

INSTITUT DE CIÈNCIA MOL.LECULAR

ESTUDIO TEÓRICO DE PROCESOS FOTOINDUCIDOS EN
SISTEMAS BIOLÓGICOS.

GLORIA OLASO GONZÁLEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de novembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Fernando Castaño Almendral
- Dr. Juan Manuel Andrés Bort
- Dr. Marco Garavelli
- Dra. Mar Reguero de la Poza
- Dr. Ignacio Nilo Tuñón García de Vicuña

Va ser dirigida per:

Dra. Manuela María Merchán Bonete

Dr. Luis Serrano Andrés

©Copyright: Servei de Publicacions
Gloria Olaso González

Dipòsit legal: V-1057-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7793-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

TESIS DOCTORAL
UNIVERSIDAD DE VALENCIA
INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**ESTUDIO TEÓRICO DE PROCESOS
FOTOINDUCIDOS EN SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Gloria Olaso González

Valencia 2009

Dña. Manuela Merchán y D. Luis Serrano Andrés, Catedrática y Profesor Titular, respectivamente, del Departamento de Química Física y del Instituto de Ciencia Molecular de la Universitat de València, certifican que la memoria presentada por la licenciada Gloria Olaso González con título **“Estudio Teórico de Procesos Fotoinducidos en Sistemas Biológicos”** corresponde a su Tesis Doctoral y ha sido realizada bajo su dirección, autorizando mediante este escrito la presentación de la misma.

En Valencia, a 12 de Mayo de 2009

Dra. Manuela Merchán

Dr. Luis Serrano Andrés

A mi familia



**ESTUDIO TEÓRICO
DE PROCESOS FOTOINDUCIDOS
EN SISTEMAS BIOLÓGICOS**

Gloria Olaso González

*Si confieres un beneficio, nunca lo recuerdes;
si lo recibes, nunca lo olvides*
Quilón de Esparta

Agradecimientos

Siempre que se acaba un ciclo uno tiende a hacerse la misma pregunta: “¿Valió la pena?”. Da igual que se trate del hecho de haber puesto fin a una relación sentimental, de haber leído el último libro de una saga, o de haber visto el último episodio de una serie de televisión. Siempre tendemos a valorar cada fase, período, tramo o trecho al que le hemos dedicado cierto tiempo de nuestra existencia.

Hace ya seis años que tomé la decisión de doctorarme. Mucho ha llovido desde entonces. Ahora, por ejemplo, “Bolonia” se asocia con un proceso que va a cambiar de arriba a abajo el actual sistema educativo universitario y de postgrado. Sí, aquél en el que yo estudié. No me interesa hacer juicios de valor sobre un proceso que en poco o nada me va afectar, pero lo cierto es que para mi Bolonia siempre será recordada como una de las ciudades que tuve la oportunidad de visitar gracias a haber tomado la decisión de doctorarme. Y es que, jamás olvidaré las diversas ocasiones que se me han brindado a lo largo de estos seis años de conocer otras formas de hacer investigación química con gente nueva a la que nunca olvidaré. Tengo en mente mientras escribo estas palabras los extraordinarios cursos de doctorado interuniversitario que tuvieron lugar en Girona en el 2004 y las escuelas de verano de las Universidades de Lund y Aarhus en 2005 y 2006 respectivamente, así como una gran

cantidad de congresos en los que pude intercambiar conocimientos y experiencias en torno a la química teórica con personas de todo el mundo. Sin duda, todas estas experiencias han servido para enriquecer y ampliar mi formación universitaria y para consolidar mi pasión por la química.

En esta etapa son varias las personas que de un modo u otro me han ayudado a seguir adelante con esta tesis:

En primer lugar tengo que agradecer a Manuela Merchán y Luís Serrano por su labor como directores de toda la etapa de investigación que ha conducido a la elaboración de esta tesis. Le doy las gracias también a Remedios González por acceder a ser mi directora de beca y al resto miembros del grupo QCEXVAL (Química Cuántica del Estado Excitado de Valencia) por haberme ofrecido momentos inolvidables. En especial, debo mencionar a mis compañeros de viaje durante todo este tiempo Juanjo y Dani. Empezamos la carrera juntos y hemos seguido todos estos años caminos paralelos de los que se podrían contar mil y una anécdotas.

También agradezco a todas aquellas personas con las que, en mayor o menor medida y durante diferentes períodos de tiempo, he tenido contacto en estos seis años. Son varios los compañeros con los que he compartido memorables momentos de risas, charlas y todo tipo de experiencias y me enorgullezco de haber encontrado de entre ellos algunos buenos amigos.

Finalmente, quiero mostrar mi profunda gratitud a José Sánchez, secretario de la unidad de química teórica del ICMOL y a Ignacio Nebot, vicerrector de postgrado y mi tutor durante los dos primeros años de investigación, por el apoyo que me dieron cuando más lo necesité.

Y aquí estamos, al final de tantas cosas. Debo decir que no ha sido un camino fácil. Nunca lo es. Pero llegado el momento de hacerse la misma pregunta, esa evaluación que todos hacemos al final de cada etapa, mi respuesta es clara. “¿Valió la pena?”. Sin duda alguna.

ÍNDICE

Prólogo	pag 19
Resumen	pag 21
Capítulo 1. Introducción. La luz, fuente de vida	pag 27
1.1. Fotosíntesis	pag 31
- Diagrama Z	pag 33
1.2. DNA. La molécula de la vida	pag 38
- Estructura del DNA	pag 40
- Fotoestabilidad de los ácidos nucleicos	pag 47
- Lesiones en el DNA inducidas por la luz	pag 48
1.3. El proceso de la visión	pag 49
- Fisiología de la visión	pag 49
- Las células fotorreceptoras	pag 51
- Transducción de la señal visual	pag 55
- Ciclo fotoquímico de la Rodopsina	pag 57
Capítulo 2. Objetivos	pag 65
Capítulo 3. Metodología Químico-Cuántica	pag 69
3.1. Introducción	pag 73
- El nacimiento de la cuántica	pag 73
- La estructura de la materia	pag 76
- La dualidad onda-corpúsculo	pag 78
- La ecuación de Schrödinger	pag 80
3.2. Métodos Químico-Cuánticos	pag 81
3.2.1. Resolviendo la ecuación de Schrödinger	
aplicada a sistemas químicos	pag 81
- La aproximación de Born-Oppenheimer	pag 83

- El principio de antisimetría o principio de exclusión de Pauli	pag 86
- Productos Hartree	pag 89
- Determinantes de Slater	pag 91
3.2.3. El método Hartree-Fock	pag 93
- Determinantes excitados	pag 97
3.2.3. Métodos Post-Hartree-Fock	pag 100
- Forma exacta de la función de onda Interacción de Configuraciones (CI)	pag 100
- Métodos multiconfiguracionales	pag 105
- El método CASSCF	pag 108
- Inclusión de la correlación electrónica dinámica. El método CASPT2	pag 111
3.2.4. Otros Métodos Químico-Cuánticos	pag 115
3.3 Conjuntos de base	pag 117
- Orbitales de Slater y orbitales de tipo Gaussian	pag 118
- Clasificación de los conjuntos de base	pag 120
- Conjunto de base balanceado	pag 124
- Contracción de los conjuntos de base	pag 126
- Dependencia lineal de las funciones de base	pag 140
- Error de Superposición de Base (BSSE)	pag 141
3.4 Tratamiento del entorno	pag 143
3.4.1. Tratamiento continuo del Solvente: PCM	pag 143
3.4.2. Métodos híbridos	pag 145
- Interacción entre los subsistemas QM y MM	pag 148
- Átomos frontera	pag 149
Capítulo 4. Conceptos Fotoquímicos y Fotofísicos	pag 161
4.1. La interacción luz-materia	pag 163
4.2. Reacciones Fotoquímicas	pag 170

4.3. El acoplamiento espín-órbita	_____	pag 176
4.4. Formación de Excímeros	_____	pag 178
4.5. Transferencia de Energía de Excitación	_____	pag 181
4.5.1. EET Singlete-Singlete	_____	pag 181
- Mecanismo de intercambio electrónico		
o de Dexter	_____	pag 182
- Mecanismo dipolo-dipolo de Förster	_____	pag 183
- Mecanismo “trivial” de transferencia de Energía	_____	pag 184
4.5.2. EET Triplete-Triplete	_____	pag 185
4.5.3. Transferencia de carga	_____	pag 188
4.6. Metodología Químico-Cuántica aplicada al		
Estado Excitado	_____	pag 188
4.6.1. Métodos químico-cuánticos más utilizados	_____	pag 190
4.6.2. Efectos diferenciales de la correlación		
electrónica	_____	pag 198
4.6.3. Caminos de mínima de energía (MEPs)	_____	pag 201
Capítulo 5. Estudio del papel de los Excímeros en la		
fotofísica y fotoquímica de las bases del DNA	_____	pag 207
5.1. Hacia la Comprensión de la Fluorescencia		
del DNA: El excímero Singlete de Citosina	_____	pag 212
- Construcción de las PECs del homodímero		
neutro de citosina en conformación cara-a-cara	_____	pag 212
- Análisis de las PECs del homodímero neutro		
de citosina en conformación cara-a-cara	_____	pag 215
- Análisis del Error de Superposición de Base	_____	pag 216
- Comparación de la estructura ¹ (LE) con la		
del B-DNA	_____	pag 223

5.2. Formación de ciclobutilcitosina (CBC) a partir del	
excímero Triplete de Citosina	_____ pag 225
5.2.1. El excímero triplete de Citosina	_____ pag 226
5.2.2. Formación de ciclobutilcitosina (CBC) vía triplete	_____ pag 230
- Mecanismo propuesto para la fotodimerización	
de la citosina a través del excímero triplete	_____ pag 231
- Naturaleza del ³ (SWI). El triplete del (ED)	
y del (FED)	_____ pag 234
- Población del estado ³ (SWI) del dímero de citosina	_____ pag 236
- El papel de los excímeros en la formación	
de Pyr<>Pyr	_____ pag 239
5.3. Papel del excímero de adenina en la fotofísica	
de sus oligonucleótidos	_____ pag 242
- Hacia la comprensión de los mecanismos de	
relajación de los oligonucleótidos de adenina	_____ pag 242
A. El estado excitado singlete de menor	
energía en el excímero paralelo: ¹ (LE)	_____ pag 248
B. El estado excímero singlete	
relajado: ¹ (A*A) _{exc}	_____ pag 252
C. El estado singlete de menor energía	
en la conformación del B-DNA	_____ pag 253
D. Estados singlete de transferencia de carga.	
Efectos de la solvatación	_____ pag 256
E. Absorción Transitoria de los Dímeros	
de Adenina	_____ pag 261
F. Proceso de desactivación del Excímero	
de Adenina	_____ pag 263
- Papel de los excímeros en el control de la fotofísica	

y fotoquímica de las NABs _____ pag 269

Capítulo 6. Transferencia de carga y energía en sistemas

biológicos: bioexcímeros como precursores de la CT _____ pag 277

6.1. Transferencia electrónica ultrarápida en la

Fotosíntesis: Interacción entre el anión de

Feofitina y la Plastoquinona a por medio de una

intersección cónica _____ pag 280

- Cálculos de calibrado. Electroafinidades _____ pag 287

- Transferencia Electrónica entre el radical aniónico

FBC y la quinona _____ pag 289

- El proceso de Transferencia Electrónica

Intramolecular: Un baile de tres movimientos _____ pag 294

6.2. Modelizando la transferencia de energía

triplete-triplete a través de su estudio en

moléculas de pequeño tamaño. _____ pag 296

6.2.1. Transferencia de energía Triplete-Triplete

Etileno-Etileno _____ pag 303

6.2.2. Transferencia de energía Triplete-Triplete

Entre el Cation Metaniminio-Etileno y el

Etileno-O₂ _____ pag 306

Capítulo 7. Influencia del entorno proteico en el

proceso de fotoisomerización del PBS11 _____ pag 319

7.1. Conocimientos previos _____ pag 321

7.2. Especificaciones del método de cálculo _____ pag 329

7.3. Evaluación del estado de protonación del Glu-181 _____ pag 332

7.4. Amortiguación del contraión por el entorno

proteico _____ pag 339

- Propiedades ópticas _____ pag 339

- Efectos en la Fotorreactividad: Modificación de la pendiente del canal de fotoisomerización_____	pag 349
7.5 Mecanismo de Modulación Espectral en la visión en color _____	pag 354
7.6 Mutaciones y Deficiencias en la Visión _____	pag 358
- Deficiencias en la visión relacionadas con la Rh_____	pag 358
- Patologías relacionadas con los pigmentos de la Visión en color_____	pag 359
7.7 Efectos electrostáticos en las propiedades y fotorreactividad de pigmentos visuales _____	pag 360
Capítulo 8. Conclusions _____	pag 371
Papers _____	pag 379
Anexos I. Nomenclatura aminoácidos _____	pag 479
Anexo II. Abreviaturas y acrónimos _____	pag 481

Prólogo

Resulta interesante observar, aunque sea someramente, la importancia que el concepto de luz ha tenido a lo largo de los tiempos. Si hiciéramos un campo semántico de la luz y elimináramos los vocablos científicos, es seguro que nos aparecerían palabras como sol, vida, liberación, salvación, felicidad, éxito, conocimiento, etc...

El papel fundamental de la luz en la vida del hombre es conocido de antiguo y condujo a los hombres a hacer de ella un símbolo de buenos augurios.

La idea de que el conocimiento es luz y la ignorancia tinieblas se encontraba ya presente en las creencias de nuestros ancestros.

Entre los persas, el dios Ahura-Mazdá era el bien, lo bello, por oposición a Ahriman, príncipe de las tinieblas que era el mal.

Los egipcios adoraban al Sol (y por tanto a la luz) como símbolo de la vida. Le llamaron Ra, Amón e incluso Atón (el dios universal resultado de la revolución de Amenofis IV-Akenatón). El Sol fue Mithra o Apolo para griegos y romanos. En los altares familiares de los parsis había siempre una luz encendida, como la había más tarde en las mezquitas, sinagogas e iglesias.

Tanto en la Qabblah, el Corán, el Rig-Veda y la Biblia, aparece la luz como el paradigma de la vida, de la felicidad, del triunfo.

El término luz, en sí, desborda pues ampliamente su significado físico para convertirse en la imagen de lo que ilumina, no ya a los objetos materiales, sino, el alma o el espíritu.

Recuerdo unos versos de Machado de su poema "*A un olmo seco*", en el que el poeta (destrozado por la cruel enfermedad y posterior muerte de su mujer) hace un maravilloso canto de esperanza, de vida. Observa que, con la llegada de la primavera, una rama verde le ha salido a un tronco de un olmo, carcomido y seco. Dice Don Antonio:

*"Mi corazón espera
también, hacia la luz y hacia la vida
otro milagro de la primavera"*

También la religión católica contempla en la palabra de Jesús la dualidad: luz y vida.

"Una vez más Jesús se dirigió a la gente y les dijo: *"Yo soy la Luz del mundo. El que me sigue no andará en tinieblas, sino que tendrá la luz de la vida."* Dice San Juan (8:12)

*Comprender las cosas que nos rodean es
la mejor preparación para comprender
las cosas que hay más allá.*

HIPATIA DE ALEJANDRÍA

Resumen

Esta Tesis Doctoral pretende ayudar al esclarecimiento de los mecanismos a través de los cuales se producen procesos fotoinducidos en la Naturaleza tan importantes como la fotosíntesis, el proceso de la visión, y la fotofísica de los ácidos nucleicos. Además del claro interés que el estudio de estos fenómenos tiene en sí mismo, puesto que son los responsables de que la vida y el mundo hayan evolucionado tal y como los conocemos, su comprensión puede tener aplicaciones en muchos ámbitos. Por ejemplo la transferencia de carga que tiene lugar durante la fotosíntesis se produce con un rendimiento realmente elevado (próximo al 95 %) que sería interesante poder reproducir de modo artificial. Los ácidos nucleicos presentan unas propiedades que, además de haber permitido su selección a lo largo de la evolución como molécula poseedora de la información hereditaria, le confieren también unas características conductoras de útil aplicación. De invalorable importancia sería también que, gracias a la comprensión precisa del proceso de la visión, se pudiera construir un ojo artificial. Por tanto, queda claro que es necesario estudiar, comprender y aprender de aquellos procesos que la Naturaleza ha ido perfeccionando a lo largo de la evolución en la Tierra.

El estudio teórico de estos fenómenos requiere de una visión interdisciplinar que incluye la biología, la fotoquímica y fotofísica y, por supuesto la química cuántica, que es la herramienta empleada para llevar a cabo la investigación presente. Por esta razón, los primeros capítulos tienen en general un carácter introductorio a las áreas en las que está inmersa la Tesis Doctoral. El capítulo 1 pretende dar una visión de la importancia que la radiación electromagnética ha tenido en la conformación del mundo y la vida, tal y como la conocemos, así como introducir algunos conceptos básicos relacionados con los rangos de energías que comprende el espectro electromagnético. También en este capítulo, y con la finalidad de tener una visión más clara, se hace una breve revisión de los procesos y sistemas biológicos en los que se producen los fenómenos fotofísicos y fotoquímicos estudiados. Así, se repasará el proceso de la fotosíntesis, haciendo hincapié en la cascada fotoinducida de reacciones de transferencia de carga que tienen lugar; el proceso de la visión, fundamentalmente la reacción de fotoisomerización que la desencadena; y, también, se ofrecerá un resumen de las principales características de la molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). En el capítulo 2 se plantean los principales objetivos que se han deseado alcanzar mediante los trabajos realizados durante estos años de investigación y cuyos resultados se recogen en la Tesis. Puesto que toda la investigación se ha llevado a cabo desde un punto de vista teórico y utilizando las herramientas químico-cuánticas que se han estimado más adecuadas para los sistemas abordados, se ha considerado de interés hacer una breve revisión histórica del nacimiento de la cuántica, que dio una nueva perspectiva del mundo, así como dar una visión general de las principales metodologías químico cuánticas. Todo esto se incluye en

el capítulo 3, donde además se ha intentado exponer las claves de la metodología *ab initio*, resaltando especialmente dentro de ella la CASSCF y CASPT2 que son las principalmente empleadas a lo largo de todas las investigaciones. El capítulo 4 es el último de carácter introductorio. En él se ha intentado definir los principales conceptos de fotofísica y fotoquímica, ya que se van a emplear continuamente, tanto en el planteamiento, como en la discusión de los fenómenos cuyo estudio se ha llevado a cabo.

En los siguientes capítulos, los 5, 6 y 7, se detallan las investigaciones realizadas y se exponen los resultados y las conclusiones más relevantes. El capítulo 5 está dedicado al estudio del papel que los excímeros desempeñan en la fotoquímica y fotofísica de las bases de DNA. Concretamente se estudia tanto su posible formación, como si a través de ésta se puede explicar sus características fotofísicas y fotoquímicas. En el capítulo 6 se intenta modelizar los procesos de transferencia de carga y energía mediante su estudio en dos procesos o sistemas biológicos paradigmáticos: la fotosíntesis y el DNA. El capítulo 7 se centra en el proceso de la visión y en la influencia electrostática del entorno proteico en la reacción de fotoisomerización.

Finalmente, en un último capítulo se recogen todas las conclusiones a las que se ha llegado a través del trabajo realizado, cuya relevancia viene avalada por la publicación de varios artículos en revistas científicas de alto impacto que se adjuntan al final de la Tesis Doctoral.



*"Todo lo que existe,
vive de la Luz"*

Louis I. Kahn



1. INTRODUCCIÓN: LA LUZ, FUENTE DE VIDA

1

INTRODUCCIÓN: LA LUZ, FUENTE DE VIDA

La luz ha desempeñado un papel único y fundamental en la conformación del mundo y de la vida tal y como los conocemos. Es la fuente primaria de energía vital, se utiliza para la recopilación y transporte de información y además es también, en parte, responsable del camino que la evolución ha tomado en la Tierra y de la biodiversidad existente. Por todo esto, el estudio de su naturaleza y comportamiento ha sido una de las cuestiones que más curiosidad ha despertado en la humanidad desde el principio de los tiempos.

La Fotobiología es la ciencia que estudia los efectos de la luz en los seres vivos.¹ Se trata de un concepto absolutamente interdisciplinar que incluye áreas de conocimiento de Biología, Fotoquímica, Espectroscopia y Fotofísica, entre otras.

La luz natural que existe en la superficie de la Tierra proviene principalmente del Sol. También llega luz desde las estrellas, que desde un punto de vista fotobiológico tiene relevancia sólo en algunos casos como en la navegación de las aves durante las migraciones nocturnas. La luz de la Luna, reflejo de la del Sol, interviene en la regulación de los ritmos biológicos, sincronizando el comportamiento de animales marinos o alterando la fotoperiodicidad² de algunas plantas. Sin embargo, la mayoría de los fenómenos fotobiológicos se rigen por la luz diurna, por ejemplo el almacenamiento de energía por medio de la fotosíntesis, proceso a través del cual plantas, algas y ciertas bacterias

convierten la energía radiante en energía química. El tipo de sistema responsable de la absorción de radiación electromagnética se ha podido identificar, en la mayoría de sistemas biológicos, mediante la utilización de diversas técnicas espectroscópicas. Dichos sistemas, se conocen con el nombre de fotorreceptores y son pigmentos proteicos que absorben la luz al inicio de una serie de eventos (fotociclo) y posibilitan finalmente la percepción de la luz o la regulación de un proceso fisiológico inducido por la luz. Dentro del fotorreceptor se puede distinguir un sistema molecular que será el que absorba principalmente la radiación: el cromóforo. El resto del fotorreceptor, el entorno proteico, modulará la absorción. El término fotorreceptor se usa en ocasiones con un significado algo diferente, sobre todo en el ámbito de la biología, donde se nombra de este modo a las células que responden a la luz, como los bastones y los conos de la retina. Justamente el proceso de la visión comienza gracias a una reacción fotoinducida por la que, al parecer, la Naturaleza tiene una especial predilección, ya que es punto de partida en varios procesos biológicos. Esta reacción consiste en una fotoisomerización *cis-trans* de un cromóforo. Aprendiendo de la Naturaleza, se puede llegar al diseño de procesos fotoquímicos con notables aplicaciones tanto médicas como tecnológicas.

El comportamiento de la luz cuando viaja a través del espacio y cuando interactúa con la materia juega un papel central en los dos principales paradigmas del siglo XX: la relatividad y la física cuántica. La radiación electromagnética comprende un amplio rango de energías, desde ondas de radio, o las microondas, a los rayos X o γ , (ver Figura 1.1) y cada uno de ellos interactúa con la materia de forma distinta. Pero, ¿qué es lo que se entiende cuando se utiliza el término *luz*?

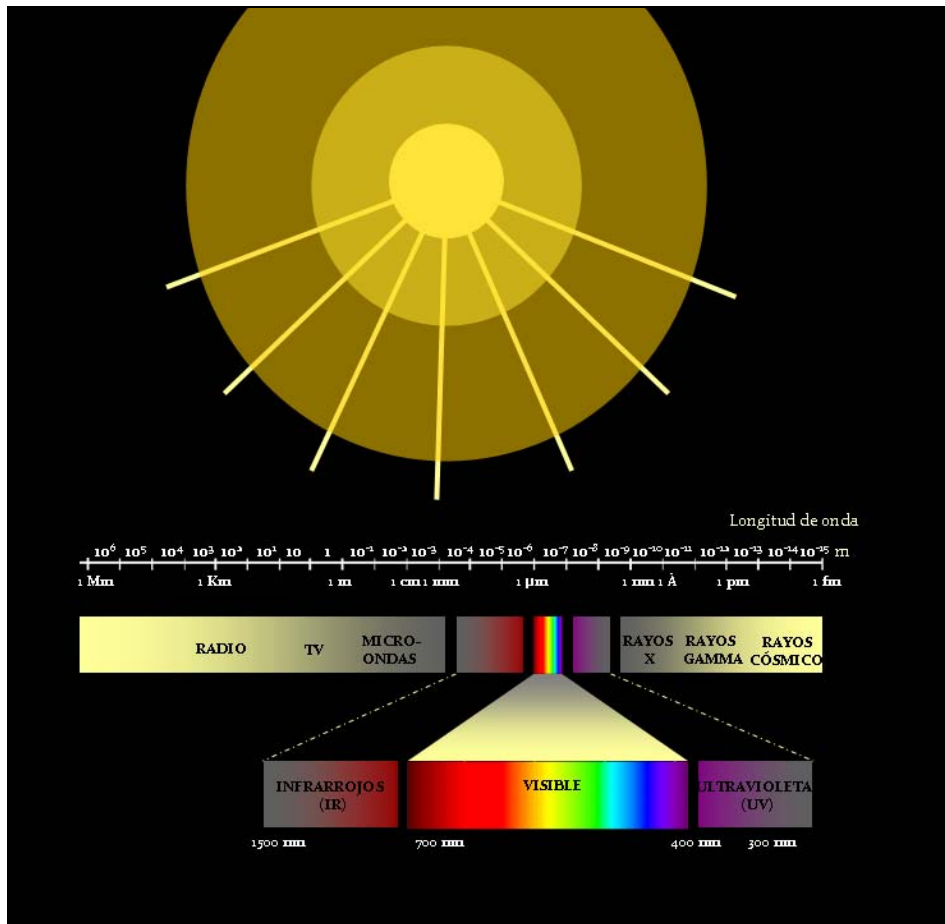


Figura 1.1. Esquema del espectro electromagnético.

