4), uno stato a tempo di vita molto breve che ritorna allo stato più ridotto (S_0) tramite una riduzione a quattro elettroni provenienti dall'ossidazione di due molecole d'acqua a ossigeno molecolare. Le ipotesi sul funzionamento dell'OEC e sullo stato di ossidazione degli atomi di Mn nei vari stati sono basati essenzialmente su dati spettroscopici EPR, ma anche in combinazione con dati FT-IR, XANES, e UV-vis e calcoli teorici. La spettroscopia EPR ha dimostrato che gli stati S_0 e S_2 hanno *ground state* con spin $S = ½$ ed hanno segnali EPR multi linea (MLS = *multi-line signals*), cioè con una struttura iperfine. Invece gli stati S_1 (che è lo stato stabile al buio) ed S_3 hanno *ground state* con spin intero. Quindi S_2, che ha il tempo di vita più lungo, possiede un numero dispari di elettroni. S_4 ha un tempo di vita molto breve ed ha sicuramente due elettroni meno di S_2, che ha un numero dispari di elettroni. Lo stato di spin di S_2 ($S = ½$), derivante – come tutti gli altri – dall'accoppiamento magnetico fra ioni Mn(III) e Mn(IV), è stato oggetto di molto dibattito perché è compatibile con due stati di ossidazione possibili che differiscono di 2 nel conto degli elettroni di valenza totali: quello cosiddetto Low Valent (LV), 3Mn(III)Mn(IV), e quello High Valent (HV) Mn(III)3Mn(IV). È chiaro che i due possibili stati di ossidazione di S_2 si riflettono su tutti gli altri stati. I lavori più recenti (2015) suggeriscono decisamente che tutti i risultati sperimentali e teorici relativi al ciclo di Kok sono in accordo con lo schema HV, partendo da uno stato S_0 (III, III, III, IV) fino a S_3 (IV, IV, IV, IV). Lo schema che attualmente è più accettato, sia per gli stati di ossidazione degli ioni Mn che per le variazioni strutturali del cluster da S_0 a S_3 è riportato in figura. Al momento non è ancora stato possibile caratterizzare lo stato transiente S_4, tuttavia le due ipotesi più comuni per S_4 sono $Mn^{IV}{}_3Mn^{V}$ o $Mn^{IV}{}_4$(substrato)•.



Tuttavia bisogna rilevare che alcuni dati sperimentali (in particolare quelli derivanti da misure di *Resonant Inelastic X-ray Scattering*, RIXS) indicano che ragionare in termini di stati di ossidazione formali potrebbe non essere sufficiente per descrivere la natura complessa della struttura elettronica in cluster multinucleari come Mn_4CaO_5 in PSII, e gli elettroni sono fortemente delocalizzati. È probabile che i leganti siano coinvolti nel modulare le proprietà redox e anche nella delocalizzazione della densità elettronica man mano che il cluster viene ossidato.

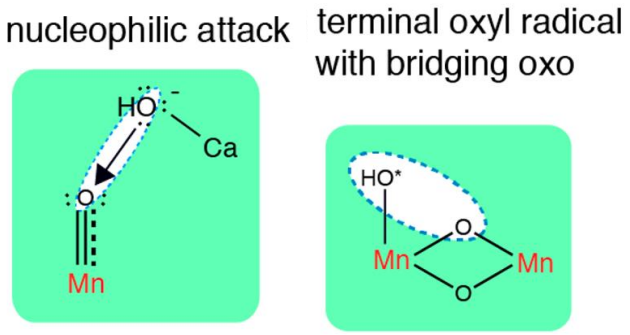


La figura seguente è un'altra rappresentazione del ciclo di Kok, che evidenzia come il trasferimento di un elettrone alla volta dal cluster OEC a $P680^+$ sia mediato dalla tirosina redox-attiva Y_Z. Inoltre la figura mostra il rilascio dei protoni e riporta i $t_{1/2}$ di ogni stadio; si vede la transizione fra S_0 ed S_1 è la più veloce (dopo quella da S_4 a S_0).