Tendemos a llamar luz a aquel rango de energías del campo electromagnético que comprende la región visible para el ser humano, es decir, atendiendo al comportamiento ondulatorio de la radiación electromagnética, longitudes de onda en el vacío entre 400 y 700 nm. Esta región del campo electromagnético se conoce también con el nombre de *radiación fotosintéticamente activa* (*photosynthetically active radiation*). Sin embargo, el espectro de radiaciones importantes en biología es mucho más amplio. Por ejemplo, la región comprendida

entre 700-750 nm se denomina *rojo lejano* (*far-red light*) por su especial relevancia en botánica. También existe radiación de longitud de onda más larga o más corta que la visible y que es activa fotosintéticamente para muchos organismos, del mismo modo que algunos seres, tales como ciertos insectos, pájaros, peces, e incluso mamíferos perciben radiación fuera del intervalo visible humano, o no la perciben en absoluto. La radiación infrarroja, de longitudes de onda más largas que las del visible, y especialmente la ultravioleta, de longitud de onda más corta, tienen un papel muy relevante dentro de la fotobiología. La parte ultravioleta del espectro se puede clasificar* en:

- Ultravioleta A (UV-A): entre 315-400 nm
- Ultravioleta B (UV-B): entre 280-315 nm
- Ultravioleta C (UV-C): < 280 nm

Radiaciones de mayor energía, provenientes de las fuentes de radiactividad terrestres y de la radiación cósmica, han tenido y tienen asimismo un papel esencial en el desarrollo biológico, fundamentalmente como fuentes de mutación genética. La luz natural nunca tiene una única longitud de onda, es una mezcla de todas ellas.

Cuando caracterizamos la luz por su longitud de onda nos referimos a la misma en el vacío, donde la velocidad de la luz (c) se conoce exactamente, 29979.4562 km/s, y es constante, independientemente de su longitud de onda y del movimiento de la fuente de radiación en relación al observador. Cuando la luz pasa a través de la materia (por ejemplo agua), su velocidad y la longitud de onda (λ) decrece proporcionalmente, quedando la frecuencia inalterada

* Según el criterio sugerido en 1930 por la Comisión Internacional de Iluminación CIE (Commission Internationale de l'Eclairage).

($v = c/\lambda$). Cuando pensamos en la luz como (partículas) fotones podemos asignar una cantidad de energía (E) a cada fotón. La relación $E = hv$ (Ecuación 1.1), o lo que es lo mismo $E = hc/\lambda$, es el nexo de unión que nos relaciona la energía del fotón expresada en cuantos (hv) de energía, con las propiedades ondulatorias de la luz.

Esta Tesis Doctoral está dedicada al estudio del mecanismo químico por el que tienen lugar distintos procesos fotoinducidos fundamentales en la Naturaleza. Con la finalidad de comprender mejor el marco en el que se desarrollan estos fenómenos, a continuación se va a hacer una breve revisión de cada uno de estos procesos biológicos.

1.1. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis³ es el proceso físico-químico por el cual determinados seres vivos, siendo los más conocidos las plantas, son capaces de sintetizar materia orgánica a partir de carbono inorgánico por medio de la energía solar. Ésta, en el proceso fotosintético, se convierte en energía eléctrica y posteriormente en energía química.

La mayoría de los organismos fotosintéticos van a tomar como fuente de carbono el CO₂ atmosférico, que se reducirá en el proceso de fotosíntesis hasta convertirse en un carbohidrato.



Dependiendo de la molécula que va a ceder los electrones para que esta reducción sea posible, se puede hablar de dos tipos de fotosíntesis:

- **Fotosíntesis Oxigénica:** La molécula que sufre la oxidación es el agua. Como subproducto del proceso fotosintético se obtiene O_2 . Este tipo de fotosíntesis tiene lugar en plantas evolucionadas, en las algas verdes, rojas, marrones y amarillas, así como en las cianobacterias azul-verdosas.
- **Fotosíntesis Anoxigénica:** La molécula que sufre la oxidación no es el agua. En algunos tipos de organismos fotosintéticos se trata del SH_2 . Realizan este tipo de fotosíntesis las bacterias púrpura, las verdes azufradas, las Gram positivas (G+) y las verdes deslizantes.

Hay que resaltar que gracias al conocimiento que se tiene de las distintas etapas del proceso fotosintético anoxigénico, fruto de numerosas investigaciones^{4,5,6} se ha podido dilucidar gran parte de los mecanismos subyacentes, lo cual conlleva un gran volumen de información y complejidad.

El proceso global de la fotosíntesis, esquematizado en [1], transcurre a través de un numeroso conjunto de reacciones que se pueden clasificar en dos grupos:

- **Reacciones que transcurren en la fase luminosa.** Gracias a ellas se produce un gradiente de potencial de reducción

y se obtiene ATP (adenosín trifosfato: moneda de intercambio energético de los seres vivos.)

- **Reacciones que transcurren en la fase oscura.** Los productos obtenidos en la etapa luminosa son empleados para la conversión del carbono inorgánico en forma de CO_2 en carbohidratos.

Las reacciones fotoquímicas que se suceden en la fase luminosa del proceso de fotosíntesis oxigénica, que concretamente son procesos de transferencia electrónica, aparecen esquematizados en el conocido como diagrama Z.

- **Diagrama Z**

En el llamado diagrama Z (ver Figura 1.2), aparecen representados, desde un punto de vista energético, los procesos de transferencia electrónica que tienen lugar en la fotosíntesis oxigénica.⁵ La escala de energías que aparece en el diagrama indica la capacidad de una molécula para transferir un electrón a la siguiente especie. Por tanto, cuanto más alto se encuentre situada una molécula dentro del diagrama, mayor será su poder reductor. Las transferencias que se produzcan desde una molécula situada en una posición más alta a otra que se encuentre en una posición inferior en el esquema, serán favorables energéticamente, pero, si por el contrario, se produce una ascensión en el diagrama, será necesario el aporte de energía exterior. Este aporte energético lo proporciona la luz solar.

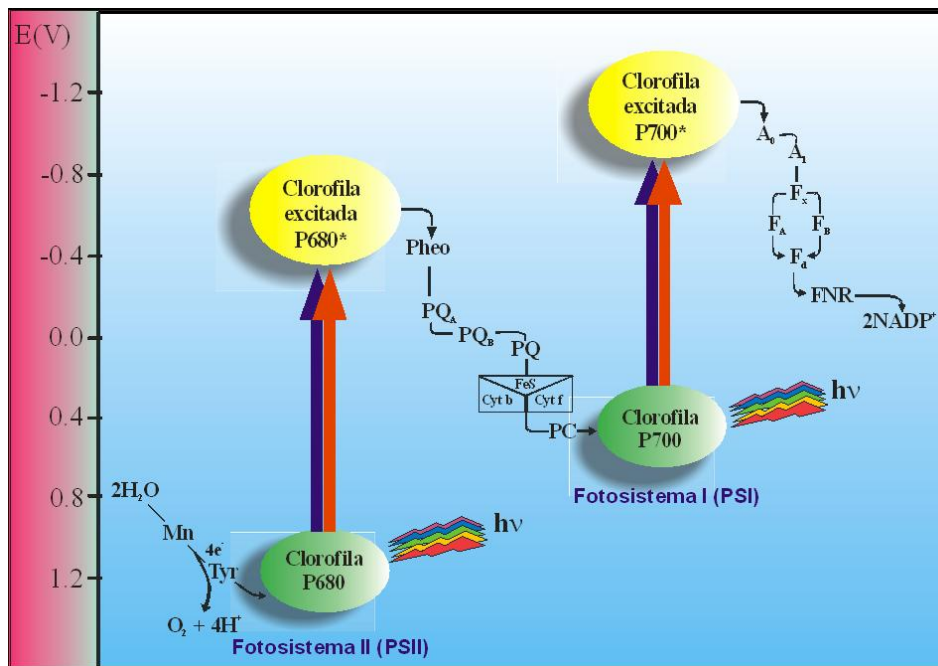


Figura 1.2. Esquema Z adaptado del creado por Wilbert Veit y Govindjee, 2000.⁶ Las abreviaturas utilizadas son: Mn para un complejo formado por 4 átomos de manganeso enlazados al centro de reacción PSII, que es capaz de reaccionar con dos moléculas de agua y dar una molécula de oxígeno, cuatro protones y cuatro electrones; Tyr para una molécula de tirosina, que inyecta los electrones al centro de reacción; P680 es un dímero de clorofila *a* que se encuentra en el PSII, y que por absorción de un fotón alcanza un estado excitado: P680*; Pheo representa una molécula de feofitina, estructuralmente análoga a la clorofila, pero sin átomo de Mg central; PQA es una molécula de plastoquinona fuertemente enlazada al PSII, capaz de aceptar y donar un único electrón; PQB es otra molécula de plastoquinona, pero débilmente enlazada y que es capaz de aceptar dos electrones y dos protones para convertirse en una plastoquinona libre (PQ); FeS que es la proteína de Rieske, Cyt f (citocromo f) y Cyt b (citocromo b, Cyt b_{6L} es una molécula de alta energía de citocromo b₆ y Cyt b_{6H} una molécula de baja energía del mismo), forman el complejo Cyto b₆f; PC representa a la plastocianina, una pequeña proteína de cobre; P700 es un dímero de clorofila *a* que se encuentra en el PSI; P700* es el estado excitado al que accede el P700 al absorber un fotón; A₀ es una molécula de clorofila; A₁ es una molécula de filoquinona (vitamina K); F_X, F_A y F_B son centros proteicos de hierro-azufre, que no poseen movilidad; F_d es la ferredoxina, una proteína de hierro-azufre que posee algo de movilidad; FNR es la enzima ferredoxin-NADP oxidoreductasa, que contiene el grupo FAD (Flavin adenina dinucleótido); NADP⁺ es la forma oxidada del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido y NADPH es su forma reducida.

El diagrama Z muestra la cadena de transporte a la que son sometidos los electrones que cede al agua, hasta que finalmente son aceptados por el NADP⁺ (forma oxidada del fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido). A través de esta cadena, las plantas son capaces de transformar energía luminosa en energía química, obteniendo finalmente NADPH y ATP.

Las plantas superiores poseen dos centros principales de reacción, los conocidos como Fotosistema I (PSI) y Fotosistema II (PSII). Estos centros poseen una estructura muy compleja (ver Figura 1.3). El PSII consta de más de 50 polipéptidos y de al menos 9 componentes redox diferentes que participan en la transferencia de carga fotoinducida. El PSI también es un complejo proteico. En estos centros de reacción existen dímeros de clorofila *a*, que actúan como dadores primarios. El dímero de clorofila del PSII recibe el nombre de P680 y el del PSI, P700. Esta denominación está relacionada con la longitud de onda a la que absorben cada uno de estos dímeros.

La absorción fotónica de P680 y P700 se produce de forma simultánea. Cada uno de estos pares de clorofila *a* pasa a un estado electrónico excitado: P680* y P700*.

Estas especies excitadas son capaces de donar un electrón a una molécula vecina que actúa como aceptor primario, y se produce una separación de cargas (ver ecs. [2] y [3]). Este hecho se conoce con el nombre de *paso fotoquímico primario de la fotosíntesis oxigénica*. **Es el único paso en todo el proceso fotosintético donde se transforma energía luminosa en energía química.**

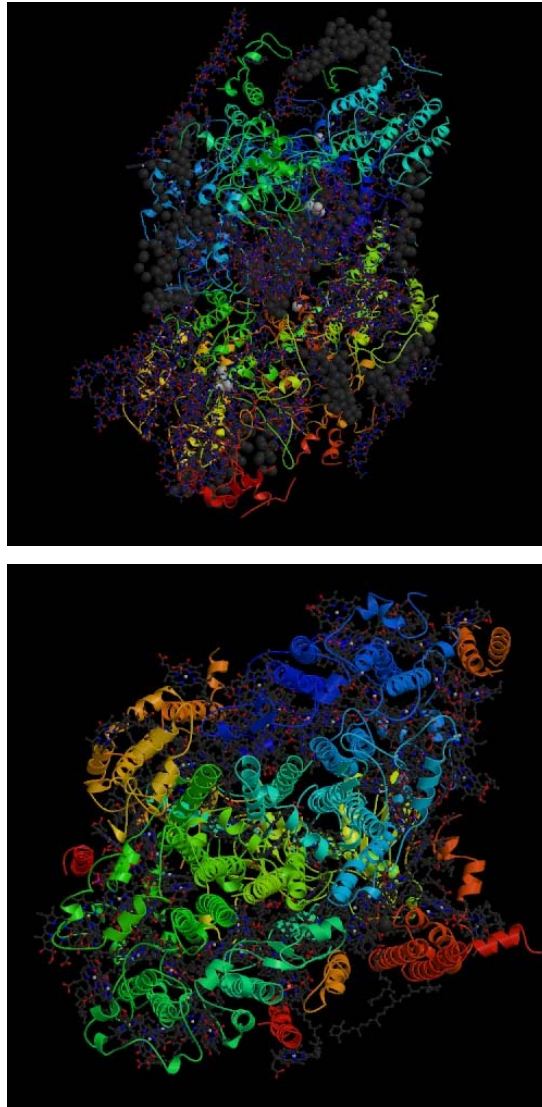


Figura 1.3. Estructuras tridimensionales de los centros de reacción fotosintéticos. En la parte superior aparece la estructura del PSII de la *Synechococcus elongatus*⁷ y en la inferior se encuentra el PSI de la misma cianobacteria.⁸ Estas figuras se han obtenido a partir de los ficheros de coordenadas 1IZL (para el PSII) y 1JBO (para el PSI) del Protein Data Bank (PDB).⁹

Paso Fotoquímico Primario de la fotosíntesis oxigénica en el PSII



Paso Fotoquímico Primario de la fotosíntesis oxigénica en el PSI



En el caso del P680, la molécula que actúa como aceptor primario es la Feofitina (Pheo), mientras que en el caso del P700 se trata de un monómero especial de clorofila.

La reducción de P680⁺ y P700⁺ a su estado neutro se produce de manera casi simultánea gracias a la sucesión de procesos de transporte electrónico, esquematizados en la Figura 1.2 (Diagrama Z). Estas etapas de transferencia de carga han sido probablemente diseñadas durante el proceso evolutivo para prevenir que la separación de cargas conseguida se recombine.

La primera reacción de transferencia de carga que se produce en el PSII, transcurre debido a la intervención de una molécula de plastoquinona fuertemente enlazada a la proteína, que acepta el electrón que la feofitina ha recibido del P680*:



Tras esta primera reacción se suceden otras reacciones de transferencia de carga encadenadas en las que intervienen una segunda molécula de plastoquinona, el complejo citocromo bf y la plastocianina.

Ésta última, una pequeña proteína móvil de cobre, es la que finalmente cede un electrón al P700, que vuelve así a su forma reducida. Por su parte el P680⁺ recupera el estado neutro gracias a un electrón que recibe de moléculas de agua.

El oxígeno producido es el que utilizan las plantas y los animales para poder vivir. Aunque este hecho ya es de por sí suficientemente relevante, existen en la actualidad proyectos para el aprovechamiento de la luz solar en campos tales como la ingeniería molecular, la nanotecnología o el desarrollo de nuevos materiales, que justifican la importancia de la dilucidación detallada de los mecanismos responsables de las reacciones dador/aceptor implicadas en el proceso fotosintético. Este aspecto constituye en la actualidad un tema de gran debate y la química cuántica puede sin duda ayudar a clarificar con detalle el conocimiento minucioso de estos mecanismos.

1.2. DNA: LA MOLÉCULA DE LA VIDA

Los genes que contienen la información hereditaria en los cromosomas están constituidos esencialmente por largas fibras de un ácido nucleico, el ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, DNA). La secuencia particular de bases en el DNA especifica, a través de un proceso mediado por otro ácido nucleico: el ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, RNA), la secuencia de aminoácidos de una cadena polipeptídica, que a su vez determinará la estructura y función de la proteína. En el DNA se encuentra la información necesaria para la formación de un organismo completo. Cuando las células se dividen,

cada célula hija contiene una copia del DNA original que se obtiene gracias al proceso de replicación. El éxito de este proceso reside en la naturaleza complementaria de las bases del DNA, que hace que una cadena de la célula madre actúe como un molde para la cadena de la célula hija.

Las bases de DNA actúan como cromóforos con absorción de luz ultravioleta y durante su proceso de desexcitación pueden dar lugar a fotoproductos que podrían actuar como lesiones en el material genético,^{10,11} ya que podrían conducir a una replicación errónea y por tanto a una mutación. El organismo vivo presenta varios mecanismos de defensa para evitar y/o corregir las posibles lesiones. De hecho, en opinión de muchos autores,^{12,13} no es casualidad que los ácidos nucleicos hayan sido escogidos por la Naturaleza como moléculas de transmisión de la información hereditaria sino producto de la evolución continua desde el origen de la vida. Sin embargo, puesto que la vida se desarrolla inmersa en un continuo baño de luz solar, es inevitable que se produzcan dichas lesiones en una cierta proporción. Debido a la creciente preocupación sobre este tema, el dilucidar los mecanismos de dichas disfunciones constituye en la actualidad un tema de investigación de extraordinario interés.^{10,14,15,16,17,18,19,20} Siendo el DNA poseedor de la información hereditaria, su manipulación y modificación ha abierto todo un campo de investigación a través de la Ingeniería Genética que ha llevado a grandes y controvertidos avances^{21,22,23} en ámbitos que van desde la alimentación (mediante la creación de los llamados alimentos transgénicos^{24,25,26,27}), al área médica, con la clonación, el análisis y la terapia génica²⁸ y la generación de células madre. No obstante, recientemente se han estudiado los ácidos nucleicos desde otra

perspectiva. El DNA posee unas propiedades conductoras que le permiten, en cierta medida, reparar lesiones a través de la actuación de una enzima. Ésta se sitúa en la cadena de DNA a una cierta distancia del lugar de la mutación y es capaz de corregir la lesión, por ejemplo, mediante el envío de un electrón que compensa un defecto de cargas y la devuelve a la normalidad. Se estudia por ello si el DNA se podría considerar un alambre molecular capaz de conducir virtualmente la carga eléctrica,²⁹ lo que abre todo un campo de posibilidades de utilización del DNA en el área de la electrónica molecular.

A lo largo de la presente Tesis Doctoral se va a hacer referencia tanto a los componentes del DNA como a su estructura estándar por lo que se ha considerado interesante especificar sus principales características.

- **Estructura del DNA**

❖ **Estructura primaria del DNA**

El DNA es un ácido nucleico, una molécula de carácter polimérico, cuyos monómeros son los nucleótidos (los ácidos nucleicos son polinucleótidos). Un nucleótido individual consta de tres partes unidas por enlaces covalentes:

- a) Una **base nitrogenada**. Existen nucleobases de dos tipos, derivados de las *purinas* o derivadas de las *pirimidinas* (ver Figura 1.4). Las bases purínicas más comunes son la adenina (A) y la guanina (G), ambas presentes tanto en el DNA como

en el RNA, mientras que las bases pirimidínicas son tres: la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U). El uracilo se encuentra únicamente en el RNA sustituyendo a la timina del DNA. Las bases nitrogenadas tienen una serie de características que les confieren unas propiedades determinadas. Una característica importante es su carácter aromático, consecuencia de la presencia en el anillo de dobles enlaces en posición conjugada. Ello les confiere la capacidad de absorber luz en la zona ultravioleta del espectro en torno a los 260 nm, lo cual puede ser aprovechado para determinar el coeficiente de extinción del DNA y hallar la concentración existente de los ácidos nucleicos. Otra de sus características es que presentan tautomería o isomería de grupos funcionales debido a que un átomo de hidrógeno unido a otro átomo puede migrar a una posición vecina. Por otro lado, y aunque se trate de moléculas apolares, las bases nitrogenadas presentan suficiente carácter polar como para establecer puentes de hidrógeno, ya que tienen átomos muy electronegativos (nitrógeno y oxígeno) presentando carga parcial negativa, y átomos de hidrógeno con carga parcial positiva, de manera que se forman dipolos que permiten que se formen estos enlaces débiles.

- b) Una **molécula de azúcar** de 5 carbonos que será la β -D-ribosa en el caso del RNA y la β -D-desoxirribosa en el caso del DNA.
- c) **Un grupo fosfato.**

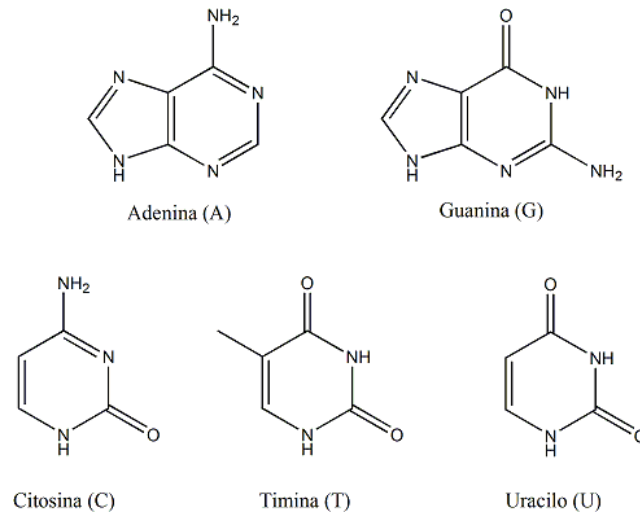


Figura 1.4. Las cuatro bases nitrogenadas mayoritarias que se encuentran en los ácidos nucleicos. Purinas: adenina (A) y guanina (G). Pirimidinas: citosina (C), timina (T) y uracilo (U). El U se encuentra casi exclusivamente en el RNA, donde sustituye a la T.

La base nitrogenada se une al azúcar a través de un enlace N-glicosídico a través del carbono C_{1'} de la pentosa y el nitrógeno N₁ de las pirimidinas o N₉ de las purinas. La unión de la nucleobase con el azúcar forma lo que se conoce como nucleósidos, que se diferencian de los nucleótidos en que en los últimos uno de los grupos hidroxilo de la pentosa está esterificado con ácido fosfórico (Ver Figura 1.5). Lo más común es que en los nucleótidos esté esterificado el grupo hidroxilo en la posición 5'.

La unión de los distintos nucleótidos para formar el polinucleótido se produce a través de un enlace fosfodiéster entre el grupo -OH del C_{3'} de la molécula de azúcar de uno de los nucleótidos y un grupo -OH del fosfato que está unido al C_{5'} de la molécula de azúcar del siguiente nucleótido. Lo que distingue a un nucleótido de otro es

únicamente la base nitrogenada y por ello la secuencia del DNA se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética.

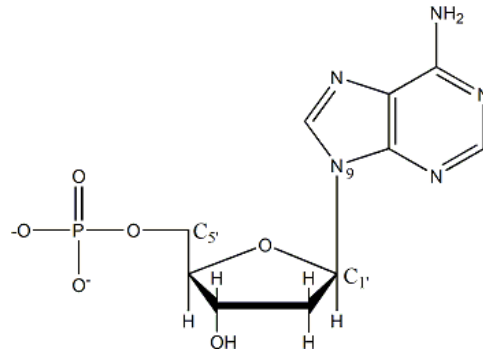


Figura 1.5. Nucleótido de adenina.