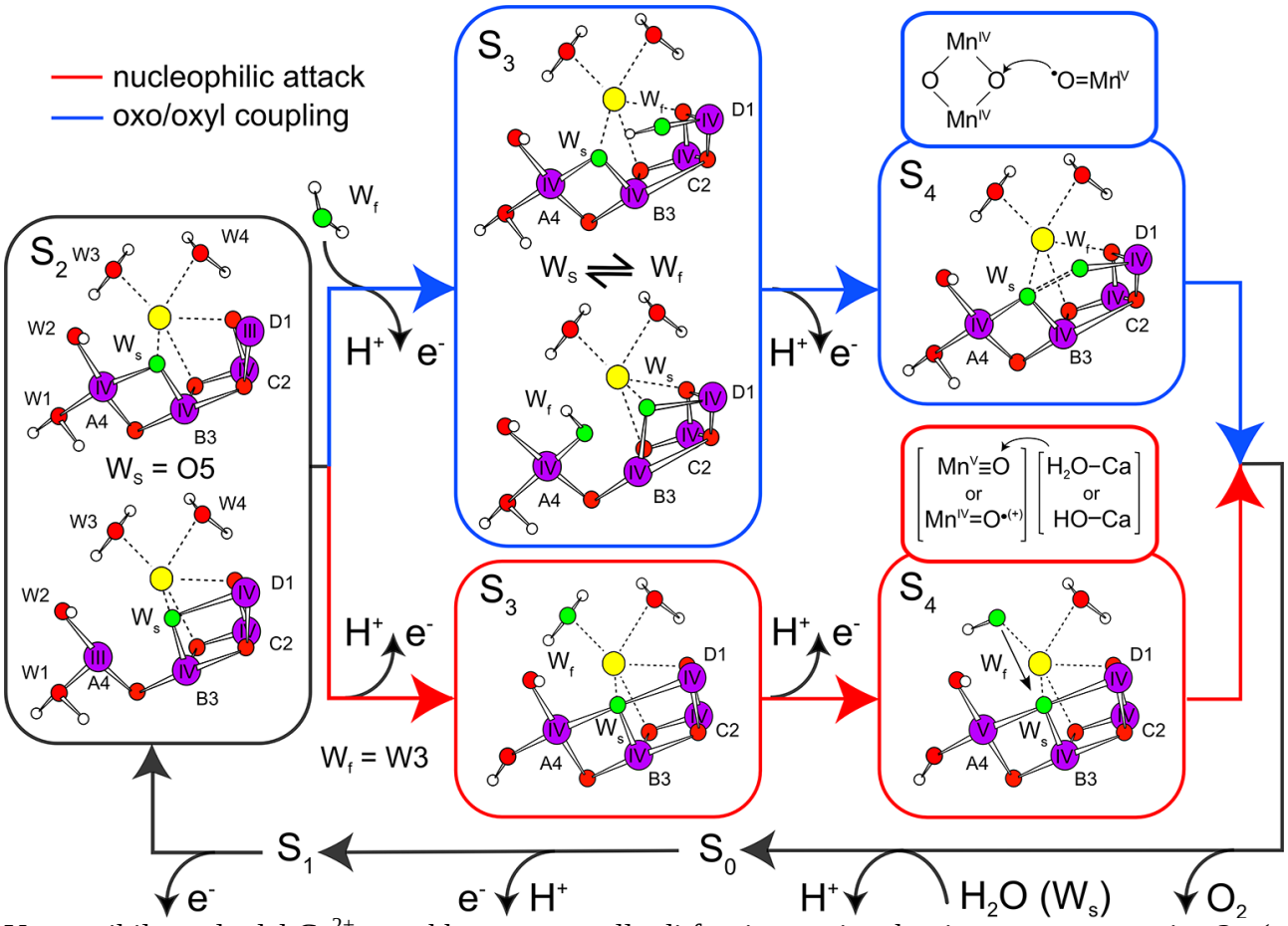
Ipotesi di meccanismo per la formazione di O_2.