❖ **Estructura secundaria del DNA: la doble hélice.**

La estructura de doble hélice del DNA propuesta por Watson y Crick en 1953³⁰ fue fruto del esfuerzo de numerosas investigaciones,^{31,32,33,34,35} las cuales se remontan hasta 70 años antes de esta fecha, cuando Friedrich Miescher aisló por primera vez un material al que llamó nucleína.³⁶ Watson y Crick se basaron fundamentalmente en la información de los patrones de rayos X y en el análisis químico que mostraba que la cantidad de adenina siempre era igual que la cantidad de timina, y la de guanina igual a la de citosina.³⁷ La conclusión a la que llegaron fue que el DNA consta de dos cadenas de polinucleótidos enrolladas para formar una doble hélice. Los puentes de hidrógeno entre

bases de cadenas opuestas determinan la alineación de la hélice. Las bases apareadas están en planos perpendiculares al eje de la hélice, mientras que el esqueleto azúcar-fosfato es la parte exterior de la misma. Las cadenas corren en direcciones antiparalelas, una de 3' a 5' y la otra de 5' a 3'. Los extremos asimétricos de las hebras de DNA se denominarán respectivamente extremo 5' y extremo 3'. El éxito de este modelo radicaba en su consistencia con las propiedades físicas y químicas del DNA. El estudio mostraba además que la complementariedad de bases podía ser relevante en su replicación, y también la importancia de la secuencia de bases como portador de información genética. Que el apareamiento de las bases sea complementario implica que la adenina se aparee con la timina a través de la formación de un par de puentes de hidrógeno ($A=T$) y la guanina con la citosina ($G\equiv C$) a través de tres. El diámetro interior del esqueleto de azúcar-fosfato de la doble hélice mide aproximadamente 11 Å. La distancia entre los puntos de enlace de las bases a las dos cadenas del esqueleto es la misma para los dos pares de bases ($A=T$ y $G\equiv C$), aproximadamente 11 Å, así que estos pares tienen justo el tamaño correcto para caber en la hélice. El diámetro exterior de la hélice es de 20 Å. La longitud de una vuelta completa de la hélice en torno a su eje es de 34 Å y contiene 10 pares de bases (ver Figura 1.6). Los átomos que constituyen las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice dejan huecos llamados surcos. Hay un surco mayor hondo y un surco menor que lo es menos en la doble hélice, y probablemente ambos puedan ser puntos de unión de polipéptidos. Los puentes de hidrógeno entre las bases que estabilizan las dos cadenas de DNA son enlaces débiles, por lo que las dos cadenas se pueden separar y abrirse como una cremallera.

Además las cadenas de DNA se estabilizan por el apilamiento entre las bases, que permite una interacción estabilizante entre las nubes electrónicas π más o menos intensa según la secuencia de bases implicadas.

En esta estructura estándar cada par de bases tiene un giro de 32° respecto al siguiente permitiendo un solapamiento parcial de las nubes electrónicas de las bases apiladas.

Esta estructura del DNA que se ha comentado, la propuesta por Watson y Crick, se llama B-DNA, y resulta ser la forma más común que presenta el DNA en la Naturaleza. Sin embargo, es necesario comentar que pueden existir otras estructuras secundarias³⁸ (ver Figura 1.7). Una de estas formas es el A-DNA,^{39,40} que se trata de una doble hélice dextrógira (la del B-DNA también lo es), en la que hay 11 pares de bases en cada vuelta de hélice. Los pares no son perpendiculares al eje de la hélice, sino que forman un ángulo aproximado de 20° respecto a la per-

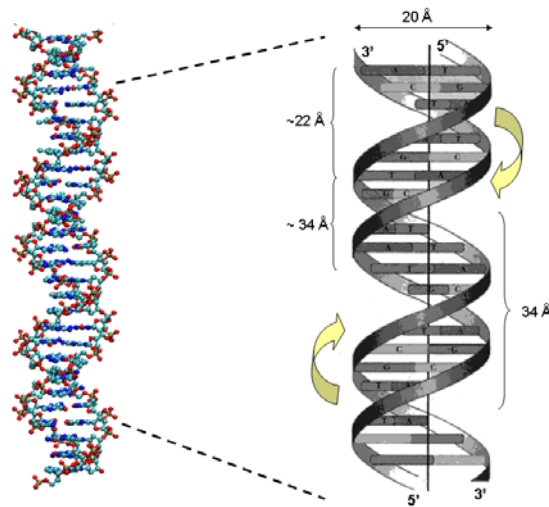


Figura 1.6. Estructura de doble hélice del B-DNA.

pendicular. Se ha encontrado esta estructura en formas deshidratadas de DNA, pero no in vivo, aunque sí se puede dar en apareamientos híbridos de hebras DNA-RNA, además de en complejos enzima-DNA. Otra forma que sí se encuentra en la Naturaleza es la Z-DNA,⁴¹ una doble hélice levógira donde los planos de las bases están en zig-zag. Se suele dar cuando se producen metilaciones de la posición 5 del anillo pirimidínico de las citosinas y se puede considerar un derivado de la forma B-DNA, ya que se produce cuando se voltea un lado del esqueleto 180°, sin tener que romper ni el esqueleto ni los puentes de hidrógeno.

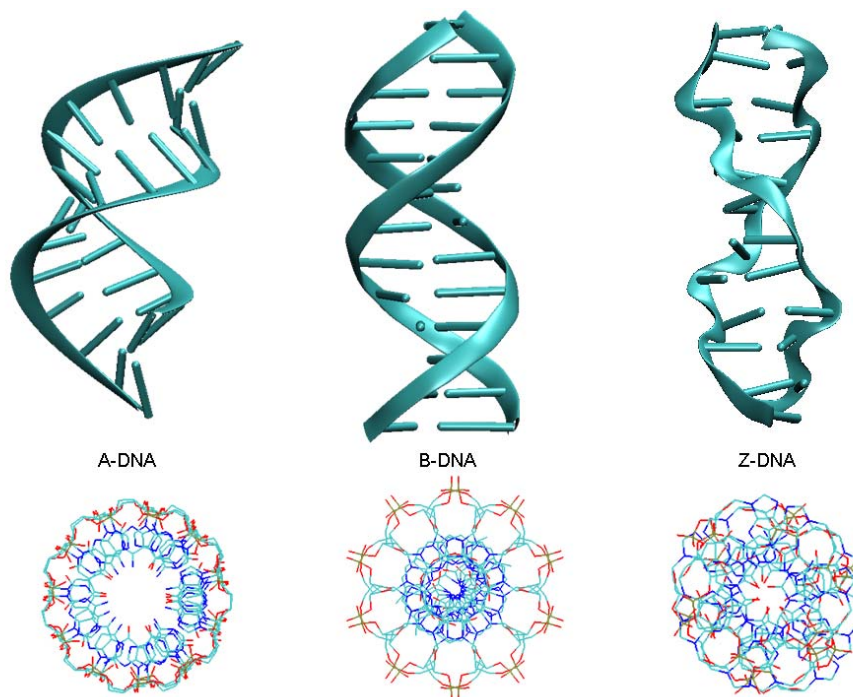


Figura 1.7. De izquierda a derecha, las estructuras de A, B y Z-DNA. En la parte superior de la figura se muestran las cadenas desde una vista frontal, mientras que en la inferior se observan desde un ángulo superior.

❖ **Estructura terciaria**

La doble hélice de DNA se pliega para formar los cromosomas. La forma de plegamiento varía según si se trata de organismos procariotas o eucariotas. En los procariotas, así como en orgánulos celulares como mitocondrias y cloroplastos se pliega como una superhélice, en forma circular y generalmente asociado con una pequeña cantidad de proteínas. En cambio en eucariotas, puesto que el DNA de cada cromosoma es muy grande, el empaquetamiento es más complejo y compacto y necesita la presencia de proteínas (entre otras las histonas).

- **Fotoestabilidad de los ácidos nucleicos**

Que los ácidos nucleicos sean las moléculas elegidas por la Naturaleza para transmitir la información hereditaria, no ha sido fruto del azar, sino de una larga evolución que comenzó en los orígenes mismos de la vida en la Tierra. Las condiciones que entonces existían, constituían un entorno hostil. Sin capa de ozono en la atmósfera que limitara la luz UV que llegaba a la Tierra, la radiación incidente era cien veces mayor que en la actualidad. Por este motivo la formación de moléculas de larga longitud estaba muy dificultada, ya que se quebraban precisamente por la acción de la radiación UV. Esto podría sugerir que la primera vida se originó en zonas alejadas de la luz, sin embargo existen estudios¹² que indican que precisamente esas altas radiaciones de luz UV fueron primordiales para la supervivencia de las primeras cadenas de RNA, el precursor evolutivo del DNA. La

habilidad del RNA para ensamblarse a partir de sus partes (azúcares, fosfatos y bases nitrogenadas) se ha estudiado con y en ausencia de radiación UV, y al parecer se ha encontrado la facilidad de las bases nitrogenadas para absorber y dispersar radiación UV podría haber protegido el primitivo esqueleto de RNA de la ruptura. Esto daría al RNA una ventaja selectiva en la originaria Tierra. Parece que las bases nitrogenadas que fueron seleccionadas para formar parte del RNA, lo fueron precisamente por su parcial acción protectora de la radiación UV.

- **Lesiones en el DNA inducidas por luz UV**

A pesar de su notable fotoestabilidad, al ser capaces de disipar la gran parte de la radiación ultravioleta absorbida, las nucleobases pueden dar lugar, en baja proporción, a fotorreactividad, y por ende a lesiones en el material genético causadas por la luz.

La radiación UV, especialmente la de tipo B (UV-B) es uno de los agentes genotóxicos más estudiados, y de hecho es el responsable de la mayoría de los casos de cáncer de piel inducidos por la luz solar. Se ha conseguido identificar las principales lesiones que se originan en el DNA por acción de las radiaciones UV-B y UVC-. Se trata de la reacción de dos bases pirimidínicas (T o C) adyacentes para formar bipyrimidinas.^{10,11} Entre estos fotoproductos diméricos incluyen los dímeros de tipo ciclobutano, los aductos de pirimidina-(6-4)-pirimidona y sus emparentados isómeros Dewar de valencia, cuyas estructuras aparecen esquematizadas en la Figura 1.8. De todos estos fotoproductos

los que se producen in vivo con un mayor rendimiento son los de tipo ciclobutano.

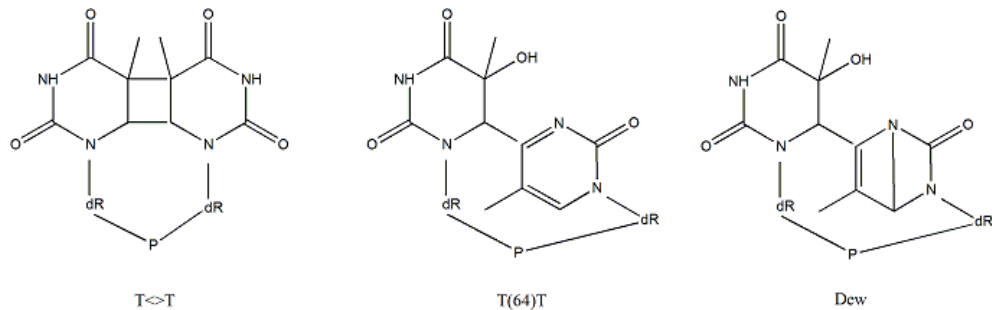


Figura 1.8. Estructura de los distintos dímeros de timina fotoinducidos que se pueden formar por acción de la luz UV. T<>T simboliza al dímero de tipo ciclobutano, T(64)T al aducto pirimidina-(6-4)-pirimidona y Dew a su isómero de tipo Dewar. dR: 2-desoxirribosa. P: grupo fosfato.

1.3. EL PROCESO DE LA VISIÓN

- Fisiología de la Visión

El ojo, el órgano de la visión, está compuesto por el párpado, el globo ocular, el aparato lagrimal y los músculos oculares externos. La participación de dos ojos en la visión binocular de los humanos y de muchos animales, permite apreciar las imágenes en tres dimensiones. El globo ocular mide unos 25 mm de diámetro y se mantiene en su posición gracias a los músculos oculares. Está envuelto por una membrana compuesta de varias capas (ver Figura 1.9). La capa interior,

llamada esclerótica, es espesa, resistente y de color blanco y recubre la capa exterior llamada coroides, que contiene abundantes vasos sanguíneos. La capa intermedia se llama retina, y es en ella donde se encuentran las células sensibles a la luz: los bastones y los conos, de las cuales se hablará más adelante. La parte anterior del globo ocular está cubierta por la córnea, una membrana transparente y resistente que carece de vasos sanguíneos. Tras la córnea se halla la cámara anterior, limitada por el iris y la pupila. Detrás de la pupila se encuentra el cristalino, el cuerpo ciliar y la cámara posterior. La cámara anterior está llena de un líquido transparente, el humor acuoso, que humedece el cristalino y garantiza su nutrición. La cámara posterior esta rellena de otro líquido coloidal llamado humor vítreo, que mantiene la tensión del interior del ojo. El iris está formado por una fina red de fibras conjuntivas, o estoma, provista de numerosos vasos sanguíneos y de los músculos que controlan la dilatación y la contracción de la pupila. El color del iris depende de la transparencia del estoma y de la cantidad de pigmento que contiene. Cuando el pigmento es escaso, los ojos son azules, mientras que cuando hay una cantidad mayor se aprecian matices verdes o castaños. El pigmento se forma durante los primeros meses de vida, por lo que todos los recién nacidos tienen los ojos de color azul grisáceo. El color definitivo se establece a los dos o tres meses de vida. Si no hay pigmentación, los ojos parecen rojos: es el caso de los albinos.

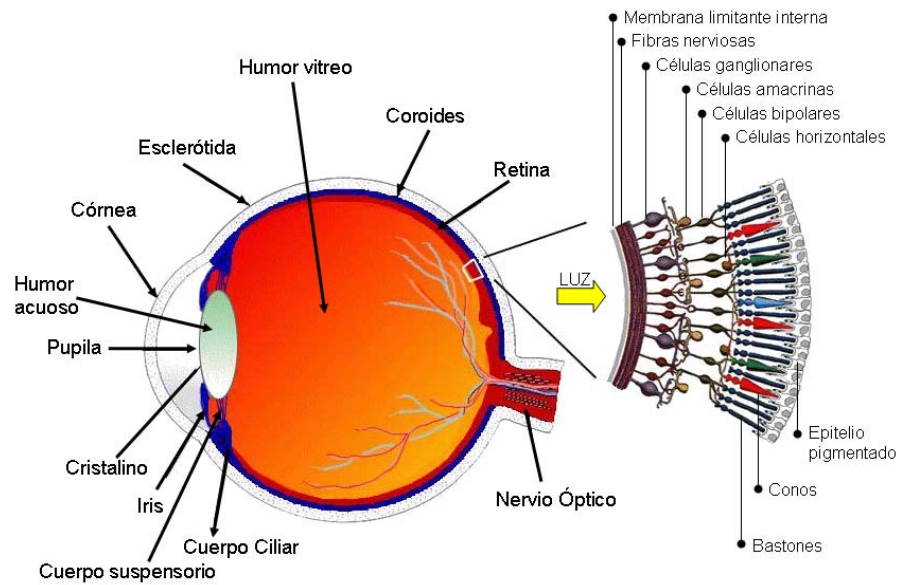


Figura 1.9. Dibujo esquemático de la anatomía del ojo humano y organización estructural de las diferentes capas de la retina. La luz atraviesa el ojo, pasa a través de la capa de células ganglionares, bipolares y amacrinas hasta llegar a la capa de células fotorreceptoras. Esta capa está formada por los bastones (en gris) y los tres tipos de conos (azul, verde y rojo) para la visión en color.

- **Las células fotorreceptoras**

La retina está formada por varios tipos de células entre las que se incluyen las células del epitelio pigmentario, las células de Müller, las células horizontales, las células bipolares, las células amacrinas, las ganglionares cuyos axones formarán el nervio óptico, y por supuesto, las células fotorreceptoras que son responsables de la captación de la luz.

Hemos comentado que existen dos tipos de células fotorreceptoras: los bastones y los conos, llamados precisamente así, por la forma que tienen (ver Figura 1.10). Cada uno de ellos contiene un pigmento que absorbe a un intervalo de longitud de onda específico y genera un impulso nervioso relacionado con la cantidad de luz absorbida. Los bastones son sensibles a niveles muy bajos de iluminación y son los responsables de nuestra capacidad de ver con poca luz (visión escotópica). Contienen un pigmento, la Rodopsina (*Rhodopsin*, Rh) cuyo máximo de sensibilidad se halla en la zona de los 500 nm (la zona de los verdes) y cuando se logra extraer en cantidades suficientes tiene una apariencia purpúrea, de ahí que en ocasiones se le conozca como 'púrpura visual'. La visión escotópica es monocromática y son los conos los que proporcionan la visión en color. Hay tres clases de conos. Cada uno de ellos contiene un pigmento fotosensible distinto. Los tres pigmentos tienen su capacidad máxima de absorción a 426, 530 y 557 nm de longitud de onda, respectivamente, y por eso se les conoce con el nombre de pigmento o cono azul, verde y rojo.^{42,43} No es que los conos se llamen así por su pigmentación, sino por el supuesto 'color de la luz' al que tienen una sensibilidad óptima. Esta terminología es bastante desafortunada, ya que las luces monocromas de 426, 530 y 557 nm de longitud de onda no causan realmente la percepción de azul, verde y rojo, sino la de violeta, azul verdoso y amarillo verdoso. Por eso, las denominaciones conos cortos, conos medios y conos largos (por el tipo de longitud de onda al que son sensibles comparativamente) es más lógica. Las abreviaciones en inglés son: *S-cones* (cortos), *M-cones* (medios) y *L-cones* (largos). Son los conos quienes nos proporcionan la visión en color (visión fotópica),

que permite distinguir notablemente bien pequeños cambios en la composición de longitudes de onda de una luz.

Existen alrededor de tres millones de conos en la retina que se sitúan principalmente en la zona central de la misma. Los conos son más difícilmente excitables que los bastones de los que hay unos cien millones situados en su mayoría en regiones distintas del centro de la retina. Los bastones humanos son capaces de excitarse y producir una señal nerviosa gracias a la acción de un único fotón. La distinta distribución y sensibilidad de los conos y bastones explica que en el crepúsculo se produzca el denominado Efecto Purkinje.^{44,45,46} Como hemos dicho los conos nos permiten ver los colores, pero funcionan sólo con una alta intensidad luminosa. A medida que el Sol se oculta, los conos se van inactivando mientras que son los bastones los que al ser más sensibles que los conos nos permiten alcanzar un nivel aceptable de visión. Esto significa que se produce un desplazamiento de la sensibilidad del ojo hacia el extremo azul del espectro (recordemos que el máximo de absorción de la Rh está sobre los 500 nm).

La rodopsina (Rh), el fotorpigmento de los bastones, se encuentra en la membrana de los segmentos externos de las células fotorreceptoras. Se trata de una proteína integral de membrana formada por 7 hélices trans-membrana y perteneciente a la familia de los receptores acoplados a una proteína-G (*G-protein coupled receptor*, GPCR), que son proteínas transductoras de la señal. Actualmente debido a la dificultad que conlleva la cristalización de las proteínas de membrana y, por tanto, la obtención de su estructura tridimensional, de todas las

GPCR sólo se conoce la estructura cristalina (a través de difracción de rayos-X) de la rodopsina bovina,⁴⁷ cuya estructura se ha utilizado posteriormente para llevar a cabo modelos moleculares del resto de pigmentos y otras GPCRs.⁴⁸

La rodopsina está constituida por dos partes, una proteica denominada opsina, y un cromóforo, el 11-*cis* retinal (ver Figura 1.11). El cromóforo se une a la opsina a través de un enlace covalente entre el grupo aldehído del 11-*cis* retinal y el grupo amino de la Lys296 (en la séptima hélice) formando una base de Schiff protonada (PSB11) cuya carga positiva se estabiliza gracias al carboxilato del Glu-113.^{49,50,51,52}

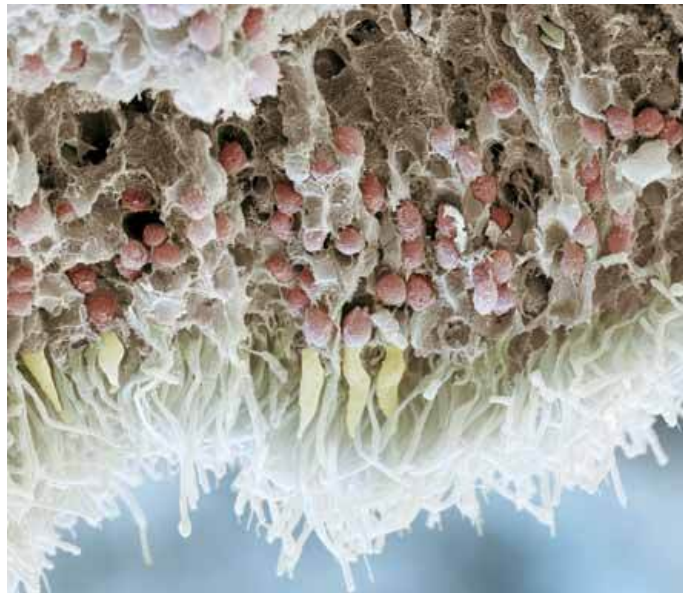


Figura 1.10. Imagen de la retina donde se muestran los dos tipos de células fotorreceptoras que la forman. Las células amarillas son los conos, responsables de la visión en color mientras que las células blancas (en la parte inferior de la fotografía) se denominan bastones y son las encargadas de la visión en blanco y negro.⁵³

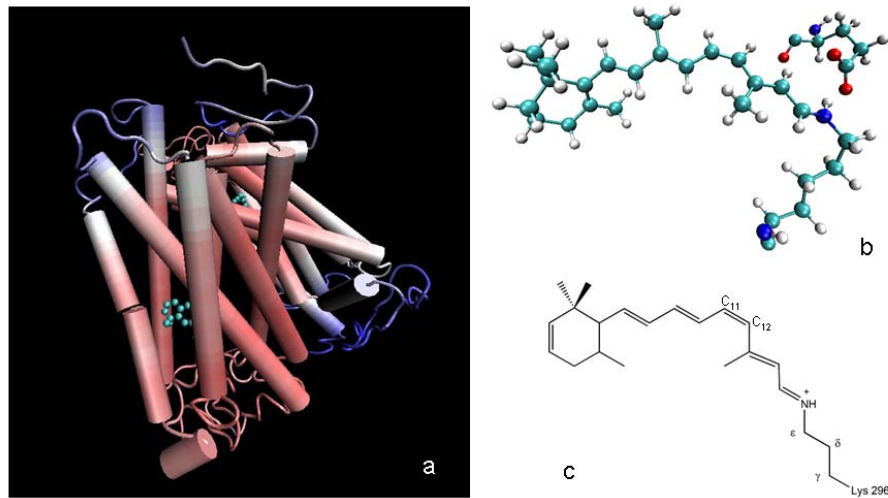


Figura 1.11. a) Representación de la Rodopsina. Figura creada a partir de los datos cristalográficos de la Ref. 47. b) Esquema del cromóforo: la base de Schiff protonada del 11-cis-retinal con el Glu-113 ejerciendo de contraión. c) Estructura del PSB11.

Además el anillo de β -ionona del retinal está acoplado con la región hidrofóbica de la opsina a través de interacciones con las cadenas laterales los aminoácidos de la cavidad proteica.⁵⁴

- **Transducción de la señal visual**

El mecanismo de la transducción visual se pone en marcha una vez que la Rh se activa por efecto de la luz, esto es, cuando sufre un cambio conformacional (el cual se considerará en el siguiente apartado) que le permite interactuar con la transducina, una proteína G

heterodimérica, desencadenando así la cascada de reacciones enzimáticas que constituyen el mecanismo de la transducción visual.