Allo stato attuale, le informazioni sperimentali dirette a riguardo dello stadio di formazione del legame O–O sono piuttosto limitate, e i meccanismi che sono stati proposti sono in buona parte basati su quanto è noto a riguardo delle strutture degli stati S stabili e su calcoli teorici. C'è accordo sul fatto che **il legame O–O non si formi prima dello stato S_3**. Si ritiene che, dopo il terzo impulso luminoso, dallo stato S_3 vengano espulsi un elettrone e un protone, originando lo stato S_4 dove si forma il legame O–O prima che venga rilasciato l'ossigeno molecolare. In ogni caso, la natura chimica dello stato transiente S_4 non è stata ancora determinata sperimentalmente. Ormai la struttura del cluster Mn_4CaO_5 è nota con precisione e, sebbene ci siano ancora aspetti non del tutto chiari, come lo stato di protonazione degli ossigeni a ponte e l'identità dei leganti terminali (acquo o idrosso), è ora possibile restringere il numero dei molti meccanismi proposti nel corso degli anni e il sito di formazione dell'ossigeno molecolare. La figura mostra i due principali meccanismi, fra i

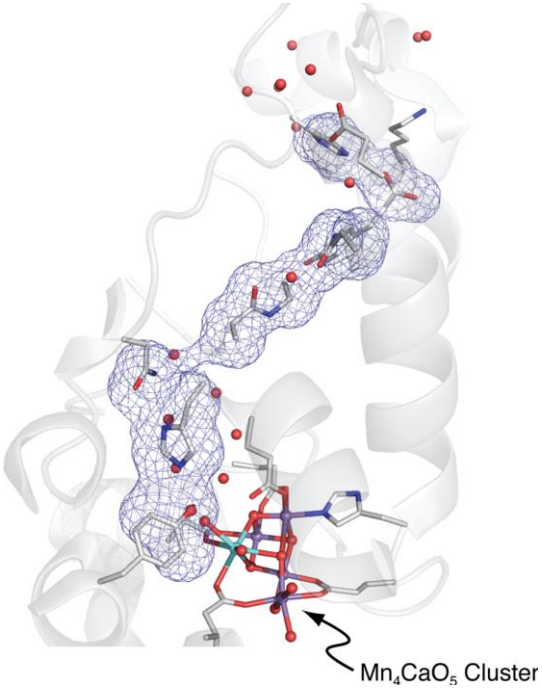
molti proposti, che vengono attualmente considerati più probabili per la formazione del legame O–O: a) formazione di un gruppo Mn(V)–oxo (Mn(V)≡O o Mn(IV)=O•) nel quale l'ossigeno, molto povero di densità elettronica, subisce attacco nucleofilo da parte di un OH coordinato al Ca; b) un meccanismo radicalico in cui il legame si forma fra un radicale ossile terminale (*oxyl radical*) e un ossigeno a ponte, il cosiddetto *oxo/oxyl radical coupling mechanism*. Quest'ultimo sembra essere, al momento, quello più accreditato, soprattutto in base a calcoli teorici. Per quanto riguarda il sito dove avviene il legame e la natura delle molecole d'acqua coinvolte, bisogna premettere che misurando la velocità di scambio di acqua marcata ($H_2{}^{18}O$) tra *bulk* e quella coordinata sul cluster Mn_4CaO_5, è stato possibile identificare il Ca come un sito di legame di una delle due molecole d'acqua "substrato" (infatti la velocità di scambio viene influenzata dalla sostituzione Ca/Sr). Inoltre questi studi hanno dimostrato che le due molecole di acqua-substrato si legano a siti chimicamente differenti. La molecola substrato che si coordina prima scambia lentamente con l'acqua di bulk (W_S) in tutti gli stati S_i, suggerendo che essa si leghi nello stadio iniziale del ciclo, cioè su S_0, mentre l'acqua-substrato che si lega dopo scambia rapidamente in tutti gli stati S (W_f). I dati sperimentali suggeriscono che W_f si coordini durante la transizione fra S_2 ed S_3. Il fatto che le due molecole di acqua-substrato non siano legate contemporaneamente nei *resting states* dell'enzima (S_0 e S_1) potrebbe spiegare il fatto che l'OEC ha una elevata selettività per la formazione di O_2 (processo a 4 elettroni), sfavorendo la chimica a due elettroni del tipo "catalasi".
Tornando al sito di formazione del legame O–O, tutti i dati sperimentali suggeriscono il coinvolgimento di O5, l'ossigeno μ_4-oxo, derivante (probabilmente) da W_S. La formazione del legame O=O può avvenire o tramite un attacco nucleofilo su O5 da parte di W3 (che coinciderebbe con W_f), cioè un H_2O/OH legato al Ca, oppure nel meccanismo di *oxo/oxyl radical coupling* fra O5 a ponte e un radicale ossile posizionato vicino a O5, quindi derivante da una molecola d'acqua coordinata su Mn4 o su Ca. Il meccanismo radicalico (nel quale l'ultimo elettrone non viene dal Mn ma dall'ossigeno), anche se non ha precedenti nei sistemi modello, è favorito dal punto di vista dei calcoli teorici che indicano per questo meccanismo l'energia di attivazione più bassa.