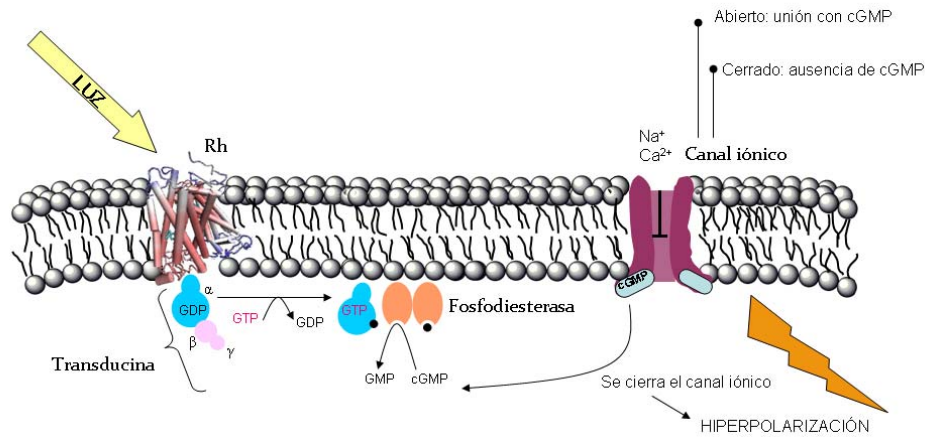


Figura 1.12. Esquema del proceso de transducción de la señal visual.

La rodopsina interacciona concretamente con la subunidad α de la transducina permitiendo su liberación de las subunidades β y γ , que son las subunidades de bloqueo y anclaje en la membrana. La subunidad α de la transducina tiene actividad GTPásica y producirá un intercambio entre una molécula de GDP que se encuentre en el interior de la α -transducina, por una molécula de GTP presente en el medio. Esto provocará un cambio conformacional en ella que le permitirá interactuar con la fosfodiesterasa, una enzima que hidroliza eficientemente el GMPc a GMP. La fotoactivación de la Rh por un solo fotón provocará la activación de aproximadamente 500 moléculas de transducina dando lugar a un descenso sensible de los niveles de GMPc en el citoplasma. El GMPc es un segundo mensajero que controla los

canales catiónicos de la célula. Al bajar los niveles citoplasmáticos de los canales catiónicos de la célula se cerrarán y se producirá la hiperpolarización de la membrana plasmática que finalizará en la terminal sináptica del bastón, creándose como consecuencia el impulso nervioso responsable de la visión.⁵⁵

- **Ciclo fotoquímico de la Rodopsina**

Como hemos visto la señal visual se desencadena debido a un cambio conformacional de la Rodopsina. Pero, ¿cómo consigue la energía luminosa cambiar la estructura proteica? La base protonada de Schiff del 11-*cis* retinal desencadena cambios conformacionales en la proteína mediante una fotorreacción primaria de isomerización del cromóforo. Este proceso se conoce con el nombre de *blanqueamiento* (*bleaching*) porque durante el mismo la Rh pierde su color.⁵⁶ Por medio de la espectroscopia visible se ha podido identificar varios estados intermedios durante el proceso de blanqueamiento.^{57,58} Se define como el proceso primario al evento de la formación de la batorrodopsina (*bathorhodopsin*, BhRh). La BhRh se forma en el rango de los picosegundos y es el primer intermediario estable a temperaturas bajas (< -140°C).⁵⁸ En la BhRh el doble enlace C₁₁=C₁₂ está en conformación *trans*, lo que indica que el proceso de isomerización ya ha tenido lugar.⁵⁹ Su máximo de absorción se determinó a 535 nm, utilizando espectroscopia láser a temperatura ambiente. Puesto que la fotoisomerización se trata de un proceso ultrarrápido, el entorno proteico no tiene tiempo de adaptarse a este cambio conformacional del cromóforo y el *all-trans*-retinal está muy forzado y distorsionado.⁶⁰ A

través de diversas técnicas espectroscópicas se encontraron otras especies intermediarias precursoras de la BhRh,^{61,62,63} como, por ejemplo, la fotorrodopsina (*photorhodopsin*, PhRh) con un máximo de absorción a 570 nm y una fuerza de oscilador asociada pequeña. La PhRh no puede ser estabilizada a baja temperatura y su naturaleza, objeto de estudio en el capítulo 7, todavía causa controversia. Se ha constatado mediante espectroscopia de picosegundos con resolución en el tiempo que la PhRh decae a la BhRh.^{64,65} Se encontraba otra especie intermediaria, la hipsorrodopsina (*hypsohodopsin*) cuando se utilizaba una alta densidad de excitación en el láser en la técnica de espectroscopia de picosegundos con resolución en el tiempo y se concluyó que se trataba de un producto bifotónico de la Rh que decaía posteriormente a la BhRh, el cual no se considera como intermedio fisiológico.^{64,65} Posteriormente a la formación de la BhRh, tendrá lugar una fase más lenta de relajación que dará lugar a un nuevo intermedio en el proceso de blanqueamiento, la Luminorrodopsina, en la que la distorsión del *all-trans*-retinal existente en la BhRh se eliminará debido a la recolocación del grupo β -ionona del retinal. La Luminorrodopsina evolucionará (a través del movimiento de las hélices transmembrana y la pérdida de la interacción del Glu-113 con la base de Schiff protonada) hacia la Metarrodopsina I que a su vez está en equilibrio con la Metarrodopsina II (que es la que interactúa con la transducina), en un intervalo de tiempo de milisegundos. Finalmente, el *all-trans*-retinal se disocia de la opsina dejando la cavidad de unión libre para la unión de una nueva molécula de 11-*cis*-retinal que se regenera a partir del *all-trans*-retinal a través del conocido ciclo visual de los retinoides.

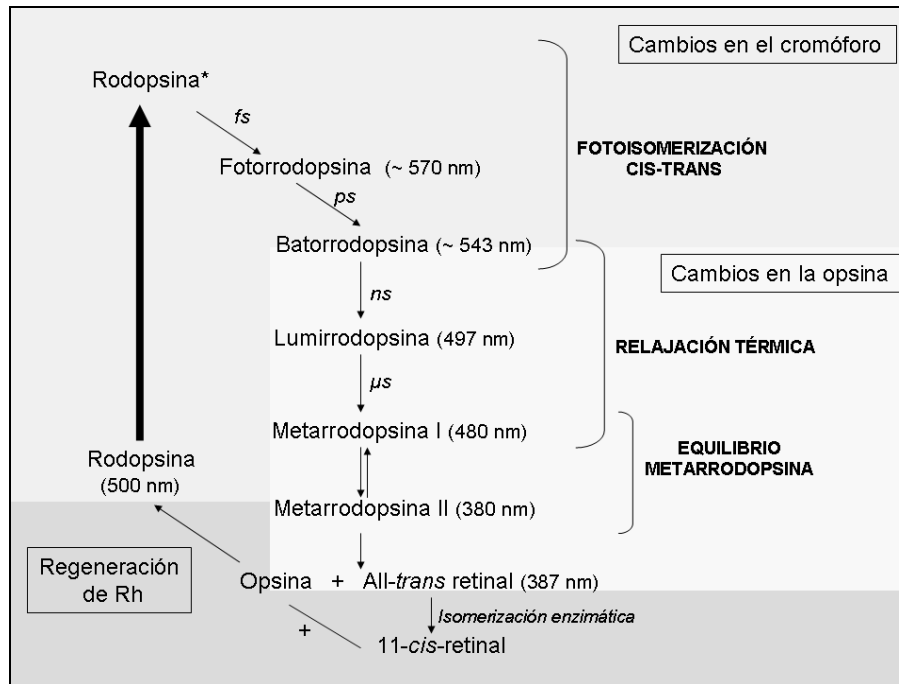


Figura 1.13. Fotociclo de la Rodopsina, conocido también como proceso de blanqueamiento de la Rodopsina. Esquema adaptado de la referencia 56.

References

"Photobiology: The Science of Light and Life"; Bjorn, L. S., Ed.; Kluwer Academic: Dordrecht, **2002**.

Serrano-Andrés, L; Merchán, M. "Vida y Luz: Una Perspectiva Químico-Cuántica". *Anales de Química*, **2004**, 100 (3), 16.

Campbell, M. K; Farrell, S. O. "Bioquímica"; Cengage Learning: Mexico DC, **2006**.

Kretschmann, H-J; Kaufman, P. L.; Alm. A. "Fisiología del Ojo", Ed 10. Elsevier Ed.:Madrid, **2003**.

¹ <http://www.rae.es>

² Thomas, B; Vince-Prue, D. "Photoperiodism in Plants", Ed 2; Academic Press: San Diego, **1997**.

³ Horton, H. R; Moran, L. A; Ochs, R. S; Rawn, J. D; Scrimgeour, K. G. "Principles of Biochemistry"; Prentice Hall: Upper Saddle River, **1996**, 435- 458.

⁴ Norris J. F; Brakel, G. V. "Light Emisión by Plants and Bacteria", Govindjee, Amesz, J; Fork, D.C., Eds.; Academia Press: Orlando, **1986**, 35-56.

⁵ Whitmarsh, J; Govindjee. "Photosynthesis". In "Encyclopedia of Applied Physics"; VCH, **1995**, Vol. 13, pp. 513-532.

⁶ Govindjee: <http://www.life.uiuc.edu/govindjee>.

⁷ Kamiya, N; Shen, J-R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, 98.

⁸ Jordan, P-; Fromme, P; Witt, H. T; Kuklas, O; Saenger, W; Krauss, N. *Nature*, **2001**, 411, 909.

⁹ <http://www.rcsb.org/pdb>

¹⁰ Cadet, J.; Vigny, P. "Bioorganic Photochemistry"; Morrison, H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, **1990**; Vol. 1, pp 1-272.

- ¹¹ Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 2495-2501.
- ¹² Mulkidjanian, A.Y.; Cherepanov, D. A.; Galperin, M. Y. *BMC Evolutionary Biology*, **2003**, *3*, 12.
- ¹³ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. J. *Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. In press (**2009**)
- ¹⁴ Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977-2019
- ¹⁵ Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B. *Nature* **2005**, *436*, 1141-1144.
- ¹⁶ Marguet, S.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5780-5781.
- ¹⁷ Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625-629.
- ¹⁸ Holman, M. R.; Ito, T.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6-7.
- ¹⁹ Boggio-Pasqua, M.; Groenhof, G.; Schäfer, L. V.; Grubmüller, H.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10996-10997.
- ²⁰ Blancafort, L.; Migani, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14540-14541.
- ²¹ Miller, W.L. *Adv Exp Med Biol.* **1979**, *118*, 153-74.
- ²² Leader B, Baca QJ, Golan DE. *Nat Rev Drug Discov.*, 2008, *7*(1), 21-39.
- ²³ Dingermann, T. *Biotechnol J.* **2008**, *3* (1), 90-7.
- ²⁴ Houdebine, L. *Methods Mol Biol.* **2007**, *360*, 163-202.
- ²⁵ Soler, E.; Thépot, D.; Rival-Gervier, S.; Jolivet, G.; Houdebine, L. M. *Reprod Nutr Dev.* **2006**, *46* (5), 579-88.
- ²⁶ Chávez, A.; Muñoz de Chávez, M. *Eur J Clin Nutr.* **2003**, *57* (1), 97-100.
- ²⁷ Vasil, I. K. *Plant Cell Rep.* **2007**, *26* (8), 1133-54.
- ²⁸ Voigt, K.; Izsvák, Z.; Ivics, Z. *J Mol Med.* **2008**, *86* (11), 1205-19.

- ²⁹ Dekker, C.; Ratner, M. A.; *Physics World*, 2001, 14, 29-33.
- ³⁰ Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature*. **1953**, 171, 737-738.
- ³¹ Levene, P. *J Biol Chem*. **1919**, 40 (2), 415-24.
- ³² Astbury, W. *Symp. SOC. Exp. Bbl* **1947**, 1(66).
- ³³ Avery, O; MacLeod, C; McCarty, M. *J Exp Med*, **1944**, 79 (2), 137-158.
- ³⁴ Franklin, R. E. *Nature*. **1953**, 171, 740-741.
- ³⁵ Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. *Nature* **1953**, 171, 738-740.
- ³⁶ Dahm, R. *Hum Genet*. **2008**, 122 (2), 565-581.
- ³⁷ Chargaff, E. *Biochim. et BioPhys. Acta*, **1952**, 9, 402.
- ³⁸ Ghosh, A.; Bansal, M. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. **2003**, 59 (4), 620-6.
- ³⁹ Wahl, M.; Sundaralingam, M. *Biopolymers* **1997**, 44 (1), 45-63.
- ⁴⁰ Lu, X. J.; Shakked, Z.; Olson, W. K. *J. Mol. Biol.* **2000**, 300 (4), 819-40.
- ⁴¹ Rothenburg, S.; Koch-Nolte, F.; Haag, F. *Immunol Rev.* **2001**, 184, 286-98.
- ⁴² Wald, G.; Brown, P. K. *Science* **1958**, 127, 222.
- ⁴³ McBee, J. K.; Palczewski, K.; Baehr, W.; Pepperberg, D. R. "Confronting Complexity: The Interlink of Phototransduction and Retinoid Metabolism in Vertebrate Retina." In *Progress in Retinal and Eye Research*; Osborn, N. N.; Chader, G. J. Eds.; Elsevier: Great Britain, **2001**; Vol. 20, pp 469.
- ⁴⁴ Purkinje, J. E. "Neure Beitrage zur Kenntniss des Sehens in Subjectiver Hinsicht. Reime" Berlin. **1825**.
- ⁴⁵ Vernon, M. D. " Experiments in Visual Perception"; Thewlis, J. ed.; Harmondsworth, **1970**.
- ⁴⁶ *Encyclopaedic Dictionary of Physics*. New York, Oxford and London, **1962**.

- ⁴⁷ Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Buss, V. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571.
- ⁴⁸ Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. *Science* **2000**, *289*, 739.
- ⁴⁹ Khorana, H. G. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1-4.
- ⁵⁰ Hofmann, K.-P.; Helmreich, E. J. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1286*, 285-322.
- ⁵¹ Sakmar, T. P. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1998**, *59*, 1-33.
- ⁵² Shichida, Y.; Imai, H. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 1299-1315.
- ⁵³ <http://www.sciencephoto.com>
- ⁵⁴ Matsumoto, H.; Yoshizawa, T. *Nature.* **1975**, *258*, 523-526.
- ⁵⁵ Crouch, R. K.; Gorson, D. W. "Rhodopsin and Bacteriorhodopsin: Use of Retinal Analogues as Probes of Structure and Function". In "CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology"; Horspool, W.; Song, P-S. Ed.; **1995**, pp 1516-20.
- ⁵⁶ Kandori, H.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. *Biochemistry-Moscow* **2001**, *66*, 1197.
- ⁵⁷ Shichida, Y. *Photobiochem. Photobiophys.* **1986**, *13*, 287-307.
- ⁵⁸ Yoshizawa, T.; Shichida, Y. *Meth. Enzymol.* **1982**, *81*, 333-354.
- ⁵⁹ Yoshizawa, T.; Kandori, H. In "Progress in Retinal Research"; Osborne, N.; Chader, G. eds; Pergamon Press: Oxford, **1992**, pp. 33-55.
- ⁶⁰ Yoshizawa, T.; Wald, G. *Nature*, **1963**, *197*, 1279-1286.
- ⁶¹ Yoshizawa, T. In "Handbook of Sensory Physiology"; Dartnall, H. J. A. ed.; Springer-Verlag: Berlin, **1972**, pp. 69-81.
- ⁶² Shichida, Y.; Kobayashi, T.; Ohtani, H.; Yoshizawa, T.; Nagakura, S. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *27*, 335-341.
- ⁶³ Shichida, Y.; Matuoka, S.; Yoshizawa, T. *Photobiochem. Photobiophys.*, **1984**, *7*, 221-228.

⁶⁴ Kandori, H., Matuoka, S., Shichida, Y., and Yoshizawa, T. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 181-184.

⁶⁵ Matuoka, S.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 765, 38-42.



*"Lo importante es no dejar
de hacerse preguntas"*

Albert Einstein

2. OBJETIVOS

2

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es ayudar a una mejor comprensión del mecanismo por el cual tienen lugar ciertos procesos biológicos fotoinducidos de la Naturaleza. Para ello se estudian, desde el punto de vista de la química teórica, aspectos relevantes en tres ejemplos paradigmáticos de este tipo de eventos como son: la fotosíntesis, el proceso de la visión y el comportamiento de las nucleobases del material genético frente a la radiación UV.

En particular, se emplea una metodología químico-cuántica de alta precisión, la CASSCF/CASPT2, que ha demostrado ser una potente herramienta en el estudio de los estados excitados moleculares, estados que van a estar involucrados en todo proceso fotoinducido.

En función del fenómeno concreto estudiado, el trabajo realizado se puede clasificar en tres categorías con los siguientes objetivos específicos:

- **Estudio de la formación de excímeros en las nucleobases del DNA y del papel que los mismos desempeñan en la fotoquímica y fotofísica de los ácidos nucleicos.** A través de los trabajos que engloba este título se pretende dar un apoyo teórico a la formación de excímeros en las nucleobases del DNA. Específicamente se estudian los excímeros (de tipo homodímero) de una base pirimidínica, la citosina (C), y de una base purínica, la adenina (A). De esta última además se evalúa el papel del excímero en su

fotofísica y fotoquímica. También se determina el mecanismo de formación de la lesión de tipo Pyr<>Pyr en el DNA, en este caso de los dímeros de ciclobutano citosina (*Cyclobutane cytosine Dimers, CBC*), a través del excímero de citosina con multiplicidad triplete. Otro objetivo de estas investigaciones es la determinación de la importancia del error de superposición de base en el cálculo preciso de este tipo de sistemas.

- **Estudio del mecanismo de transferencia de carga y/o energía en procesos que han sido fotoinducidos.** En primer lugar se estudia el mecanismo por el cual se produce la transferencia de carga entre el anión de la Feofitina *a* y la Plastoquinona en el Fotosistema II durante el proceso fotosintético en las plantas verdes, haciendo especial hincapié en el papel que la orientación relativa entre aceptor y dador tiene en la eficacia de la transferencia. La importancia de la orientación relativa entre una molécula dadora y una aceptora, en este caso de energía, se determina en otro trabajo, mediante la transferencia de energía de excitación triplete-triplete en modelos moleculares de pequeño tamaño como el Etileno-Etileno, Et-Et, el Etileno-Catión Metaniminio, Et-CH₂NH₂, y el Etileno-O₂, Et-O₂. A partir de las conclusiones obtenidas de este análisis, se propone un método de evaluación del acoplamiento entre estados electrónicos. Es de señalar también que la elaboración de dicho esquema permitió

abordar seguidamente el mecanismo de transferencia de carga entre pares de nucleobases del DNA, lo cual constituye una de las contribuciones más recientes del grupo de investigación.

- **Estudio de aspectos relacionados con el proceso de fotoisomerización del cromóforo de la Rodopsina.** Este trabajo se realiza en colaboración con el grupo de investigación del Profesor Marco Garavelli del *Dipartimento di Chimica della Università degli Studi di Bologna*. El objetivo es evaluar el papel que el efecto electrostático de los distintos residuos del entorno proteico de la opsina ejerce en la eficiencia del proceso de fotoisomerización, así como en la modificación de la longitud de onda de absorción de la base de Schiff protonada del 11-*cis*-retinal.



" Probablemente sea cierto que "nadie entiende la Mecánica Cuántica", aunque es igualmente cierto que de alguna maravillosa manera la Mecánica Cuántica entiende al Universo. "

Eugene Hecht

3. METODOLOGÍA QUÍMICO-CUÁNTICA

3 METODOLOGÍA QUÍMICO-CUÁNTICA

3.1. INTRODUCCIÓN

A principios del siglo XX la Física descubrió una limitación en la mecánica clásica, que había sido fielmente aplicada desde su descubrimiento por parte de Isaac Newton en el siglo XVII hasta ese momento: la mecánica clásica no describía correctamente el comportamiento de partículas de tamaño muy pequeño, tales como el electrón y los núcleos de átomos y moléculas. Estos, sin embargo, sí seguían una serie de leyes conocidas dentro del marco de la mecánica cuántica. La aplicación de la mecánica cuántica al campo de la química constituiría lo que se conoce como Química Cuántica.

- El nacimiento de la Cuántica

Se puede decir que el desarrollo de la mecánica cuántica comenzó en el año 1900 gracias al estudio realizado por Planck sobre la luz emitida por sólidos calientes.^{1,2} ¿En qué contexto científico tuvo lugar este nacimiento? Por aquel entonces habían pasado 100 años desde que Thomas Young, en 1801, diera pruebas experimentales de la naturaleza ondulatoria de la luz, gracias a la observación de los efectos de difracción y de interferencia que se producían cuando la luz se hacía pasar a través de dos pequeños orificios adyacentes.^{3,4} James Clerk

Maxwell había formulado en 1860 cuatro ecuaciones, conocidas desde entonces como las ecuaciones de Maxwell que unificaron las leyes de la electricidad y del magnetismo.^{5,6} Según estas leyes una carga eléctrica acelerada debe irradiar energía en forma de una onda electromagnética (es decir ondas formadas por campos magnéticos y eléctricos oscilantes). Puesto que la velocidad predicha por las ecuaciones de Maxwell para esta onda resultó ser la misma que la medida experimentalmente para la luz, éste predijo que la luz se trataba de una onda electromagnética. Esta teoría se vio reforzada por los experimentos de Hertz,^{7,8,9,10,11,12} según los cuales, cuando una carga era acelerada producía unas ondas de radio detectables, tal y como predecían las ecuaciones de Maxwell.

Por tanto la física clásica estaba gobernada por dos conceptos fundamentales. Por una parte por el concepto de partícula como una entidad discreta con una posición y un momento definidos y cuyo movimiento sigue las leyes de Newton en todo momento y, por otra parte, por el concepto de onda electromagnética, una entidad física con presencia en cada punto del espacio provista de un campo eléctrico y uno magnético que cambian de acuerdo con las leyes de Maxwell. La concepción del mundo clásico era clara y sencilla: las leyes del movimiento se aplicaban al mundo material que nos rodea y las leyes del electromagnetismo para las ondas de luz que iluminan ese mundo. Pero este esquema comenzó a tambalearse cuando Max Planck publicó su teoría de la radiación del cuerpo negro. Cuando a finales del siglo XIX se midió experimentalmente la intensidad de la luz irradiada por un cuerpo negro a temperatura constante en función de la frecuencia, se descubrió que utilizando la teoría ondulatoria y la mecánica estadística no se predecían correctamente los resultados del tramo correspondiente

a la región de altas frecuencias. Fue Planck quien desarrolló una teoría capaz de explicar las curvas de radiación. Supuso que los átomos del cuerpo negro podían emitir energía en forma de luz, pero solamente en cantidades dadas por $h\nu$ donde ν es la frecuencia de la radiación y h una constante, conocida desde entonces como constante de Planck, y que tiene un valor de $6.6260693(11) \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$.^{*} Con esta teoría fue capaz de construir unas curvas teóricas que reproducían de forma precisa las curvas experimentales del cuerpo negro. La emisión estaba cuantizada. La cuantización de la energía se utilizó por segunda vez para explicar el efecto fotoeléctrico. En el efecto fotoeléctrico la luz que incide sobre un metal produce la emisión de electrones. Experimentalmente se observó que la energía cinética del electrón emitido era independiente de la intensidad de la luz y aumentaba con su frecuencia. En 1905 Einstein explicó estas observaciones experimentales suponiendo que la luz estaba compuesta por ciertas entidades corpusculares (llamadas fotones),^{13,14} cada uno de ellos con una energía dada por:

$$E_{\text{fotón}} = h\nu \quad (3.1)$$

El efecto fotoeléctrico muestra que la luz puede tener un comportamiento corpuscular, además del comportamiento ondulatorio que manifiesta en los experimentos de difracción.

^{*} Valor tomado de: Mohr P. J.; Taylor, B. N. *Rev. Mod. Phys.* **2005**, *77*, 1.

- La estructura de la materia

Las investigaciones llevadas a cabo en tubos de descarga y sobre la radioactividad natural a finales del siglo XIX mostraron que los átomos y las moléculas están formados por partículas cargadas. Los electrones tienen carga negativa. El protón tiene una carga positiva igual en magnitud a la del electrón pero de signo opuesto y es 1836 veces más pesado que éste. El tercer constituyente del átomo, el neutrón (descubierto en 1932)^{15,16} no tiene carga y es ligeramente más pesado que el protón. A principios de 1909, Rutherford, Geiger y Marsden hicieron pasar repetidamente un haz de partículas alfa (núcleos de helio, cargados positivamente) a través de láminas metálicas delgadas y observaron las desviaciones que se producían al hacerlas incidir sobre una pantalla fluorescente. La mayoría de las partículas alfa atravesaban las láminas metálicas prácticamente sin desviarse pero, sorprendentemente, unas pocas sufrían una gran desviación e incluso algunas rebotaban hacia atrás.^{17,18} Para que se produzcan desviaciones grandes es necesario que las cargas se aproximen mucho, de forma que la fuerza repulsiva colombiana sea grande. Si la carga positiva estuviese dispersa en el interior del átomo (como J.J. Thomson había propuesto en 1904)¹⁹, al penetrar en el mismo una partícula alfa de alta energía, la fuerza repulsiva disminuiría hasta anularse en el centro del átomo de acuerdo con la teoría electrostática clásica. Por tanto, Rutherford concluyó que las grandes desviaciones observadas sólo podían ocurrir si la carga positiva estaba concentrada en un núcleo pesado y diminuto. Un átomo está formado por un pequeño núcleo pesado (de 10^{-15} a 10^{-14} m de radio) compuesto de neutrones y de Z protones, donde Z es el

número atómico. Fuera del núcleo hay Z electrones. Las partículas cargadas interactúan de acuerdo con la ley de Coulomb y los nucleones se mantienen unidos al interior del núcleo mediante intensas fuerzas nucleares de corto alcance. El radio de un átomo es aproximadamente de un ángstrom (\AA) como muestran, por ejemplo, los resultados obtenidos a partir de la teoría cinética de gases. Las moléculas, formadas por definición, por varios átomos, tienen más de un núcleo. Las propiedades químicas de los átomos y moléculas están determinadas por sus estructuras electrónicas, de manera que es necesario plantearse cuál es la naturaleza del movimiento y energía de los electrones.

El modelo planetario del átomo de Rutherford (1911), en el que los electrones dan vueltas alrededor del núcleo, presenta una dificultad fundamental: de acuerdo con la teoría del electromagnetismo clásico, una partícula cargada acelerada irradia energía en forma de ondas electromagnéticas (luz). Un electrón que gira alrededor del núcleo a una velocidad constante sufre una aceleración, ya que la dirección de su vector velocidad cambia continuamente. Por tanto los electrones en el modelo de Rutherford deberían perder continuamente energía en forma de radiación y caer en espiral hacia el núcleo colapsando. Fue Niels Bohr quien propuso en 1913 una forma de superar esta dificultad aplicando el concepto de cuantización de la energía al átomo de hidrógeno.²⁰ Bohr supuso que la energía del electrón en el átomo de hidrógeno estaba cuantizada, de manera que el electrón sólo podía moverse en alguna órbita de las comprendidas dentro de un cierto número de órbitas permitidas. Cuando el electrón efectúa una transición desde una órbita de Bohr a otra, se absorbe o se emite un fotón de luz cuya frecuencia ν satisface la relación:

$$E_{\text{superior}} - E_{\text{inferior}} = h\Delta\nu \quad (3.2)$$

donde E_{superior} y E_{inferior} son las energías de los estados superior e inferior. Bohr utilizó la mecánica clásica para deducir una fórmula de los niveles de energía del átomo de hidrógeno, y esta fue básicamente la dificultad que le hizo fracasar en la descripción del espectro del helio y en la explicación del enlace químico. Los espectros atómicos, con sus frecuencias discretas, ponen de manifiesto que efectivamente sólo están permitidas ciertas energías para el movimiento electrónico, es decir, que la energía electrónica está cuantizada. Sin embargo, en la mecánica clásica la energía varía de forma continua. La cuantización tiene lugar en el movimiento ondulatorio, como es el caso, por ejemplo, de la frecuencia fundamental y los sobretonos de una cuerda de violín.

- La dualidad onda-corpúsculo

Louis de Broglie sugirió en 1923 que el movimiento de los electrones debía tener una componente ondulatoria, esto es, que un electrón de masa m y velocidad v tendría una longitud de onda asociada al mismo:

$$\lambda = \frac{h}{mv} = \frac{h}{p} \quad (3.3)$$

De Broglie llegó a esta ecuación (donde p es el momento lineal) mediante un razonamiento análogo al realizado para los fotones.^{21,22} La energía de cualquier partícula (incluyendo el fotón) puede expresarse, de acuerdo con la teoría de la relatividad especial de Einstein,²³ como:

$$E = mc^2 \quad (3.4)$$

donde c es la velocidad de la luz y m la masa relativista de la partícula (no su masa en reposo). Usando la ecuación (3.1) obtenemos que $mc^2 = hv = \frac{hc}{\lambda}$ y $\lambda = \frac{h}{mc} = \frac{h}{p}$, que es exactamente la ecuación (3.3) aplicada al fotón en vez de al electrón. La hipótesis de De Broglie fue confirmada experimentalmente por Davisson y Germer²⁴ en 1927 y, posteriormente, Stern constató definitivamente que los efectos ondulatorios no son una peculiaridad de los electrones, sino la consecuencia de alguna ley general del movimiento de las partículas microscópicas.²⁵ Por tanto existe una aparente “dualidad onda-corpúsculo” en el comportamiento de partículas microscópicas como el electrón. En realidad no se trata ni de una partícula ni de una onda electromagnética, sino de algo distinto imposible de describir gráficamente usando los conceptos de la física clásica a los que está acostumbrada nuestra mente. Los fotones y los electrones son ejemplo de entidades que muestran claramente esta dualidad, pero son muy diferentes. Mientras que los fotones se mueven siempre a una velocidad c y su masa en reposo es nula (por lo que deben ser tratados siempre de forma relativista), los electrones siempre tienen $v < c$ y una masa en reposo no nula.

La dualidad onda-partícula de las partículas microscópicas impone un límite a nuestra capacidad de medir simultáneamente la posición y el momento de las mismas. El acto mismo de medir introduce una perturbación en el sistema sobre el que se realiza la medida. La medida cambia el estado del sistema. Este principio, conocido como El Principio de Indeterminación,²⁶ fue descubierto por Werner Heisenberg en 1927.

- La ecuación de Schrödinger

Para el tratamiento de partículas microscópicas hemos visto que la mecánica clásica falla estrepitosamente. En los albores de 1926 surgió la denominada la mecánica cuántica y su ecuación básica fue introducida por Edwin Schrödinger: ^{27,28, 29, 30, 31,32}

$$i\hbar \frac{\partial \psi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = -\frac{\hbar^2}{2m} \Delta \psi(\mathbf{r}, t) + V(\mathbf{r}) \cdot \psi(\mathbf{r}, t) \quad (3.5)$$

En esta ecuación, conocida como ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo (o ecuación de onda de Schrödinger), $i = \sqrt{-1}$, m representa la masa de la partícula, y $V(\mathbf{r})$ es la función de energía potencial del sistema. Las soluciones de esta ecuación son las funciones de onda que describen el “comportamiento” de las partículas microscópicas.

La ecuación de Schrödinger es un postulado de la teoría, y aunque no hay prueba matemática para este postulado, numerosos experimentos han confirmado que la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo ofrece una descripción correcta para todos los fenómenos observados no relativistas. Se trata de una ecuación maestra de la mecánica cuántica no relativista y todos los fenómenos en este campo pueden ser, al menos numéricamente, calculados por la ecuación (3.5).

Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones estáticas de la mecánica cuántica a la química no es necesario utilizar esta ecuación, sino la más sencilla ecuación de Schrödinger independiente del tiempo que de forma general se puede escribir así:

$$-\frac{\hbar^2}{2m}\Delta\psi + E_{pot}\psi = E\psi \quad (3.6)$$

La formulación de Schrödinger (denominada mecánica ondulatoria) es equivalente a la formulación de Heisenberg (denominada mecánica matricial).^{33,34} En 1926, Dirac y Jordan, trabajando de forma independiente, formularon una versión abstracta de la mecánica cuántica llamada teoría de la transformación,^{35,36} que es una generalización y engloba tanto la mecánicas matricial, como la ondulatoria. Posteriormente, en 1948 Feynman ideó la formulación de la electrodinámica cuántica, la primera teoría completa de la interacción entre fotones y electrones.³⁷

3.2. MÉTODOS QUÍMICO CUÁNTICOS

3.2.1. Resolviendo la ecuación de Schrödinger aplicada a sistemas químicos

La ecuación de Schrödinger no relativista e independiente del tiempo (3.6) se puede escribir de forma muy simplificada utilizando la notación matricial bra-ket:

$$\mathcal{H}|\Phi\rangle = \mathcal{E}|\Phi\rangle \quad (3.7)$$

En el entorno químico \mathcal{H} es el operador Hamiltoniano para un sistema compuesto por núcleo y electrones descritos por los vectores \mathbf{R}_A y \mathbf{r}_i , respectivamente (ver Figura 3.1).

En unidades atómicas el Hamiltoniano para N electrones y M núcleos es:

$$\mathcal{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.8)$$

Siendo M_A la masa del núcleo A, Z_A el número atómico del núcleo A y las Laplacianas ∇_i^2 y ∇_A^2 involucran la diferenciación respecto a las coordenadas del electrón i y del núcleo A, respectivamente.

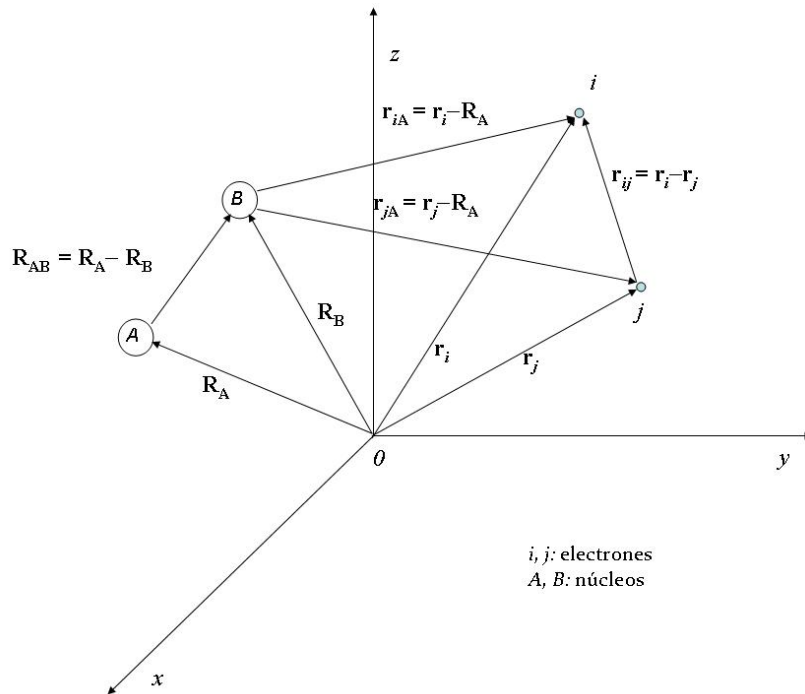


Figura 3.1. Sistema de coordenadas moleculares.

El primer término de la ecuación (3.8), es el operador para la energía cinética de los electrones (T_E); el segundo término, es el operador para la energía cinética de los núcleos (T_N); el tercer término, representa la atracción coulombiana entre los electrones y los núcleos (V_{EN}); y los cuarto, y quinto términos (V_{EE} , y V_{NN}) representan la repulsión entre los electrones y los núcleos respectivamente. Por tanto la ecuación (3.8) puede ser escrita como:

$$\mathcal{H} = T_E + T_N + V_{EE} + V_{EN} + V_{NN} \quad (3.9)$$

- La aproximación de Born-Oppenheimer

Puesto que los núcleos son mucho más pesados que los electrones, se mueven también mucho más lentamente que estos. Por tanto, como una buena aproximación se puede considerar que en una molécula los electrones se mueven en el campo de los núcleos fijos.³⁸ Utilizando esta aproximación, el segundo término de la ecuación (3.8), que corresponde a la energía cinética de los núcleos, puede ser considerado despreciable y el último término, la repulsión entre los núcleos, constante. Cualquier constante añadida a un operador sólo se añade al valor propio del operador y no tiene efecto en sus funciones propias. Los términos que quedan de la ecuación (3.8) constituyen el Hamiltoniano electrónico, que describe el movimiento de N electrones en el campo de M cargas puntuales:

$$\mathcal{H}_{elec} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.10)$$

La solución de la ecuación de Schrödinger que involucra al Hamiltoniano electrónico:

$$\mathcal{H}_{elec} \Phi_{elec} = \mathcal{E}_{elec} \Phi_{elec} \quad (3.11)$$

es la función de onda electrónica:

$$\Phi_{elec} = \Phi_{elec}(\{r_i\}; \{R_A\}) \quad (3.12)$$

la cual describe el movimiento de los electrones y explícitamente depende de las coordenadas electrónicas, pero paramétricamente de las coordenadas nucleares, puesto que la energía es función de ellas:

$$\mathcal{E}_{elec} = \mathcal{E}_{elec}(\{R_A\}) \quad (3.13)$$

Que dependa paramétricamente de las coordenadas nucleares implica que para cada posición de los núcleos la Φ_{elec} será una función diferente de coordenadas electrónicas. Además la energía total incluirá la constante de repulsión nuclear.

$$\mathcal{E}_{tot} = \mathcal{E}_{elec} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.14)$$

Una vez solucionado el problema electrónico es posible resolver el movimiento de los núcleos utilizando la misma suposición que realizamos al formular el problema electrónico. Como los electrones se mueven mucho más rápidamente que los núcleos, una aproximación razonable en (3.8) sería reemplazar las coordenadas electrónicas por sus valores promediados sobre la función de onda. Esto generará un Hamiltoniano nuclear para el movimiento de los núcleos en el campo promedio generado por los electrones.

$$\begin{aligned}
 \mathcal{H}_{nucl} &= -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \left\langle -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{r_{ij}} \right\rangle + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \\
 &= -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \mathcal{E}_{elec}(\{R_A\}) + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} = -\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + \mathcal{E}_{tot}(\{R_A\})
 \end{aligned}
 \tag{3.15}$$

La energía total $\mathcal{E}_{tot}(\{R_A\})$ proporciona un potencial para el movimiento de los núcleos. Esta función constituye, en general, una superficie de energía potencial como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.2. Por tanto, los núcleos en esta aproximación denominada de Born-Oppenheimer, se mueven en una superficie de energía potencial obtenida resolviendo el problema electrónico. La solución de la ecuación de Schrödinger nuclear:

$$\mathcal{H}_{nucl} \Phi_{nucl} = \mathcal{E}_{nucl} \Phi_{nucl} \tag{3.16}$$

$$\Phi_{nucl} = \Phi_{nucl}(\{R_A\}) \tag{3.17}$$

describe la vibración, traslación y rotación de la molécula y, por tanto, \mathcal{E}_{nucl} representa la energía total dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual incluye la energía rotacional, vibracional y traslacional.

La correspondiente aproximación a la función de onda total (3.7) resultó ser:

$$\Phi(\{r_i\}; \{R_A\}) = \Phi_{elec}(\{r_i\}; \{R_A\}) \Phi_{nucl}(\{R_A\}) \tag{3.18}$$

A partir de ahora, puesto que sólo vamos a tratar problemas en los que resolveremos el Hamiltoniano electrónico, no obviaremos el subíndice "elec".

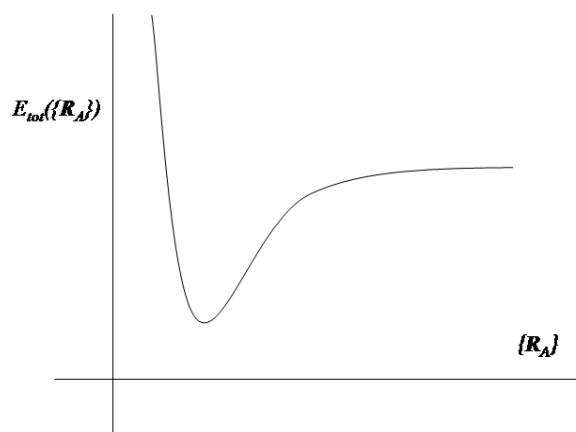


Figura 3.2. Ilustración esquemática de una superficie de energía potencial.

- **El principio de antisimetría o principio de exclusión de Pauli**

El Hamiltoniano electrónico de la ecuación (3.10) depende sólo de las coordenadas espaciales de los electrones. Sin embargo, para describir completamente al electrón es necesario especificar su espín. En el contexto de nuestra teoría no relativista incluimos el espín de forma fenomenológica, incluyendo dos funciones de espín $\alpha(\omega)$ y $\beta(\omega)$ que corresponden a dos casos de espín diferentes que suelen representarse como un espín “hacia arriba” (\uparrow) y “hacia abajo” (\downarrow), respectivamente. Éstas son funciones de una variable de espín genérica ω . Desde un punto de vista operativo sólo es necesario especificar que las dos funciones de espín son completas y ortonormales entre sí.

$$\langle \alpha | \alpha \rangle = \langle \beta | \beta \rangle = 1 \quad (3.19)$$

$$\langle \alpha | \beta \rangle = \langle \beta | \alpha \rangle = 0 \quad (3.20)$$

Según este formalismo el electrón es descrito no sólo por las tres coordenadas espaciales \mathbf{r} , sino también por una coordenada de espín ω . Denominaremos estas cuatro coordenadas colectivamente como \mathbf{x} .

$$\mathbf{x} = \{\mathbf{r}, \omega\} \quad (3.21)$$

La función de onda para un sistema de N electrones será por tanto función de $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N$, es decir $\Phi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)$.

Sin embargo, conviene recordar que el Hamiltoniano no hace referencia al espín y por tanto el hacer simplemente que la función de onda dependa de éste no conduciría a ninguna parte. Aún debemos hacerle un requerimiento adicional a la función de onda: una función de onda polielectrónica debe ser antisimétrica respecto al intercambio de las coordenadas \mathbf{x} de dos electrones:

$$\Phi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_N) = -\Phi(\mathbf{x}_1, \dots, \mathbf{x}_j, \dots, \mathbf{x}_i, \dots, \mathbf{x}_N) \quad (3.22)$$

Este requerimiento, llamado algunas veces principio de antisimetría es una aplicación general del bien conocido principio de exclusión de Pauli, invocado en la teoría de orbitales moleculares. Por tanto, la función de onda exacta no debe sólo satisfacer la ecuación de Schrödinger, sino que además debe ser antisimétrica.

Llegados a este punto es conveniente definir el concepto de orbital. Un orbital es una función monoeléctronica. Un orbital molecular será por tanto una función monoeléctronica describiendo a un electrón en una molécula. El término orbital espacial hace referencia a una función del vector de posición \mathbf{r} , $\psi_i(\mathbf{r})$, que describe la distribución

espacial del electrón de forma que $|\psi_i(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r}$ es la probabilidad de encontrar al electrón en un pequeño elemento de volumen $d\mathbf{r}$ alrededor de \mathbf{r} . Sin perder generalidad, los orbitales moleculares se pueden elegir de forma que constituyen un conjunto ortonormal:

$$\langle \psi_i | \psi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (3.23)$$

Si el conjunto de base fuera completo, entonces cualquier función arbitraria $f(\mathbf{r})$ podría ser exactamente expandida como:

$$f(\mathbf{r}) = \sum_{i=1}^{\infty} a_i \psi_i(\mathbf{r}) \quad (3.24)$$

donde a_i representan los coeficientes de la expansión. En general, el conjunto debería ser infinito para ser completo, sin embargo en la práctica nunca tendremos disponible un conjunto completo, sino sólo un conjunto finito $\{\psi_i | i = 1, 2, \dots, K\}$ de K orbitales.

Como se ha mencionado, para describir completamente un electrón es necesario especificar su espín. Un conjunto completo para describir el espín de un electrón consistirá precisamente de las dos funciones ortonormales $\alpha(\omega)$ y $\beta(\omega)$. La función de onda para el electrón que describe ambos, su distribución espacial y su espín se denomina un espín-orbital, el cual denotaremos $\chi(\mathbf{x})$. Para cada orbital espacial $\psi(\mathbf{r})$ se pueden formar dos espín-orbitales multiplicando el orbital espacial por las funciones de espín α o β , respectivamente.

$$\chi(\mathbf{x}) = \begin{cases} \psi(\mathbf{r})\alpha(\omega) \\ o \\ \psi(\mathbf{r})\beta(\omega) \end{cases} \quad (3.25)$$

Dado un conjunto K de funciones espaciales $\{\psi_i | i=1,2,\dots,K\}$ se puede, por tanto, formar un conjunto de $2K$ espín-orbitales. Si los orbitales espaciales son ortonormales también lo serán los espín-orbitales.

$$\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij} \quad (3.26)$$

- **Productos de Hartree**

Hemos visto que la función de onda apropiada para describir un único electrón es un espín-orbital, pero cuando existe un conjunto de electrones ¿Cómo se describe la función de onda polielectrónica? Antes de considerar la forma de la función de onda exacta, recordemos que para un sistema simple que contiene electrones no interactuantes, despreciando la repulsión interelectrónica, su Hamiltoniano tiene la siguiente forma:

$$\mathcal{H} = \sum_{i=1}^N h(i) \quad (3.27)$$

donde $h(i)$ es el operador que describe las energías cinéticas y potenciales de un electrón i , es decir, $h(i)$ es un Hamiltoniano monoeléctrico (que puede incluir o no los efectos de la repulsión electrón-electrón de forma promedio).

Se puede escoger un conjunto de espín-orbitales $\{\chi_j\}$ como conjunto de funciones propias de $h(i)$:

$$h(i)\chi_j(\mathbf{x}_i) = \varepsilon_j\chi_j(\mathbf{x}_i) \quad (3.28)$$

Puesto que \mathcal{H} es una suma de Hamiltonianos monoeléctricos, la función de onda propia será una función de onda polieletrónica compuesta por el producto simple de los espín-orbitales de cada electrón:

$$\Psi^{HP}(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2)\cdots\chi_k(\mathbf{x}_N) \quad (3.29)$$

Ψ^{HP} es una función propia de \mathcal{H} ,

$$\mathcal{H}\Psi^{HP} = \mathcal{E}\Psi^{HP} \quad (3.30)$$

cuyo valor propio, \mathcal{E} , viene dado fundamentalmente por la suma de las energías de los espín-orbitales con la que se ha construido Ψ^{HP}

$$\mathcal{E} = \varepsilon_i + \varepsilon_j + \dots\varepsilon_k \quad (3.31)$$

Esta función de onda polieletrónica donde los electrones se comportan como partículas independientes y en la que cada electrón es descrito por un espín-orbital se denomina Producto Hartree. El producto Hartree es no correlacionado, lo que significa que la probabilidad de encontrar simultáneamente un electrón “uno” en un elemento de volumen $d\mathbf{x}_1$ centrado en \mathbf{x}_1 , un electrón “dos” en un elemento de volumen $d\mathbf{x}_2$ centrado en \mathbf{x}_2 , etc... será igual al producto de las probabilidades individuales de que el electrón “uno” se encuentre en $d\mathbf{x}_1$, por la de que el electrón “dos” se encuentre en $d\mathbf{x}_2$, etc...

$$\left| \Psi^{HP}(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) \right|^2 d\mathbf{x}_1 \cdots d\mathbf{x}_N = \left| \chi_i(\mathbf{x}_1) \right|^2 d\mathbf{x}_1 \left| \chi_j(\mathbf{x}_2) \right|^2 d\mathbf{x}_2 \cdots \left| \chi_k(\mathbf{x}_N) \right|^2 d\mathbf{x}_N \quad (3.32)$$

Por tanto, la probabilidad de encontrar un electrón en un punto dado del espacio es independiente de la posición de un segundo electrón si se utiliza el Producto Hartree como función de onda polieletrónica. Sin embargo, en la realidad el electrón “uno” se sentirá inmediatamente

repelido por la presencia del electrón “dos” debido a la interacción coulombiana entre ambos. El movimiento de los electrones sí está correlacionado y así lo debe tener en cuenta la función de onda del sistema polieletrónico. El Producto Hartree presenta dos deficiencias importantísimas: no satisface el principio de antisimetría y no incluye ningún tipo de correlación electrónica.