La figura successiva fornisce un quadro completo di questi due possibili meccanismi di formazione di O_2, attacco nucleofilo e radicalico osso/ossile.



Un possibile ruolo del Ca^{2+} potrebbe essere quello di fornire un sito che rimane sempre carico 2+ (e non di più) e al contempo è in grado di coordinare rapidamente molecole di acqua; se al posto del Ca^{2+} ci dovesse essere un altro atomo di Mn, probabilmente verrebbe anch'esso ossidato e la possibilità di coordinazione fortemente labile sarebbe persa.

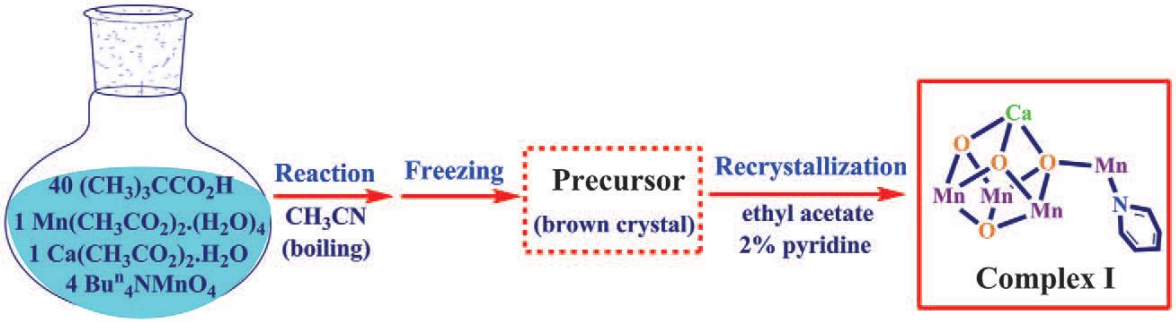


La figura evidenzia un cosiddetto *water channel*, che servirebbe a trasferire i protoni fuori dal sito attivo, verso il lumen