- **Determinantes de Slater**

A partir de un Producto Hartree es fácil obtener funciones de onda correctamente antisimetrizadas. Considérese el caso de una molécula con sólo dos electrones, de modo que el electrón “uno” ocupa el espín-orbital χ_i y el electrón “dos” el χ_j . El Producto Hartree que describiría el sistema sería el siguiente:

$$\Psi_{1,2}^{HP}(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2) \quad (3.33)$$

Si en vez de situar el electrón “uno” en χ_i se hiciese en χ_j y el electrón “dos” en χ_i , tendríamos:

$$\Psi_{1,2}^{HP}(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \chi_i(\mathbf{x}_2)\chi_j(\mathbf{x}_1) \quad (3.34)$$

En cada uno de esos productos Hartree se está distinguiendo entre los electrones. Sin embargo, se puede construir una función de onda que no lo haga y que satisfaga el principio de antisimetría utilizando una combinación lineal de ambos Productos Hartree.

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \frac{1}{\sqrt{2}}(\chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2) - \chi_j(\mathbf{x}_1)\chi_i(\mathbf{x}_2)) \quad (3.35)$$

El factor $2^{-1/2}$ es un factor de normalización. El signo menos asegura la antisimetría con respecto al intercambio de las coordenadas de los electrones “uno” y “dos”, pues:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = -\Psi(\mathbf{x}_2, \mathbf{x}_1) \quad (3.36)$$

La función dejaría de existir si ambos electrones ocuparan el mismo espín-orbital. Por tanto, el requerimiento de la antisimetría conduce al usual enunciado del Principio de Pauli que dice que no más de un electrón puede ocupar un espín-orbital.

La función de onda antisimétrica puede ser re-escrita como un determinante:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{vmatrix} \chi_i(\mathbf{x}_1) & \chi_j(\mathbf{x}_1) \\ \chi_i(\mathbf{x}_2) & \chi_j(\mathbf{x}_2) \end{vmatrix} \quad (3.37)$$

y es llamado determinante de Slater. Para un sistema de N-electrones se puede generalizar la ecuación (3.37) de la forma siguiente:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_i(\mathbf{x}_1) & \chi_j(\mathbf{x}_1) & \cdots & \chi_k(\mathbf{x}_1) \\ \chi_i(\mathbf{x}_2) & \chi_j(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_k(\mathbf{x}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(\mathbf{x}_N) & \chi_j(\mathbf{x}_N) & \cdots & \chi_k(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (3.38)$$

Este determinante de Slater tiene N electrones ocupando N espín-orbitales ($\chi_i, \chi_j, \dots, \chi_k$) sin especificar qué electrón está en cada orbital. Intercambiar las coordenadas de dos electrones equivale a intercambiar dos filas, lo cual cambia el signo del determinante, cumpliéndose el principio de antisimetría. Si dos electrones ocuparan el mismo espín-orbital dos columnas del determinante serían iguales y el determinante tendría un valor de 0. En la práctica se utiliza la notación

abreviada más para los determinantes de Slater normalizados, mostrando simplemente los elementos de la diagonal:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = |\chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2)\cdots\chi_k(\mathbf{x}_N)\rangle \quad (3.39)$$

Utilizando esta función de onda polielectrónica, la probabilidad de encontrar dos electrones con espines paralelos en un mismo punto del espacio es cero. Se dice que existe un “hueco de Fermi” alrededor del electrón. Sin embargo, aunque con los determinantes de Slater el movimiento de los electrones con espines paralelos está correlacionado, no lo está el de electrones con espines opuestos y la probabilidad de encontrar dos electrones con espines opuestos en una misma región del espacio es no nula. Por tanto, se considera que los determinantes de Slater son funciones de onda no correlacionadas, ya que describen correctamente el “hueco de Fermi” pero no el “hueco de Coulomb”.

3.2.2. El método Hartree-Fock

La función de onda antisimétrica más simple que puede ser utilizada para describir el estado fundamental de un sistema de N electrones es un único determinante de Slater:

$$|\Psi_0\rangle = |\chi_i(\mathbf{x}_1)\chi_j(\mathbf{x}_2)\cdots\chi_k(\mathbf{x}_N)\rangle \quad (3.40)$$

El principio variacional establece que la mejor función de onda de esta forma es aquella que da la energía más baja posible:

$$E_0 = \langle \Psi_0 | \mathcal{H} | \Psi_0 \rangle \quad (3.41)$$

La flexibilidad variacional en la función de onda (3.40) está en la elección de los espín-orbitales. A través de la minimización de E_0 respecto a los espín-orbitales elegidos se puede derivar la llamada

ecuación de Hartree-Fock,^{39,40} la cual determinará los espín-orbitales óptimos. La ecuación de Hartree-Fock es una ecuación de valores propios de la forma:

$$f(i)\chi(\mathbf{x}_i) = \varepsilon\chi(\mathbf{x}_i) \quad (3.42)$$

donde $f(i)$ es un operador electrónico efectivo llamado operador de Fock:

$$f(i) = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + v^{HF}(i) \quad (3.43)$$

donde $v^{HF}(i)$ es el potencial promedio experimentado por electrón genérico i debido a la presencia de los otros electrones. La esencia de la aproximación Hartree-Fock es reemplazar un complicado problema multielectrónico por múltiples problemas monoeléctricos en los que la repulsión electrón-electrón se trata de un modo promedio.

El potencial Hartree-Fock $v^{HF}(i)$, o equivalentemente el campo visto por el electrón i , depende del resto los espín-orbitales (es decir, el operador de Fock depende de sus funciones propias). Por tanto, la ecuación (3.42) es no lineal y debe ser resuelta de un modo iterativo. El procedimiento para resolver la ecuación de Hartree-Fock es el conocido como Método de Campo Autoconsistente (*Self Consistent Field, SCF*). La idea básica del método SCF es simple. Partiendo de un conjunto inicial de espín-orbitales se calcula un campo promedio (esto es $v^{HF}(i)$) visto por cada electrón y se resuelve la ecuación de valores propios (3.42) para un nuevo conjunto de espín-orbitales. Usando este nuevo conjunto de espín-orbitales se puede calcular nuevos campos y repetir el

procedimiento hasta alcanzar la autoconsistencia, lo cual se refleja en la convergencia de la energía total calculada.

De esta forma, a partir de la resolución de la ecuación (3.42) se obtiene un conjunto de espín-orbitales Hartree-Fock ortonormales $\{\chi_k\}$ con energías orbitales $\{\varepsilon_k\}$. Los N espín-orbitales con menor energía son llamados orbitales ocupados. El determinante de Slater formado con esos espín-orbitales es la función de onda Hartree-Fock para el estado fundamental y constituye la mejor aproximación variacional para el estado fundamental del sistema de la forma monodeterminantal. El resto de espín-orbitales son llamados orbitales virtuales. En principio hay infinitas soluciones para la ecuación de Hartree-Fock y un conjunto infinito de orbitales virtuales. En la práctica, la ecuación de Hartree-Fock es resuelta introduciendo un conjunto finito de funciones de base espaciales $\{\phi_\mu(\mathbf{r}) | \mu = 1, 2, \dots, K\}$. La parte espacial de los espín-orbitales con función de espín α puede ser expandida en términos de las funciones de base conocidas $\{\phi_\mu\}$. La parte espacial de los espín-orbitales con el espín β puede ser expandida del mismo modo y ambas expansiones sustituidas en la ecuación (3.42) para obtener una matriz de ecuaciones de valores propios, de cuya resolución se obtienen los coeficientes.

El procedimiento general para expandir los orbitales moleculares espaciales en un conjunto de funciones de base espaciales conocido es el siguiente:

$$\psi_i(\mathbf{r}) = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \phi_\mu(\mathbf{r}) \quad (3.44)$$

El uso de un conjunto de base de K funciones espaciales $\{\phi_\mu\}$ conduce a un conjunto de $2K$ espín-orbitales (K con espín α y K con espín β). Es decir, se obtiene un conjunto de N espín-orbitales ocupados $\{\chi_a\}$ y un conjunto complementario de $2K-N$ espín-orbitales no ocupados o virtuales $\{\chi_r\}$. Un único determinante de Slater formado a partir del conjunto $\{\chi_a\}$ es el estado fundamental variacional Hartree Fock, para el cual se usará el símbolo Ψ_0 o $|\Psi_0\rangle$. Una representación pictórica de $|\Psi_0\rangle$ aparece en la Figura 3.3. Los $2K$ espín-orbitales han sido ordenados de acuerdo con sus energías, ignorando posibles degeneraciones. La ocupación de los N espín-orbitales más bajos en energía (cada electrón ocupa un espín-orbital) está indicada por asteriscos.

Cuanto mejor sea $\{\phi_\mu\}$, tanto en tipo como en número de funciones que comprende el conjunto de base, mayor resultará ser el grado de flexibilidad que tiene para la expansión de los espín-orbitales y menor el valor calculado para la energía dada por la expresión (3.41).

Conforme aumente el tamaño del conjunto de base, menor será la energía Hartree-Fock alcanzada, hasta llegar a un límite llamado "Límite Hartree-Fock" (ϵ_0). En la práctica, cualquier valor finito de K conduce a una energía por encima del Límite Hartree-Fock.

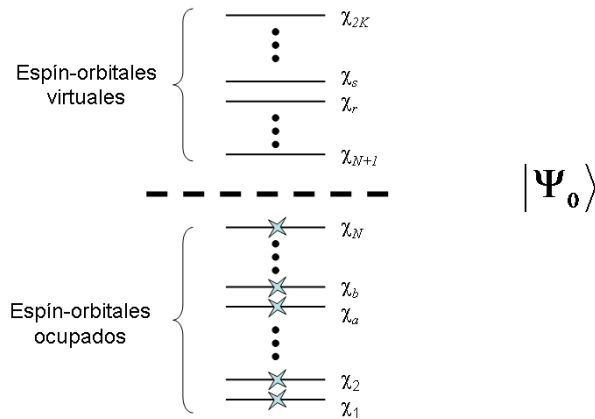


Figura 3.3. El determinante Hartree-Fock para el estado fundamental, $|\chi_1\chi_2 \cdots \chi_a\chi_b \cdots \chi_N\rangle$

- **Determinantes Excitados**

Según se ha explicado en el apartado anterior, a través del procedimiento Hartree-Fock se obtiene un conjunto $\{\chi_i\}$ de $2K$ espín-orbitales. El estado fundamental Hartree-Fock es el determinante:

$$|\Psi_0\rangle = |\chi_1\chi_2 \cdots \chi_a\chi_b \cdots \chi_N\rangle \quad (3.45)$$

que es la mejor aproximación al estado fundamental, en un sentido variacional, de la forma monodeterminantal. Sin embargo, éste es sólo uno de los muchos determinantes que se pueden construir a partir de los $2K > N$ espín-orbitales. El número de combinaciones de $2K$ objetos cogiendo N de ellos cada vez es el coeficiente binomial:

$$\binom{2K}{N} = \frac{(2K!)}{N!(2K-N)!} \quad (3.46)$$

es decir, este es el número de diferentes determinantes simples que se pueden formar con N electrones y $2K$ espín-orbitales. El estado fundamental Hartree-Fock es sólo uno de ellos. Si se considera el estado fundamental Hartree-Fock (3.45) como estado de referencia, el resto de determinantes se pueden clasificar por comparación con él. Esto consiste en evaluar qué espín-orbitales ocupados del conjunto $\{\chi_a\}$ en (3.45) han sido reemplazados por espín-orbitales virtuales del conjunto $\{\chi_r\}$. Un determinante simplemente excitado es aquel en el que un electrón que ocupaba un espín-orbital χ_a en el estado fundamental Hartree-Fock ha sido promocionado a un espín-orbital χ_r como se puede ver en la Figura 3.4.

$$|\Psi_a^r\rangle = |\chi_1\chi_2\cdots\chi_r\chi_b\cdots\chi_N\rangle \quad (3.47)$$

Un determinante doblemente excitado consiste en el reemplazo de dos electrones. Por ejemplo, los electrones que ocupaban χ_a y χ_b son excitados a χ_r y χ_s ,

$$|\Psi_{ab}^{rs}\rangle = |\chi_1\chi_2\cdots\chi_r\chi_s\cdots\chi_N\rangle \quad (3.48)$$

Todos los $\binom{2K}{N}$ determinantes pueden ser clasificados en simples, dobles, triples, cuádruples,..., N-duples excitados en comparación con el estado fundamental Hartree-Fock. Estos determinantes pueden ser tomados para representar aproximadamente

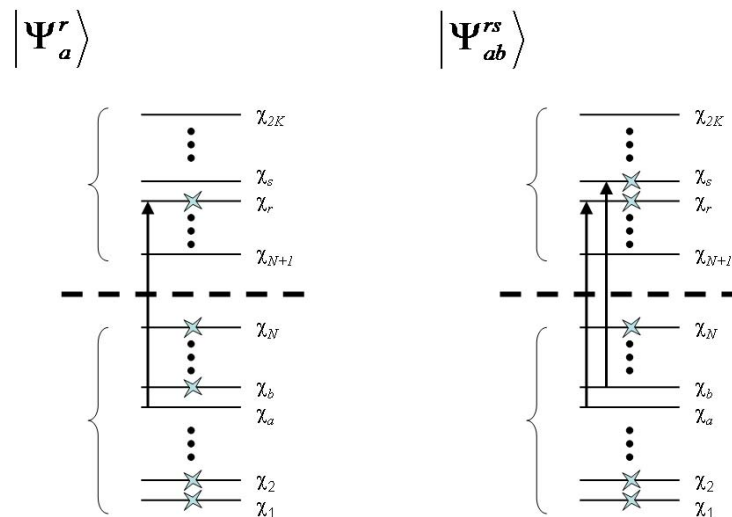


Figura 3.4. Representación esquemática de determinantes excitados. Izquierda: determinante de una excitación simple. Derecha: determinante de una excitación doble.

estados excitados del sistema o utilizarlos en combinación lineal con $|\Psi_0\rangle$ para una descripción más precisa del estado fundamental o de un estado excitado molecular. La importancia de estos determinantes a la hora de representar estados verdaderos del sistema disminuye según aumenta el número de excitaciones. Mientras que los determinantes excitados no son representaciones precisas de los estados excitados, sí que juegan un papel relevante como funciones de base N-electrónicas para la expansión del estado N-electrónico exacto.

3.2.3. Métodos Post-Hartree-Fock

- Forma de la función de onda exacta
Interacción de Configuraciones (CI)

Supóngase que se posee un conjunto de funciones de base completo $\{\chi_i(x)\}$. Cualquier función de una única variable $\Phi(x_1)$ puede ser exactamente expandida como:

$$\Phi(x_1) = \sum_i a_i \chi_i(x_1) \quad (3.49)$$

donde a_i es un coeficiente de la expansión. Una función de dos variables se expandirá así:

$$\Phi(x_1, x_2) = \sum_{ij} b_{ij} \chi_i(x_1) \chi_j(x_2) \quad (3.50)$$

y si se incluye la condición de antisimetría la función quedará:

$$\begin{aligned} \Phi(x_1, x_2) &= \sum_i \sum_{i>j} b_{ij} [\chi_i(x_1) \chi_j(x_2) - \chi_j(x_1) \chi_i(x_2)] \\ &= \sum_{i<j} \frac{1}{\sqrt{2}} b_{ij} |\chi_i \chi_j\rangle \end{aligned} \quad (3.51)$$

Por tanto, queda demostrado que una función de dos variables antisimétrica arbitraria cualquiera puede ser descrita mediante determinantes formados a partir de un conjunto completo de funciones de una variable $\{\chi_i(x)\}$. Este argumento se puede ampliar para el caso de más de dos variables, de modo que la función de onda exacta para el estado fundamental y para los estados excitados de nuestro problema N-

electrónico puede ser descrita como una combinación lineal de todos los posibles determinantes de Slater N-electrónicos formados a partir de un conjunto completo de espín-orbitales. La función de onda exacta para cualquier estado del sistema tendría la forma:

$$|\Phi\rangle = c_0 |\Psi_0\rangle + \sum_{ra} c_a^r |\Psi_a^r\rangle + \sum_{\substack{a<b \\ r<s}} c_{ab}^{rs} |\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \sum_{\substack{a<b<c \\ r<s<t}} c_{abc}^{rst} |\Psi_{abc}^{rst}\rangle + \dots \quad (3.52)$$

El conjunto infinito de determinantes N-electrónicos $\{|\Psi_i\rangle\} = \{|\Psi_0\rangle, |\Psi_a^r\rangle, |\Psi_{ab}^{rs}\rangle, \dots\}$ constituye una base completa para la expansión de cualquier función de onda N-electrónica. La energía exacta del estado fundamental y de los estados excitados del sistema son los valores propios de la representación matricial del Hamiltoniano en esta base (es decir, de la matriz con los elementos $\langle\Psi_i|\mathcal{H}|\Psi_j\rangle$) formada por el conjunto completo $\{|\Psi_i\rangle\}$. Puesto que cada $|\Psi_i\rangle$ puede ser definido especificando la configuración de espín-orbitales que la forma, este procedimiento es conocido como “Interacción de Configuraciones” (*Configuration Interaction, CI*). El valor propio más bajo de la matriz Hamiltoniana se denomina \mathcal{E}_0 y es la energía exacta no relativista del estado fundamental del sistema dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer. La diferencia entre esta energía exacta y la energía límite Hartree-Fock, E_0 , es lo que se llama Energía de Correlación, E_{corr} , ya que el movimiento de los electrones con espines opuestos no está correlacionado en la aproximación de Hartree-Fock.

$$E_{corr} = \varepsilon_0 - E_0 \quad (3.53)$$

Desafortunadamente, nunca se va a poseer conjuntos de base infinitos. Si trabajamos con conjuntos de base finitos $\{\chi_i | i = 1, 2, \dots, K\}$ los $\binom{2K}{N}$ determinantes formados a partir de esos espín-orbitales no forman una base completa N-electrónica. No obstante diagonalizando la representación matricial del Hamiltoniano finita formada a partir del conjunto de posibles determinantes, se llega a las soluciones que son exactas dentro del subespacio formado por los $2K$ espín-orbitales, o lo que es equivalente, con el subespacio N-electrónico formado por los $\binom{2K}{N}$ determinantes. Este procedimiento se conoce como "Full CI"⁴¹ (*Full Configuration Interaction*, FCI), y supone lo que se denomina "un primer truncamiento". Incluso para sistemas relativamente pequeños y un conjunto de base mínima, el número de determinantes que debe ser incluido en un FCI es extremadamente grande. Por eso, en la práctica, se realiza un segundo truncamiento y se usan únicamente una pequeña fracción de esos $\binom{2K}{N}$ posibles determinantes. En la Figura 3.5 se muestra la dependencia de la función de onda no relativista dentro de la aproximación Born-Oppenheimer con el tamaño de los conjuntos de base monoeléctricos y N-electrónicos.

La matriz FCI presenta la siguiente estructura:

$$\begin{array}{cccc}
 |\Psi_0\rangle & |\Psi_a^r\rangle = |S\rangle & |\Psi_{ab}^{rs}\rangle = |D\rangle & |\Psi_{abc}^{rst}\rangle = |T\rangle \quad \dots \\
 \langle\Psi_0| & \left(\begin{array}{cccc}
 \langle\Psi_0|\mathcal{H}|\Psi_0\rangle & 0 & \langle\Psi_0|\mathcal{H}|D\rangle & 0 & \dots \\
 \langle S|\mathcal{H}|S\rangle & \langle S|\mathcal{H}|D\rangle & \langle S|\mathcal{H}|T\rangle & \dots & \dots \\
 \langle D|\mathcal{H}|D\rangle & \langle D|\mathcal{H}|T\rangle & \dots & \dots & \dots \\
 \langle T|\mathcal{H}|T\rangle & \dots & \dots & \dots & \dots \\
 \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots
 \end{array} \right) & (3.54)
 \end{array}$$

Sólo aparecen la mitad de los elementos porque se trata de una matriz hermítica. Para examinar la estructura de la matriz FCI hay que hacer una serie de observaciones para las cuales es conveniente repasar las reglas de Condon-Slater (ver Apéndice V). Lo primero que se puede extraer de la matriz FCI es que no hay acoplamiento entre el estado HF y las excitaciones simples. Esto es una consecuencia del Teorema de Brillouin según el cual aquellos elementos matriciales con la forma $\langle\Psi_0|\mathcal{H}|\Psi_a^r\rangle$ son cero. Tampoco hay acoplamiento entre $|\Psi_0\rangle$ y las excitaciones triples y cuádruples, debido a que, según las reglas de Condon-Slater, todos los elementos matriciales de la matriz Hamiltoniana que difieran en más de dos espín-orbitales son 0. Puesto que las excitaciones simples no acoplan directamente con $|\Psi_0\rangle$ es de esperar que éstas tengan un efecto muy pequeño en la energía del estado fundamental. Este efecto no es nulo porque sí que interaccionan con las dobles excitaciones, que a su vez lo hacen con $|\Psi_0\rangle$. Aunque su efecto

en la energía del estado fundamental sea prácticamente despreciable, influyen en la distribución de cargas y son necesarias para la descripción correcta de propiedades que dependen de las integrales monoeléctricas como el momento dipolar. Por otra parte, ya que son las dobles excitaciones las que acoplan directamente con $|\Psi_0\rangle$, es de esperar que tengan un papel importante en la energía del estado fundamental, y para sistemas pequeños juegan un papel determinante en la energía de correlación. Si hablásemos sólo en términos de la energía del estado fundamental, el papel de las excitaciones cuádruples sería de hecho más importante que el de las simples o triples.

Como se ha comentado, a pesar del gran avance tecnológico, sólo es posible acceder a resultados FCI para sistemas de pequeño tamaño molecular. Por este motivo, normalmente, es necesario trabajar dentro del contexto de las truncaciones, que limitan tanto el número de funciones monoeléctricas como polielectricas a considerar.

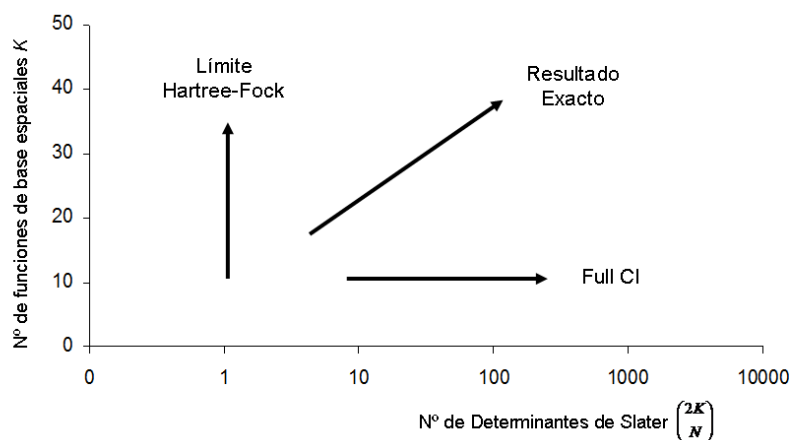


Figura 3.5. Dependencia de la función de onda con el tamaño de la base monoeléctrica y N-electrónica.

Estas dos limitaciones son las fuentes más importantes de imprecisión en los cálculos químico cuánticos. El tipo de truncaciones realizadas junto con la clase de técnicas (teoría variacional, de perturbaciones, combinación de ambas,...) configura la mayoría de los métodos químico-cuánticos más utilizados.

- **Métodos multiconfiguracionales**

En general, los estados electrónicos excitados requieren para su descripción de varias configuraciones, y lo mismo ocurre para el estado electrónico fundamental en conformaciones alejadas de su geometría de equilibrio (estados de transición (TS) en reacciones químicas, por ejemplo). Por tanto, un método químico-cuántico truncado en el espacio N-electrónico que pretenda aproximarse a la descripción cuantitativa de dichas situaciones, donde dos o más configuraciones son igualmente relevantes, debe contemplar la naturaleza multiconfiguracional de la estructura electrónica. Una forma de hacerlo es mediante la aproximación "*Multiconfigurational Self-Consistent Field*" (MCSCF), que incluye explícitamente varias configuraciones en el proceso SCF. Si se utilizase una sola configuración el proceso MCSCF sería equivalente a un HF.

Un método MCSCF puede ser considerado como un método CI, en el que no sólo los coeficientes de la expansión de los determinantes son optimizados utilizando el principio variacional, sino también los coeficientes de la expansión correspondientes a los orbitales moleculares utilizados para construir los determinantes. Puesto que el número de

iteraciones requeridas para conseguir la convergencia tiende a aumentar con el número de configuraciones incluidas, el tamaño de la función MCSCF que puede ser tratada es menor que para los métodos CI.

La función de onda HF debía cumplir el requisito de que la variación de la energía con respecto a la variación orbital fuera cero (teorema variacional). Esto es equivalente a decir que la primera derivada de la energía con respecto a los coeficientes de la expansión de los orbitales moleculares debe ser cero. Como se ha comentado anteriormente, las ecuaciones HF se resuelven a través de un método iterativo SCF y hay muchas técnicas para acelerar la convergencia del procedimiento iterativo. Esto, sin embargo, no garantiza que la solución encontrada por el SCF sea un mínimo de la energía en función de los coeficientes. Para determinar que lo es, la matriz de derivadas segundas de la energía con respecto a los coeficientes de los orbitales moleculares debe ser calculada y diagonalizada. Si efectivamente es un mínimo todos los valores propios serán positivos. En la práctica sólo se determina el valor propio más bajo. Si es positivo, entonces se trata de un mínimo. Raramente esto se comprueba para las funciones de onda SCF, ya que en la mayor parte de los casos el procedimiento converge sin problemas a un mínimo. Por el contrario, las funciones de onda MCSCF son mucho más difíciles de converger, y en ocasiones llegan a soluciones que no se tratan de mínimos. Por tanto, las optimizaciones son llevadas a cabo en algunos casos a través de la expansión de segundo orden de la energía sobre los parámetros variacionales (coeficientes orbitales y configuracionales), de forma análoga al procedimiento de SCF de segundo orden, usando métodos basados en Newton-Raphson para forzar la convergencia a un mínimo.

Los métodos MCSCF no se suelen utilizar para conseguir calcular grandes fracciones de la energía de correlación. Si el interés es únicamente ese, resulta más eficiente incluir determinantes adicionales y conservar fijos los orbitales moleculares (hacer un CI). Los métodos MCSCF son útiles cuando la función de onda no puede ser correctamente descrita de forma cualitativa con un único determinante HF. Un ejemplo lo tenemos en el caso de estructuras resonantes no equivalentes (como es el caso del ozono), en la descripción de estados excitados o en las disociaciones.

Una ventaja de este tipo de métodos es que las configuraciones que se utilizan en la expansión MCSCF son estados de espín puro y, por tanto, las funciones de onda MCSCF no sufren el problema de la contaminación de espín.

El descenso de la energía introducido al añadir suficiente flexibilidad en la función de onda para que sea capaz de describir cualitativamente el comportamiento de un sistema, se denomina energía de correlación electrónica estática. Este es, esencialmente, el efecto de permitir a los orbitales estar parcialmente ocupados en lugar de forzarlos a la doble ocupación. El descenso de la energía restante introducido a través de la correlación se debe al movimiento de los electrones y es la llamada energía de correlación dinámica. No hay una forma única de separar estos efectos. Aumentando el número de configuraciones en un MCSCF se cubre cada vez más la correlación dinámica hasta alcanzar el límite "full CI". Como se ha mencionado anteriormente, los métodos MCSCF son inicialmente usados para generar una función de onda cualitativamente correcta, esto es, para cubrir la parte estática de la correlación. El resto, la correlación

dinámica, que refleja la interacción electrón-electrón de corto alcance, se puede aproximar bien mediante métodos variacionales como el “*Multireference CI*” (MRCI) o empleando la teoría de perturbaciones mediante, por ejemplo, el método CASPT2 (“*Complete Active Space Perturbation Theory to Second Order*”)^{42,43} que se comentará más adelante.

- **El método CASSCF**

El mayor problema con los métodos MCSCF es seleccionar las configuraciones necesarias para describir adecuadamente la propiedad de interés. Una de las aproximaciones más populares es la del “*Complete Active Space Self-Consistent Field, CASSCF*”.^{44,45,46} En este método, la selección de las configuraciones se realiza dividiendo los orbitales moleculares en activos e inactivos. Los orbitales moleculares activos serán, normalmente, los correspondientes en la aproximación HF a los orbitales moleculares más bajos en energía no ocupados. Los orbitales moleculares inactivos estarán siempre doblemente ocupados o vacíos. Con los orbitales moleculares activos se crea una “full CI”. Qué orbitales moleculares deben ser incluidos en el espacio activo se decide manualmente, considerando el problema a estudiar y evaluando las posibilidades técnicas del método. Si se desean muchos puntos en una superficie de energía potencial, el espacio activo debe incluir todos aquellos orbitales que cambien significativamente o para aquellos cuya correlación dinámica se espera que cambie. Una notación común es CASSCF (n,m), en la que se indica que n electrones están distribuidos de todas las formas posibles en m orbitales.

El número de orbitales y electrones que puede ser tratado por métodos CASSCF está severamente restringido por el espacio activo de la expansión "full CI". El aumento factorial en el número de configuraciones, que se convierte en inimaginablemente grande incluso para espacios activos pequeños, limita el espacio activo para funciones de onda CASSCF a menos de 13-14 electrones/orbitales. La elección de los orbitales importantes se convierte, por tanto, en algo esencial. El objetivo de los métodos MCSCF es, normalmente, no conseguir una gran fracción de la energía total de correlación, sino recoger todos los cambios que ocurren en la energía de correlación no dinámica para un proceso dado. Seleccionar el espacio activo para un cálculo CASSCF requiere, por tanto, del uso de la intuición química. Hay algunas reglas que pueden ayudar a seleccionar un espacio activo:

- 1.- Por cada orbital ocupado habrá un correspondiente orbital virtual, el cual correlaciona al ocupado (π , π^* ; σ , σ^* ; etc.)
- 2.- Se usarán las energías orbitales de un cálculo HF para seleccionar los orbitales de valencia más importantes que serán los más altos en energía ocupados y los más bajos en energía vacíos. Así bien, el uso de las energías orbitales HF para seleccionar el espacio activo puede ser problemático en dos situaciones. La primera es cuando se usan conjuntos de bases extensos, donde habrá orbitales virtuales no de valencia, con bajas energías los cuales pueden no ser relevantes para el problema a tratar. Además, los orbitales virtuales HF básicamente no son particularmente buenos para describir la correlación electrónica. La inspección de la forma de los orbitales puede revelar cuáles elegir. Deberían ser aquellos que se asemejen a los orbitales ocupados en términos de contribución de las funciones de base. El segundo problema

es más fundamental. Si la función de onda real tiene un significativo carácter multiconfiguracional, entonces el HF puede estar equivocado y la selección de orbitales activos basados en una función cualitativamente errónea puede conducir a resultados falsos.

3.- Una forma de superar este problema es usar el concepto de orbitales naturales. Los orbitales naturales son aquellos que diagonalizan la matriz de densidad y cuyos valores propios son los números de ocupación. Orbitales con números de ocupación significativamente diferentes de cero o dos (para un sistema capa cerrada) son, normalmente, aquellos que es más importante incluir en el espacio activo. Como una función de onda HF tendrá siempre números de ocupación orbital de exactamente cero o dos, será necesario incluir algo de correlación electrónica para obtener orbitales con números de ocupación que no sean enteros. Esto puede hacerse, por ejemplo, a través de un cálculo preliminar MP2.

Una variación del procedimiento CASSCF es el "*Restricted Active Spaced Self-Consistent Field*", (RASSCF).⁴⁷ Aquí, los orbitales moleculares activos se dividen en tres secciones: RAS1, RAS2 y RAS3, teniendo cada uno restricciones en los números de ocupación (excitaciones) permitidas. Las configuraciones en el espacio RAS2 están generadas por una "full CI" de forma análoga al método CASSCF, y se generan configuraciones adicionales con, por ejemplo, un máximo de 2 electrones para ser excitados desde el RAS1 y un máximo de dos electrones para ser excitados al espacio RAS3. La flexibilidad del RAS1 Y RAS3 la impone el usuario. En esencia, un típico procedimiento RASSCF genera configuraciones a través de la combinación de una "full CI" en un pequeño número de orbitales moleculares (RAS2) y una CISD (una CI

que sólo considera las simples y dobles excitaciones) en un espacio algo más grande (RAS1 y RAS3).

El método CASSCF tiende inherentemente a dar una descripción desbalanceada, puesto que toda la correlación electrónica recuperada está en el espacio activo, pero ninguna por definición en el espacio inactivo o entre los electrones activos o inactivos. Esto no es un problema si todos los electrones de valencia son incluidos en el espacio activo, pero esto sólo es posible para sistemas pequeños.

- **Inclusión de la correlación electrónica dinámica**
El método CASPT2

La correlación dinámica, que refleja la interacción electrón-electrón de corto alcance, se puede aproximar bien mediante métodos variacionales como por ejemplo el “*multireference CI*” (MRCI) o empleando la teoría de perturbaciones mediante, por ejemplo, el método CASPT2.

La aproximación CASSCF/MRCI suele ser costosa y a menudo impracticable, ya que una selección satisfactoria de las configuraciones de referencia conlleva el uso de grandes recursos de computación. Por otro lado, desde hace casi una década se ha mostrado una alternativa viable que rinde una relación calidad/coste de los resultados muy ventajosa y que consiste en la aplicación de la teoría de perturbaciones de segundo orden sobre una función de onda de referencia multiconfiguracional CASSCF, es decir, la aproximación CASSCF/CASPT2.

La filosofía de los métodos perturbacionales es considerar que, el problema en cuestión difiere sólo ligeramente de un problema (de orden cero) para el que ya se conocen las soluciones. La solución al problema dado deberá, por tanto, estar próxima a la solución del sistema (real o modélico) conocido. Esto es descrito matemáticamente definiendo un operador Hamiltoniano que consta de dos partes: una referencia (\mathcal{H}_0) y una perturbación (\mathcal{H}'). La premisa de los métodos perturbacionales es que el operador \mathcal{H}' es, en algún sentido, pequeño comparado con \mathcal{H}_0 . En mecánica cuántica, los métodos perturbacionales pueden ser usados añadiendo correcciones a la solución para lo cual se emplea la aproximación de partículas independientes en el marco teórico llamado "*many-body perturbation theory*".⁴⁸ El método CASPT2 consiste en un tratamiento de perturbaciones a segundo orden monorreferencial, en el que la función de onda de referencia es de tipo CASSCF, es decir, multiconfiguracional. Este método calcula la función de onda a primer orden y la energía a segundo orden, de acuerdo con la teoría de perturbaciones de Rayleigh-Schrödinger. La función de onda normalizada vendrá dada por la ecuación:

$$|\Psi\rangle = c_0|\Psi^0\rangle + c_1|\Psi'\rangle \quad (3.55)$$

donde Ψ^0 es la función de onda multiconfiguracional generada a partir de un cálculo CASSCF y Ψ' es la función de primer orden normalizada. El peso $\omega = c_0^2$, corresponde al peso de la función de referencia en $|\Psi\rangle$ y se utiliza como un criterio de calidad rápido y sencillo del tratamiento de perturbaciones realizado. En la práctica se verifica que los estados electrónicos excitados calculados tengan un peso similar al correspondiente al estado fundamental, empleando el mismo espacio

activo. Sucede con frecuencia que estados del espacio de interacción externo a la referencia tienen una contribución elevada en la perturbación a segundo orden, dando lugar a coeficientes c_1 con valores proporcionalmente altos, lo que conllevará un peso de la referencia relativamente bajo ($c_0^2 + c_1^2 = 1$). El análisis de los estados con valores del coeficiente c_1 (estados intrusos) elevados nos puede sugerir la reformulación del tratamiento de perturbación realizado mediante la inclusión en el espacio activo de los orbitales implicados en el estado intruso. Esto ocurre en ocasiones si sólo se han incluido en el espacio activo parte de los orbitales requeridos para describir un estado (es común cuando se trunca el espacio activo π en el tratamiento de estados electrónicos en moléculas orgánicas). En otras situaciones, cuando la base monoeléctrica contiene funciones difusas, sucede que el peso de la referencia es "algo bajo" respecto al correspondiente valor obtenido para el estado fundamental, sin que se pueda responsabilizar por ello a un estado concreto de la función de primer orden, la cual suele presentar un gran número de contribuciones de escasa importancia. Estamos en estos casos frente a situaciones cuasidegeneradas accidentales, implicando a estados intrusos que interactúan débilmente con la referencia. En estos casos, la técnica "level-shift" (LS)^{49,50,51} queda especialmente aconsejada para constatar la validez del tratamiento de perturbaciones realizado. El LS-CASPT2 minimiza las contribuciones a segundo orden de los estados intrusos "débiles", mediante la adición de un parámetro de desplazamiento al Hamiltoniano de orden cero y posterior corrección de su efecto a la energía de segundo orden. Cuando no se presentan estados intrusos, el efecto del desplazamiento aplicado

es despreciable. Con objeto de evitar singularidades (puntos donde la función se hace infinita) se suele utilizar en la actualidad la técnica del *imaginary level-shift* en la que el parámetro añadido al Hamiltoniano es un número imaginario, aunque los resultados son reales.⁵²

Otra adición de un parámetro de desplazamiento al Hamiltoniano de orden cero que resulta ser una herramienta muy eficaz en el tratamiento de sistemas capa abierta es el IPEA-CASPT2.⁵³ En los procesos en los que el número de átomos apareados cambia, el método CASPT2 da una descripción desbalanceada del Hamiltoniano de orden cero para el sistema capa cerrada en comparación con electrones desapareados, de modo que sobreestima la estabilidad de los estados capa abierta. La introducción de un parámetro de desplazamiento en el Hamiltoniano de orden cero con la técnica IPEA-CASPT2 corrige en gran parte este error y permite conseguir notables mejoras en las energías calculadas, en particular para los potenciales de ionización y electroafinidades.

Por otra parte, el método MS-CASPT2⁵⁴ representa una extensión del método CASPT2 para el tratamiento de perturbaciones con varios estados de referencia. El método CASPT2 (con una única función de referencia) puede quedar seriamente limitado para la descripción precisa de procesos químicos cuando la función CASSCF no sea un estado de referencia adecuado (debido al acoplamiento entre diferentes estados electrónicos a través de la energía de segundo orden). Por ejemplo, cuando dos estados electrónicos estén energéticamente muy próximos y la correlación dinámica afecte en gran medida su interacción, (tal como sucede en los cruces evitados) y en aquellas situaciones donde la interacción entre los estados de valencia y Rydberg

sea tratada incorrectamente a nivel CASSCF. Con este método se construye un Hamiltoniano efectivo donde los elementos diagonales corresponden a las energías CASPT2 y los elementos fuera de la diagonal contemplan el acoplamiento a segundo orden en la energía de correlación dinámica de los estados de interés. De esta forma, todos los estados de una simetría dada se pueden tratar simultáneamente incluyendo los efectos sobre las funciones de referencia y las soluciones obtenidas son plenamente ortogonales.

3.2.4. Otros métodos químico-cuánticos.

Las dos grandes familias de metodología químico-cuántica más usadas hoy día son:

- Los **métodos *ab initio***, aquellos basados en la resolución de la función de onda y de los cuales se ha estado hablando a lo largo de todo el capítulo. En estos métodos se calculan explícitamente todas las integrales necesarias para realizar el cálculo, sin más aproximaciones que las derivadas del nivel de cálculo escogido. Dentro de los métodos *ab initio* existe una aproximación que difiere de las que se han comentado hasta ahora en cuanto a que la función de onda adopta una estructura exponencial. Esta metodología, conocida con el nombre de Coupled Cluster (CC),⁵⁵ asegura una correcta separabilidad de los fragmentos y una correcta N-dependencia, además de ser consistente con el tamaño (*size-consistency*). Actualmente, los métodos CC incluyen distintos niveles de aproximación. Los más usados son de tipo monorreferencial: el método CCSD que

incluye operadores de diexcitación y distintas aproximaciones incluyendo triples excitaciones, CCSD (T). Existe también una teoría MRCC, aunque su implementación es compleja y su uso está lejos de poder ser considerado rutinario. Los métodos CC, al igual que los métodos de interacción de configuraciones o en los perturbativos, requieren que la función de orden cero permita una buena descripción del sistema. Por ello, los métodos CC monorreferenciales como el CCSD, aún con inclusión de las triexcitaciones, no ofrecen descripciones correctas para aquellos sistemas que a orden cero sean de naturaleza multiconfiguracional. No obstante, se están intentando encontrar soluciones a estos problemas como se puede constatar en el siguiente capítulo.

- Los **métodos basados en la densidad electrónica** (*Density Functional Theory*,⁵⁶ DFT; *Time-Dependent DFT*, TD-DFT). La base fundamental de esta teoría es el uso de la densidad electrónica en lugar de la función de onda para el cálculo de la energía. No obstante, la fórmula matemática exacta que relaciona la energía con la densidad electrónica no es conocida, y es necesario recurrir a expresiones aproximadas que incluyen parámetros ajustables. El principal inconveniente de estos métodos se encuentra en el hecho de que para sistemas en que DFT da resultados erróneos no hay forma sistemática de mejorarlos. A pesar de ello, los métodos basados en la DFT se han popularizado en los últimos años para el cálculo de sistemas de gran tamaño molecular, a partir de la incorporación de funcionales de correlación-intercambio que proporcionan

resultados de calidad comparable o superior, para el estado fundamental, a la que ofrece el método MP2, con un coste computacional más reducido.

3.3. CONJUNTOS DE BASE

Una de las aproximaciones inherentes en todos los métodos químico-cuánticos es la introducción de un conjunto de base. Expandir una función desconocida, como es un orbital molecular (MO), como un conjunto de funciones de base conocidas no representa una aproximación siempre y cuando el conjunto de base sea completo. Esto significa que debería usarse un conjunto infinito de funciones de base, lo cual es imposible. Un MO desconocido se puede imaginar como una función en el sistema de infinitas coordenadas en el espacio creado por un conjunto de base completo. Cuando lo que se emplea es un conjunto de base finito, sólo las componentes del MO a lo largo de ese eje de coordenadas correspondiente a las bases seleccionadas pueden ser representadas. Cuando menor es el conjunto de base, peor es la representación. A parte del número, el tipo de función de base también influye en la precisión. Puesto que el esfuerzo computacional requerido al utilizar métodos *ab initio*, en los algoritmos más comunes, se ve incrementado en un factor M^4 con el número de funciones de base, es de vital importancia conseguir un compromiso entre la utilización de conjuntos de base lo más pequeños posible y la pérdida de precisión.⁵⁷

- Orbitales de Slater y orbitales de Tipo Gaussian

Hay dos tipos de funciones de base usualmente empleadas (también llamadas orbitales atómicos (*Atomic Orbitals, AO*)) comúnmente usadas en los cálculos de estructura electrónica: Orbitales de tipo Slater (*Slater Type Orbitals, STO*) y Orbitales de tipo Gaussian (*Gaussian Type Orbitals, GTO*).

Los orbitales de tipo Slater⁵⁸ tienen la forma de la siguiente función:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \phi) = NY_{l,m}(\theta, \phi)r^{n-1}e^{-\zeta r} \quad (3.56)$$

N es una constante de normalización, y $Y_{l,m}$ son las usuales funciones de los armónicos esféricos. La dependencia exponencial con la distancia entre los núcleos y los electrones refleja el orbital exacto para el átomo de hidrógeno. Sin embargo, los orbitales STO no tienen ningún nodo radial, que son introducidos a través de combinaciones lineales de distintas STO. La dependencia exponencial asegura una convergencia rápida al incrementar el número de funciones de base.

Los orbitales de tipo Gaussian⁵⁹ pueden ser escritos en términos de coordenadas polares (3.57) o cartesianas (3.58):

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \phi) = NY_{l,m}(\theta, \phi)r^{(2n-2-l)}e^{-\alpha r^2} \quad (3.57)$$

$$\chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x, y, z) = Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\alpha r^2} \quad (3.58)$$

Donde l_x, l_y, l_z determinan el tipo de orbital. Aunque una GTO parece similar en los dos conjuntos de coordenadas, hay una sutil diferencia. Una GTO de tipo d escrita en términos de funciones esféricas tiene cinco componentes ($Y_{2,2}, Y_{2,1}, Y_{2,0}, Y_{2,-1}, Y_{2,-2}$), pero aparecen seis

componentes en coordenadas cartesianas ($x^2, y^2, z^2, xy, xz, yz$). Estas seis funciones pueden ser transformadas en las cinco funciones esféricas de tipo d y una función s adicional ($x^2+y^2+z^2$). De una forma similar hay 10 funciones cartesianas de tipo f que pueden ser transformadas en siete funciones esféricas de tipo f y un conjunto de funciones esféricas de tipo p.

Debido a la dependencia exponencial α^2 , cabría esperar que las GTO fueran inferiores a las STO. Por una parte, en el núcleo las GTO presentan pendiente cero en contraste con las STO las cuales tienen una cúspide (la derivada es discontinua). El otro problema es que las GTO decaen demasiado rápidamente al alejarse de los núcleos, comparado con las STO, y la cola de la función está por tanto mal representada. Ambas funciones, las STO y las GTO pueden ser elegidas para formar un conjunto completo de funciones de base, pero por los dos aspectos comentados, serán necesarias más funciones de base de tipo GTO para conseguir una determinada precisión. Sin embargo, en el caso de las GTO el incremento del número de funciones de base es más que compensado por la facilidad con la que las integrales requeridas son calculadas. Por tanto, en términos de eficiencia computacional las funciones GTO son preferidas y usadas casi universalmente como funciones de base en los cálculos de estructuras electrónica. Además, generalmente todas las aplicaciones suelen tomar las GTO de forma que estén centradas en los núcleos correspondientes, aunque para cierto tipo de cálculos las GTOs pueden ser colocadas, por ejemplo, en el centro de un enlace o de una molécula.

- Clasificación de los conjuntos de base

Una vez decidido el tipo de función de base (en general GTO) y la localización (núcleo), el factor más importante es el número de funciones de base utilizado. El número más pequeño posible de funciones de base que se puede utilizar es el conjunto de base mínimo (*Minimum Basis Set, MBS*), e incluye sólo las funciones de base necesarias para describir los electrones del átomo neutro. Para el átomo de hidrógeno (y el de helio) el conjunto de base mínimo es, por tanto, una única función de tipo s. Para los átomos del primer periodo de la tabla periódica: dos funciones tipo-s (1s y 2s) y un conjunto de funciones tipo-p ($2p_x$, $2p_y$ y $2p_z$). Aunque el litio y el berilio formalmente sólo necesitarían dos funciones tipo-s, es lo habitual añadir también el conjunto de base tipo-p. Para los elementos del segundo periodo se usan tres funciones de tipo-s (1s, 2s y 3s) y dos conjuntos de funciones tipo-p (2p y 3p).

La siguiente mejora en los conjuntos de base es doblar todas las funciones, con lo que se obtienen los conjuntos de base Doble Zeta (*Double Zeta, DZ*). El término "Zeta" proviene del hecho de que el exponente de las funciones de base STO es a menudo denotado con la letra griega ζ . Un base DZ emplea por tanto dos funciones tipo-s para el átomo de hidrógeno (1s y 1s'), cuatro funciones tipo-s (1s, 2s, 1s' y 2s') y dos funciones de tipo-p (2p y 2p') para los elementos del primer periodo y seis funciones tipo-s y cuatro funciones tipo-p para los del segundo periodo. La importancia del conjunto de base DZ frente a la utilización del conjunto de base mínimo puede ser ilustrada considerando el enlace

en el HCN (ver Figura 3.5). El enlace σ C-H consistirá ante todo en el orbital de tipo-s del hidrógeno y el tipo- p_z del C. En enlace π entre el C y el N consistirá en los orbitales p_x y p_y del C y del N. Por tanto, el enlace π tendrá una distribución más difusa que el enlace σ C-H. El exponente óptimo para el orbital tipo-p del carbono será, de esta manera, más pequeño para la dirección x que para la dirección z. Si sólo está disponible un conjunto de orbitales tipo-p, como en el caso del mínimo conjunto de base, será necesario un compromiso. Una base DZ, sin embargo, tiene dos conjuntos de orbitales-p con diferentes exponentes. La función más estrecha (aquella que tiene el mayor exponencial) puede describir el enlace σ con un gran coeficiente, mientras que la función más difusa (la del menor exponente) puede ser utilizada principalmente para describir el enlace π C-N. Así, doblar el número de funciones de base permite una mejor descripción de la distribución electrónica en distintas direcciones.