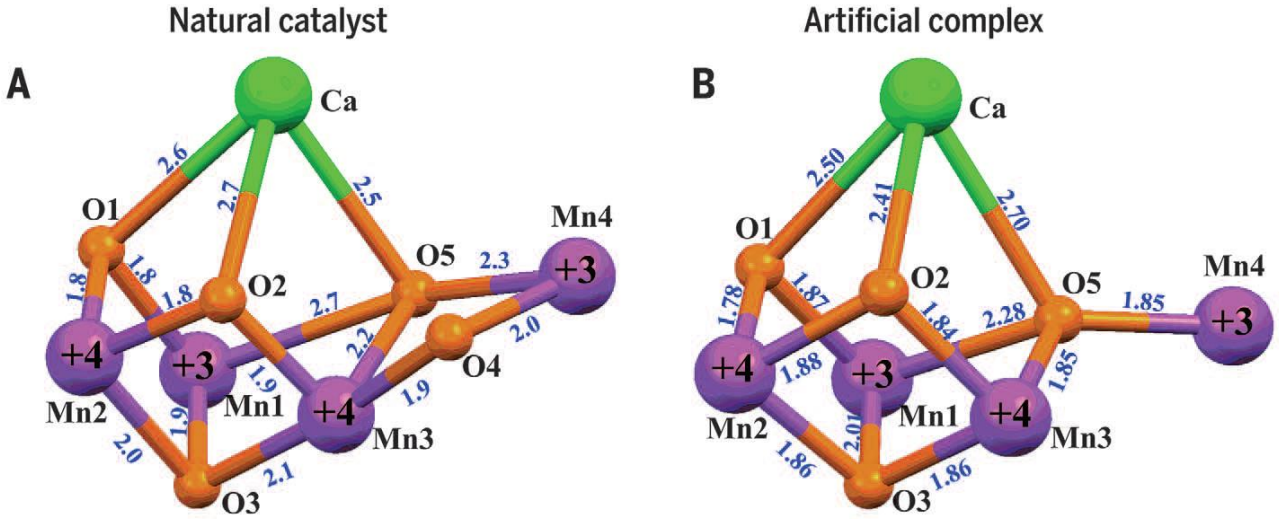
Sistemi modello

La labilità dell'OEC legato alla proteina impedisce la sua caratterizzazione elettrochimica e la modificazione controllata della sua struttura e dei suoi componenti. Si ritiene che solo dei modelli molecolari possano consentire misurazioni dirette dei potenziali redox e delle energie di legame dei protoni (valori di pK_a), e così pure stabilire come essi variano in seguito a modifiche chimiche alla struttura dell'OEC. Per questo motivo, nel corso degli anni sono stati sintetizzati numerosi complessi multi-manganese come possibili modelli dell'OEC, alcuni dei quali contengono anche un cluster Mn_3CaO_4 che ricorda da vicino la parte cubanoide dell'OEC. Era stato possibile sintetizzare modelli in cui ioni Ca o Ag erano stati incorporati nella posizione esterna (*dangling*) occupata da Mn4 nell'OEC, tuttavia solo molto recentemente (*Science*, 2015) è stato riportata la

sintesi di un sistema modello molto simile al vero OEC, con un atomo di Mn esterno al cubanoide Mn_3CaO_4. La sintesi, molto semplice, è riportata in figura.

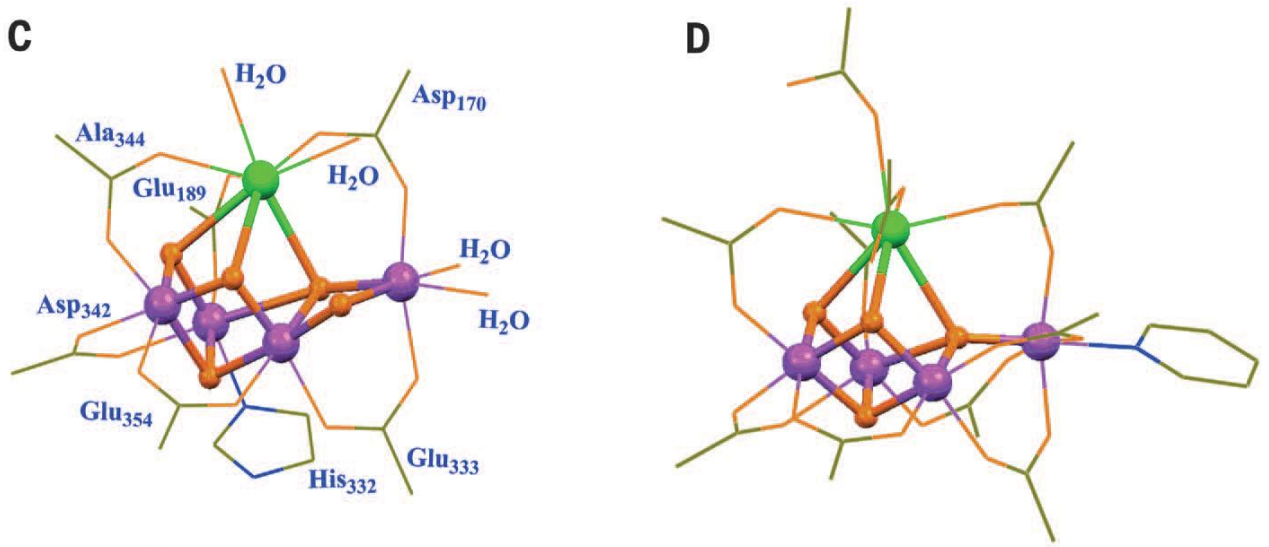


La figura successiva mette a confronto le strutture dell'OEC nativo (cluster Mn_4CaO_5) e del modello (cluster Mn_4CaO_4). Come si vede, anche le distanze sono notevolmente simili. La principale differenza, evidenziata già dalla stechiometria, riguarda la connettività Mn1-Mn4, dove sostanzialmente manca l'ossigeno a ponte O4 (quello più importante): μ-O4 dell'OEC nativo è rimpiazzato da un gruppo carbossilico a ponte e inoltre le molecole d'acqua terminali sono sostituite da leganti più complessi (vedi figura successiva)



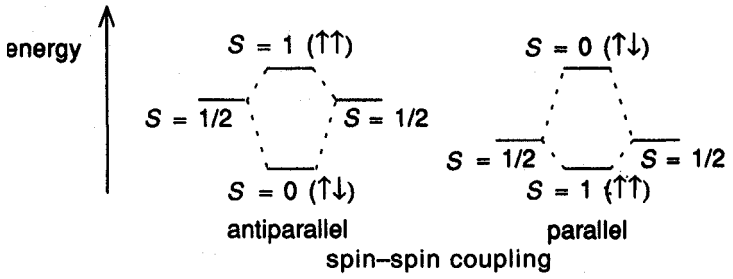
Il cluster modello Mn_4CaO_4 è in ottimo accordo con l'OEC nativo non solo per quanto riguarda la struttura del core Mn_4Ca-osso, ma anche per quanto riguarda i leganti esterni (acqua a parte), come si vede nella figura successiva, che riporta e sinistra l'OEC e a destra il modello.

Misure di voltammetria ciclica effettuate sul cluster modello indicano che sono accessibili cinque stati redox, cioè il cluster modello può accumulare equivalenti ossidativi in maniera simile all'OEC nativo. Sia le misure di voltammetria ciclica che quelle EPR, se confrontate con i modelli precedenti in cui mancava il Mn esterno, indicano che esso possiede un ruolo molto importante nel modulare sia i potenziali redox del cluster che le proprietà magnetiche.



Le caratteristiche che rendono il Mn particolarmente adatto come catalizzatore per l'ossidazione dell'acqua, oltre alla sua biodisponibilità, sono: 1) la possibilità di avere un elevato numero di stati di ossidazione stabili o almeno metastabili (II – VII); 2) la coordinazione spesso molto labile dei leganti; 3) la preferenza per **stati ad alto spin** a causa di uno *splitting* degli orbitali d sempre intrinsecamente piccolo; 4) la scarsa affinità per lo zolfo, che ha reso possibile il suo funzionamento anche nell'atmosfera primordiale, ricca di questo elemento.
Lo spin totale del cluster di Mn da cui evolve O_2 è più piccolo di quello di alcuni modelli sintetici, a causa dell'accoppiamento almeno parzialmente anti-ferromagnetico tra i centri ad alto spin. Ciò nonostante il cluster ha a sua disposizione diversi stati con un **numero dispari di elettroni spaiati**. Questo fatto, insieme alla possibilità di accedere ad alti stati di ossidazione e la labilità dei leganti coordinati rendono i centri di Mn particolarmente adatti a catalizzare la generazione e il **rilascio** della molecola di O_2 nel suo *ground state* di tripletto, $^3O_2$, cioè con un numero **pari** di elettroni spaiati. Bisogna ricordare infatti che normalmente la reazione del diossigeno con i metalli di transizione porta alla coordinazione irreversibile. Ci vorrebbe uno "*spin flipping*" per rendere un sistema con un numero pari di elettroni spaiati come O_2 compatibile con il catalizzatore con numero dispari di elettroni spaiati (e quindi rendere più forte l'interazione fra ossigeno e metallo), ma solitamente i processi di *spin-flipping* hanno energie di attivazione elevate.

Nota sull'accoppiamento spin-spin
Quando due o più centri con elettroni spaiati (↑) interagiscono fra loro, il risultato può essere un accoppiamento degli spin elettronici di tipo parallelo (↑↑), *ferromagnetico*, o antiparallelo (↑↓), *antiferromagnetico* (figura).
Se l'interazione fra gli orbitali è piccola, ad esempio a causa della disposizione ortogonale di orbitali *p* o *d*, il principio di Hund che richiede la massima molteplicità per evitare di dover "spendere" l'energia di accoppiamento di spin, favorisce l'accoppiamento parallelo spin-spin. La situazione più frequente, tuttavia, è quella dell'accoppiamento antiparallelo, antiferromegnetico, nel quale il guadagno di energia da interazioni orbitaliche indirette (super-exchange) compensa quella consumata per l'accoppiamento degli spin.

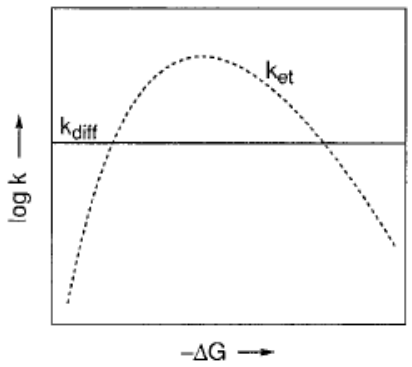


Nel caso di un dimero contenente Mn(III) alto spin (d^4, S = 2) e Mn(IV) alto spin (d^3, S = 3/2), l'accoppiamento ferromagnetico porterebbe ad un ground state con uno spin elettronico totale S = 7/2 (↑↑↑↑ + ↑↑↑ → ↑↑↑↑↑↑↑) e accoppiamento parziale di spin potrebbe

avvenire solo in stati eccitati accessibili termicamente. In caso di accoppiamento antiferromagnetico il ground state avrebbe uno spin elettronico totale pari a $S = 1/2$ (↑↑↑↑ + ↓↓↓ → ↑↓↑↓↑↓↑). Stati fondamentali con spin elettronico intermedio sono possibili in sistemi polinucleari con diversi gradi e segni delle interazioni di accoppiamento.
Gli stati magnetici possono essere determinati misurando la componente paramagnetica della suscettibilità magnetica, cioè misurando gli effetti quando la sostanza viene introdotta in un campo magnetico non-omogeneo (bilancia di Faraday, suscettometro SQUID). Calcoli teorici sono molto utili per interpretare i dati; in particolare, la simulazione della dipendenza della suscettività magnetica in funzione della temperatura fornisce informazioni sul tipo di accoppiamento tra gli spin elettronici su centri diversi e sulla sua ampiezza. Secondo la legge di Curie, per i sistemi paramagnetici si dovrebbe avere una suscettività più elevata a basse temperature, a causa della diminuita mediazione dovuta ai moti termici delle particelle; tuttavia, questo effetto può venire più che compensato dal comportamento antiferromagnetico, cioè la tendenza all'accoppiamento degli spin.

Note sulla velocità di trasferimento elettronico
Vediamo infine qualche precisazione a proposito del trasferimento elettronico foto-indotto che parte dallo special pair.
In effetti la separazione di carica a lungo tempo di vita è molto inusuale, e il corso normale degli eventi sarebbe la rapida ricombinazione delle cariche per produrre calore o luce (emissione, luminescenza). Il successo della fotosintesi è basato su una forte preferenza per i processi di separazione di carica estremamente veloci rispetto al processo di ricombinazione molto più lento (rapporto fra le due velocità di circa 10^8!). L'origine di questo rapporto di velocità così elevato, impossibile da ottenere in sistemi chimici "normali", è dovuto all'immobilizzazione dei componenti, in una speciale orientazione reciproca in regioni non polari del sistema proteico ancorato nella membrana. Solo in questo caso una reazione chimica "uphill" può prevalere rispetto alla normale tendenza alla ricombinazione di carica che sarebbe dominante se fosse possibile la libera diffusione dei componenti. In altre parole la speciale disposizione spaziale dei componenti fa si che l'energia di attivazione per il processo termodinamicamente sfavorito di separazione di carica sia praticamente nulla.
In generale, i parametri più importanti che influenzano la velocità di electron transfer intramolecolare, cioè fra due centri della stessa molecola (o anche per un trasferimento inter-molecolare a sfera interna, in cui cioè si forma un legame tra donatore e accettore), sono:

1. la differenza di energia libera del processo di trasferimento elettronico, **ΔG°** (o, il che si equivale, la differenza di potenziale **ΔE°**);
2. la energia di riorganizzazione (**λ**) (anche detta relaxation energy) richiesta per fare sì che nello stato di transizione le lunghezze di legame e l'entità della solvatazione nel centro ossidato e di quello ridotto siano uguali, così che il trasferimento elettronico possa avvenire;
3. la distanza (**D**) fra i due centri. In pratica, questa è la distanza fra i centri degli atomi che stanno ai confini del gruppo accettore e di quello donatore. La distanza più breve possibile sarà quella di contatto di van der Waals (D° = 3.6 Å). Inoltre, il parametro D sarà modificato dal termine **β** che è una misura dell'efficienza del *medium* (solvente o, più in generale, l'ambiente chimico in cui avviene il processo, ad esempio amminoacidi di proteine) nel favorire l'accoppiamento elettronico di donatore e accettore.



La seguente **equazione di Marcus** esprime la velocità di trasferimento elettronico intramolecolare (k_{ET}, s^{-1}) in funzione dei parametri esposti sopra:

$k_{ET} = \kappa_{ET} \times k \times T/h \exp[-(\Delta G° + \lambda)^2/4\lambda RT]$

dove k è la costante di Boltzmann, h è la costante di Plank, R è la costante dei gas, e κ_{ET} è il cosiddetto fattore di trasmissione elettronica, che vale circa 1 per processi di electron transfer adiabatici. L'esame di questa equazione mostra che, per una data coppia di centri di reazione (cioè per D costante), il valore di k aumenta al crescere di $-\Delta G°$, raggiungendo un massimo (k_{max}) quando $-\Delta G° = \lambda$.
Per valori di $-\Delta G° > \lambda$, il valore di k (cioè la velocità) diminuirà. La predizione di questa cosiddetta "**regione inversa**" (*inverted region*), che sembra intuitivamente così improbabile, è stata invece confermata sperimentalmente in numerosi sistemi, portando così alla generale accettazione dell'equazione di Marcus. L'andamento previsto per la velocità di trasferimento elettronico in funzione di $-\Delta G°$ è riportato in figura.
La cosiddetta "regione inversa" predetta dall'equazione di Marcus può essere importante nella fotosintesi. La iniziale separazione di carica fotoindotta nello *special pair*, che è il primo stadio in una catena di trasferimenti elettronici, è in competizione con il processo (improduttivo) di ricombinazione di carica per tornare al *ground state*. Il fatto che avvenga il trasferimento elettronico, cioè l'allontanamento delle cariche, anziché la ricombinazione, è sorprendente in quanto nei due processi sono coinvolte distanze simili, ma la ricombinazione è molto favorita dal punto di vista termodinamico, cioè il valore di $-\Delta G°$ è molto più grande. Può essere che proprio il grosso valore di $-\Delta G°$ spinga il processo di ricombinazione di carica nella regione inversa, con una conseguente diminuzione di velocità. In questo modo la velocità del processo di ricombinazione di carica diventa meno competitiva rispetto a quella di separazione di carica.
L'equazione è stata saggiata sperimentalmente in numerosi sistemi biologici, nei quali esistano diverse coppie di siti accettori e donatori, ognuno separato da un distanza diversa (e nota). In questi casi si verifica sperimentalmente l'esistenza di una relazione lineare fra log k_{max} e D. Uno di questi sistemi è ovviamente il centro della reazione di fotosintesi di un *purple bacterium*, del quale è nota la struttura ai raggi X (vedi sopra). In questo caso si ottiene effettivamente una ottima correlazione lineare per distanze di cammino elettronico fino a 20 Å. Questi grafici mostrano che una variazione di distanza di 1.7 Å comporta una variazione di velocità di circa un ordine di grandezza. Questo significa che le velocità di trasferimento elettronico per distanze di 25–30 Å (come quelle che separano alcuni complessi nella catena respiratoria) sarebbero di gran lunga troppo basse (*half-life* da secondi a giorni); questa difficoltà è risolta inserendo una serie di centri redox intermedi. In pratica, nei sistemi biologici il limite massimo per salti elettronici fra due centri redox è di circa 15 Å; salti più lunghi non esistono perché sarebbero troppo lenti.