El enlace químico ocurre entre los orbitales de valencia. Doblar las funciones-1s en, por ejemplo, los átomos de carbono, permite una mejor descripción del orbital 1s, pero puesto que este orbital es esencialmente independiente del entorno químico, estará muy próximo al caso atómico. Existe una variante de los conjuntos de base DZ en la que solamente se dobla el número de orbitales de valencia. Estos son denominados bases de valencia dividida (*split valence basis*). En los cálculos que se realizan habitualmente rara vez se doblan los orbitales de core y, por eso, el término de bases DZ suele englobar a los conjuntos de base de valencia dividida (denominados estrictamente VDZ, valencia doble zeta).

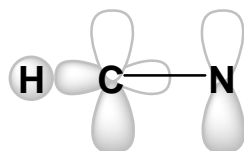


Figura 3.5. Una base doble zeta permite describir diferentes enlaces en diferentes direcciones.

El conjunto de base que corresponde al paso siguiente de aumentar el tamaño, es el Triple Zeta (TZ). Como en el caso anterior, es posible triplicar únicamente los orbitales de valencia, originando los conjuntos de base de valencia triple dividida (*Triple split valence*). Los nombres de Cuadruple Zeta (Quadruple Zeta, QZ) y Quintuple Zeta (5Z) se utilizan para los siguientes niveles de conjuntos de base, aunque para estos se suele indicar explícitamente el número de funciones de base de cada tipo.

En ocasiones, es interesante la utilización de funciones con un momento angular mayor al de la capa de valencia. Éstas son denominadas funciones de polarización (*polarization functions*). Considerando de nuevo la molécula HCN, el enlace C-H está descrito principalmente por el orbital-s del hidrógeno y los orbitales de tipo s y p_z del carbono. Está claro que la distribución electrónica a lo largo del enlace será diferente de la correspondiente a la perpendicular al mismo. Si sólo están presentes funciones de tipo s en el átomo de hidrógeno este hecho no puede ser descrito. Sin embargo, si se añade un conjunto de orbitales-p, la componente p_z puede ser utilizada para mejorar la descripción del enlace H-C. Los orbitales p añadidos introducen una polarización de los orbitales s. De modo similar, los orbitales d pueden ser utilizados para polarizar orbitales p, y los orbitales f para polarizar

los d. Para funciones de onda descritas con un único determinante (donde no está considerada la correlación electrónica) el primer conjunto de funciones de base de polarización (con funciones p para el hidrógeno y funciones d para átomos más pesados) es el más importante y en general describirá todos los efectos importantes de polarización de la distribución electrónica. Si se utilizan métodos que sí incluyen la correlación electrónica, entonces es indispensable el uso de funciones de base con un mayor momento angular para obtener resultados con precisión química. La correlación electrónica describe el descenso de la energía debido a que los electrones se “evitan” los unos de los otros. En este sentido se pueden identificar dos tipos de correlaciones: correlación “dentro-fuera” o correlación radial y correlación angular. La correlación radial se refiere a la situación en la que un electrón está cerca y otro lejos del núcleo. Para describir esta situación, el conjunto de base necesita funciones de base del mismo tipo, pero con distinto exponente. La correlación angular hace referencia a cuando dos electrones están en lados opuestos del núcleo. Para describir esto, el conjunto de base necesita funciones con exponentes de la misma magnitud pero con diferente momento angular. Por ejemplo, para describir la correlación angular de una función tipo-s son necesarias funciones de tipo-p, -d, -f, etc. La correlación angular y la radial son de la misma importancia y, por tanto, incluir funciones con un momento angular más elevado es siempre necesario en cálculos correlacionados.

Cuando se añade un único conjunto de funciones de polarización (funciones de tipo p al hidrógeno y funciones de tipo d a los átomos pesados) a una base DZ, se obtiene un nuevo conjunto de base de tipo Doble Zeta más Polarización (*Doble Zeta plus Polarization, DZP*). Hay una

variante que consiste en añadir funciones de polarización solamente a los átomos que no son hidrógenos. Esto no significa que las funciones de polarización no sean importantes en estos átomos, sin embargo, los hidrógenos no suelen tomar una parte activa en las propiedades de interés en sistemas orgánicos.

- **Conjunto de base balanceado**
(Basis Set Balanced)

Aunque en principio se podría añadir muchos conjuntos de funciones de polarización a pequeños conjuntos de base-sp, estudios de calibrado muestran que no es la forma más eficaz de proceder. Si se ha elegido un número insuficiente de funciones de base sp para describir la distribución electrónica básica, el intentar compensar este hecho usando funciones de momento angular más alto para obtener la función de base (y posiblemente también la geometría) resulta ser un artefacto inadecuado. Una regla general dice que el número de funciones de un tipo dado debería, al menos, ser uno menos que las del tipo que tienen un momento angular menor. Por ejemplo, una base: 3s2p1d, es una base balanceada, y en cambio una base: 3s2p2d2f1g está demasiado polarizada. Otro aspecto que nos indica la importancia de utilizar un conjunto de base balanceado, reside en el uso ocasional de conjuntos de base mixtos. Por ejemplo, en ocasiones se puede usar una base de calidad DZP para los átomos que están en la parte “interesante” de la molécula y una base mínima para los átomos “espectadores”, o la adición de funciones de polarización únicamente a los átomos de hidrógeno que están “cerca” de la parte reactiva del sistema. Para una

molécula de gran tamaño, esto permite un inmenso ahorro en el número de funciones de base. Sin embargo, puede acarrear la predisposición de resultados debido a artificios de cálculo. Un ejemplo claro de esto último lo podemos encontrar en la molécula de H_2 . Si realizamos un cálculo en el que se utilice una base mínima para uno de los H y DZ para el otro, se predecirá que el H_2 tiene momento dipolar, puesto que preferentemente los electrones se localizarán cerca del centro con el mayor número de funciones de base. Por tanto, la mayor parte de los cálculos de deben realizar utilizando funciones de base de la misma calidad en todos sus átomos y utilizando menos funciones de polarización y/o difusas en los átomos de hidrógeno. A pesar de eso, los conjuntos de funciones de base pequeños tienden a estar desbalanceados. Considérese, por ejemplo, la molécula de LiF, que tiene estructura iónica Li^+F^- y por tanto los electrones de valencia están localizados en el F. Aunque se utilice para los dos átomos un conjunto de base de la misma calidad, por ejemplo DZ, si hablamos en términos del número de funciones de base por electrón, el Li estará siendo mejor tratado que el F y, por tanto, el conjunto de base también va a estar desbalanceado. Por supuesto, este efecto disminuye a medida que se incrementa el tamaño del conjunto de base.

Excepto para sistemas muy pequeños no es posible saturar el conjunto de base puesto que el error absoluto en la energía normalmente va a ser mayor (1-2 Kcal/mol). El punto más importante es elegir un conjunto de base balanceado y mantener ese error lo más constante posible.

Una vez decidido el conjunto de base, la cuestión es ¿cómo son elegidos los valores numéricos de los exponentes de esas funciones? Los

de las funciones de tipo s y p se suelen determinar de un cálculo variacional HF, usando los exponentes como parámetros variacionales. Aquellos exponentes con los que se obtiene la menor energía son los “mejores” (al menos para el átomo). Los más conocidos fueron obtenidos por Huzinaga,⁶³ van Duijneveldt,⁶⁴ etc

- Contracción de Conjuntos de Base

Una desventaja que presentan todos los conjuntos de base obtenidos por optimización de energía es el hecho de que dependen ante todo de la función de onda en la región de los electrones de la capa interna. Los electrones-1s tienen un gran peso en la energía total y al minimizar la energía se tiende a hacer que el conjunto de base sea óptimo para los electrones del core, y menos óptimos para los de valencia. Sin embargo, la química depende principalmente de los electrones de valencia. Además, muchas propiedades, por ejemplo la polarizabilidad, dependen de la parte de la función de onda más alejada del núcleo, que es energéticamente menos importante. Un conjunto de base optimizado que de una buena descripción de la parte externa de la función de onda necesita ser muy grande, con muchas funciones de base que proporcionen una precisión comparable de la descripción de los electrones de valencia con la de los electrones de core. Pero esta no es la forma más eficiente para diseñar conjuntos de base que describan correctamente los electrones de la parte más externa del átomo. En lugar de eso, se suele aumentar el valor del exponente optimizado explícitamente con funciones difusas (*diffuse functions*), que son funciones de base con un exponente relativamente menor. Las funciones

difusas son necesarias siempre que estén presentes electrones pobremente enlazantes (por ejemplo en aniones o estados excitados) o cuando se estudia una propiedad que es dependiente de la “cola” de la función de onda (por ejemplo la polarizabilidad).

El hecho de que se inviertan muchas funciones de base para describir a los electrones de core, energéticamente importantes, pero que no lo son desde un punto de vista químico, es el fundamento de la contracción de las funciones de base (*contracted basis set*). Considérese por ejemplo un conjunto de base consistente en 10 funciones de tipo s (y algunas de tipo p) para el carbono. Habiendo optimizado esos 10 exponentes a través de un cálculo variacional en el átomo de carbono, quizás se encuentre que seis de las 10 funciones son usadas para describir el orbital-1s, y dos de las cuatro restantes para describir la parte interna del orbital-2s. Sin embargo la región más externa es la que tiene importancia química y sólo dos de las 10 funciones van a ser utilizadas para describir cualquier fenómeno de interés químico. Considerando que el coste computacional se ve incrementado a la cuarta potencia (o incluso más) con el número de funciones de base, esta solución resulta poco eficiente. Como los orbitales de core cambian poco aunque varíe dependiendo de la situación del enlace químico, la expansión de los coeficientes de los orbitales moleculares (MO) frente a estas funciones de base internas queda en gran medida inalterada. Por tanto, el mayor esfuerzo computacional se realiza en describir la parte menos interesante químicamente y que además se mantiene prácticamente constante. Por ello, se puede realizar el cálculo variacional de los coeficientes tratando las funciones de base internas como si fuesen constantes y, por consiguiente, sin que haya un gran

número de parámetros para ser determinados variacionalmente. De esta manera, en el caso del ejemplo, los orbitales-1s serían descritos por una combinación lineal fija de las seis funciones de base mencionadas. De forma similar, las cuatro funciones de base restantes se podrían contraer en sólo dos. Obrando así, el número de funciones de base se reduciría de las 10 originales a tres.

$$\chi(\text{CGTO}) = \sum_i^k a_i \chi_i(\text{PGTO}) \quad (3.59)$$

Cuando se combina un conjunto de funciones de base, conocidos como las funciones primitivas GTOs (*primitive GTOs, PGTOs*), resultando un conjunto de funciones de base más pequeño, formado por combinaciones lineales, con los coeficientes de la expansión fijos, se consigue un nuevo conjunto de base llamado GTOs contraído, (*contracted GTOs, CGTOs*).

La contracción es especialmente útil para orbitales que describen los electrones internos (de core) puesto que requieren un número relativamente grande de funciones para representar la cúspide de la función de onda cerca de los núcleos, y además, son en gran medida independientes del entorno. Contraer un conjunto de base siempre va a incrementar el valor de la energía puesto que se están restringiendo el número de parámetros variacionales, y por tanto, el conjunto de base es menos flexible, pero también se reduce el coste computacional significativamente. Hay que evaluar en cada situación, qué pérdida de precisión es aceptable comparando con el ahorro computacional.

El grado de contracción es el número de PGTOs que constituyen la CGTO. La especificación del conjunto de base en términos de funciones primitivas y contraídas se da a través de la siguiente notación

(10s4p1d/4s1p)→[3s2p1d/2s1p]. La base entre paréntesis indica el número de primitivas utilizadas para los átomos pesados (aquellos del primer periodo de la tabla periódica) antes de la barra, y tras ella, el número de primitivas utilizadas para los átomos de hidrógeno. La base escrita entre corchetes es el número de funciones de base contraídas. Es de señalar que en ningún caso se especifica como se ha realizado la contracción, sólo se indica el tamaño de la base final.

Hay dos tipos de formas de contraer un conjunto PGTOs en un conjunto CGTOs: realizar una contracción segmentada, o una contracción general.

Cronológicamente, la contracción segmentada fue la primera que se utilizó masivamente para los cálculos químico-cuánticos. En ella, un conjunto dado de PGTOs se divide en pequeños conjuntos de funciones denominados CGTO y se determina los coeficientes más apropiados. Por ejemplo 10s funciones de base pueden contraerse a 3s construyendo a partir de seis funciones de base internas una CGTO, las siguientes tres se pueden contraer como una segunda CGTO y la restante sería una tercera CGTO.

$$\begin{aligned}\chi_1(\text{CGTO}) &= \sum_{i=1}^6 a_i \chi_i(\text{PGTO}) \\ \chi_2(\text{CGTO}) &= \sum_{i=7}^9 a_i \chi_i(\text{PGTO}) \\ \chi_3(\text{CGTO}) &= \chi_{10}(\text{PGTO})\end{aligned}\tag{3.60}$$

En la contracción segmentada cada primitiva es utilizada sólo en una función contraída. En algunos casos puede ser necesario duplicar dos PGTOs en dos CGTOs adyacentes. Los coeficientes de la contracción pueden ser determinados por optimización variacional. Por el contrario,

en la contracción general todas las primitivas (de un átomo dado y de un momento angular determinado) contribuyen a todas las funciones contraídas del mismo momento angular, pero con coeficiente distinto.

$$\begin{aligned}\chi_1(\text{CGTO}) &= \sum_{i=1}^{10} a_i \chi_i(\text{PGTO}) \\ \chi_2(\text{CGTO}) &= \sum_{i=1}^{10} b_i \chi_i(\text{PGTO}) \\ \chi_3(\text{CGTO}) &= \sum_{i=1}^{10} c_i \chi_i(\text{PGTO})\end{aligned}\tag{3.61}$$

Un método popular de obtener los coeficientes de la contracción general es a partir de los Orbitales Atómicos Naturales (*Atomic Natural Orbitals, ANO*), como se explicará en los siguientes apartados.

La diferencia entre la contracción general y la segmentada se puede apreciar en la Figura 3.6.

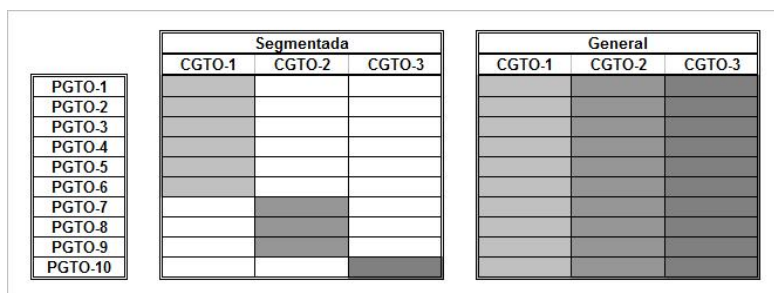


Figura 3.6. Contracción segmentada y general.

Hay muchos tipos diferentes de conjuntos de base contraídos disponibles en la literatura, los cuales están asequibles en las librerías de

los programas, de modo que el usuario sólo tiene que sólo se debe elegir el más apropiado para el cálculo correspondiente.

CONJUNTOS DE BASE CON CONTRACCIÓN SEGMENTADA

❖ CONJUNTOS DE BASE DE POPLE⁶⁰

- Conjuntos de base STO-nG: Se tratan de conjuntos de orbitales de tipo Slater formados a partir de n PGTOs.⁶¹ Es una base mínima en la que los exponentes de la PGTO han sido determinados ajustándose a la STO, en vez de optimizándolos por el procedimiento variacional. El valor de n puede estar comprendido entre 2 y 6, sin embargo se ha comprobado que usar más de tres PGTOs para representar la STO proporciona leves mejoras, y la base STO-3G es la base mínima generalmente más usada. Este tipo de base está disponible para muchos elementos de la tabla periódica. La designación de la base STO-3G para el carbono y el hidrógeno sería la siguiente: $(6s3p/3s) \rightarrow [2s1p/1s]$.
- Conjuntos de base k-nlmG: Este tipo de conjuntos de base fue diseñado por Pople y sus colaboradores, y es del tipo de doble zeta en la capa de valencia. La k indica cuantas PGTOs son utilizadas para representar cada orbital de core. La nlm tras el guión indican en cuantas funciones se han doblado los orbitales de valencia y cuantas PGTOs son usadas para su representación. Si sólo aparecen dos números (nl) significa

que es una base doble zeta de valencia, si aparecen tres números (nlm), entonces es una base triple para los orbitales de valencia. Los valores de estos números anteriores a la G (de Gaussian) indican las funciones de tipo s y de tipo p del conjunto de base. El uso de funciones de polarización se explicita detrás de la G. Este tipo de funciones de base tiene la restricción de que se usa el mismo exponente tanto para las funciones s como para las p en la valencia. Esto aumenta mucho la eficiencia computacional, pero disminuye la flexibilidad del conjunto de base. Los exponentes de la PGTOs son hallados por procedimientos variacionales. A este tipo de conjuntos de base pertenecen la 3-21G, la 6-31G y la 6-311G.

A cada uno de estos conjuntos de base se les pueden añadir funciones difusas⁶² y/o de polarización. Las funciones difusas suelen ser de tipo s o p, y por tanto, se especifica delante de la G, a través de los signos + o ++. Con el primer + se indica que se ha añadido un conjunto de difusas de tipo s y de tipo p en los átomos pesados. Con ++ se indica que se han incluido funciones difusas de tipo s también a los átomos de hidrógeno. Las funciones de polarización, al contrario, se especifican detrás de la G. Por ejemplo, la base 6-31G(d) es una base de tipo 6-31G a la que se le ha añadido un conjunto de funciones de polarización d para los átomos pesados. Una base 6-311++G(2df, 2pd) es una base 6-3111G, la cual se ha aumentado para los átomos pesados con funciones difusas de tipo sp, dos funciones de polarización de tipo d y dos de tipo

f, y para los átomos de hidrógeno difusas de tipo s y dos funciones p y d de polarización. Si se utiliza un único conjunto de funciones de base de polarización, se puede utilizar una notación alternativa: *. Con esta nomenclatura la base 6-31G(d) se escribiría 6-31G* y la 6-31G(d,p) como 6-31G**.

❖ CONJUNTOS DE BASE DE DUNNING-HUZINAGA⁶⁶

Huzinaga desarrolló conjuntos de base no contraídos optimizados hasta (10s6p) para los elementos del primer periodo de la tabla periódica.⁶³ Posteriormente, se amplió por Duijneveldt⁶⁴ hasta (14s9p) y por Patridge⁶⁵ hasta (18s13p). Dunning, usando las primitivas GTO de Huzinaga, desarrolló distintos esquemas de contracción dando lugar a las bases conocidas como de Dunning-Huzinaga (DH).⁶⁶ Una base DZ puede obtenerse por contracción de (9s5p/4s) PGTO a [4s2p/2s]. El esquema de contracción utilizado es 6,1,1,1 para las funciones s; 4, 1 para las p y 3,1 para los hidrógenos. Una base comúnmente empleada fue aquella en el que se contraen el mismo número de primitivas que en el ejemplo anterior, pero a [3s2p/2s] donde el esquema de contracción es 7,2,1. La base TZ también fue muy utilizada y se obtiene al contraer (10s6p/5s) a [5s3p/3s] siguiendo el esquema 5,3,1,1 para las funciones-s, 4,1,1 para las funciones-p y 3,1,1 para los hidrógenos. Las bases de Dunning-Huzinaga no tienen la restricción de las de Pople, en las cuales los exponentes de las funciones-s y las funciones-p son iguales, y por tanto, son más flexibles, aunque computacionalmente más caras.

Estas bases, cuyos coeficientes de contracción se optimizan sin correlación han caído en desuso.

❖ **CONJUNTOS DE BASE MINI, MIDI Y MAXI**

Tatewaki y Huzinaga optimizaron conjuntos de base para una gran parte del sistema periódico.⁶⁷ La base MINI-*i* (*i* = 1-4) es una base mínima con tres PGTOs para construir el orbital 2s CGTO, y en la que el número de PGTOs con los que se construyen los CGTOs de los orbitales 1s y 2p puede variar. En términos de PGTOs la base MINI-1 es (3s,3s,3p), MINI-2 (3s,3s,2p), MINI-3 (4s,3s,3p) y MINI-4 (4s,3s,4p). Las bases MINI, en general, son mejores que la STO-3G, pero siguen siendo conjuntos de base mínima. Las bases MIDI-*i* son exactamente iguales a las MINI, sólo que la valencia no está contraída. Los conjuntos de base MAXI-*i* emplean 4 funciones PGTOs para las 2s CGTOs y entre cinco y seis PGTOs para las CGTOs de tipo 1s y 2p. Los orbitales de valencia se multiplican en tres o cuatro funciones. MAXI-1 es (9s5p)→[4s3p] (con un esquema de contracción 5,2,1,1 y 3,1,1) y MAXI-3 es (10s6p)→[5s4p].

Del mismo modo que ocurría con las bases de Dunning-Huzinaga, estas bases han caído también en desuso.

❖ **CONJUNTOS DE BASE CONSISTENTES CON LA CORRELACIÓN, (cc).**

Los conjuntos de base consistentes con la correlación^{68,69} (*Correlation Basis Set*, cc) están adaptados para recuperar la energía de correlación de los electrones de valencia. Estas bases están diseñadas de

modo que las funciones que contribuyen en similar magnitud a la energía de correlación son incluidas en la misma etapa, independientemente del tipo de función de que se trate. Por ejemplo, la primera función-d proporciona un gran descenso en la energía, pero la contribución de la segunda función-d es similar a la de la primera función-f. El descenso en la energía que proporciona la tercera función-d es similar a la de la segunda función-f y a la de la primera función-g. La adición de funciones de polarización debería, por tanto, seguir el siguiente orden: 1d, 2d1f, 3d2f1g.

Están disponibles muchos conjuntos de bases de varios tamaños de bases cc en términos de funciones contraídas. Éstas son conocidas por sus acrónimos: cc-pVDZ, cc-pVTZ, cc-pVQZ, cc-pV5Z and cc-pV6Z (funciones cc con valencia doble/triple/cuádruple/quintuple/sextuple Zeta). Su composición, en términos de primitivas y funciones contraídas se puede ver en la Tabla 3.1. Subir un escalón en términos de calidad, incrementa en uno cada tipo de función de base y añade un nuevo tipo de funciones de polarización de orden superior.

También se pueden añadir funciones difusas adicionales, a través de una función extra con un exponente más pequeño para cada momento angular. Estas nuevas bases se nombrarán añadiendo el prefijo *aug-*.⁷⁰ Por ejemplo la base *aug-cc-pVDZ* sería una base *cc-pVDZ* a la que se le ha añadido una función-s, una p y una función d a los átomos no hidrogenoides. Cuando el interés reside en recuperar la correlación electrónica entre los electrones core-core y core-valencia, las bases cc se pueden incrementar añadiéndoles, de forma adicional, funciones “cola” (con un gran exponente). Estas bases se nombrarán con los acrónimos cc-pCVXZ (X = D, T, Q, 5). Las bases cc-pCVDZ tienen adicionalmente una

función de cola s y una p, las cc-pCVTZ tienen 2s2p1d funciones de cola, las cc-pCVQZ tienen 3s3p2d1f y las cc-pCV5Z 4s4p3d2f1g funciones de cola para los átomos no hidrogenoides.⁷¹

Tabla 3.1. Conjuntos de base consistentes con la correlación

Base	Funciones primitivas	Funciones contraídas
cc-pVDZ	9s,4p,1d/4s,1p	3s,2p,1d/2s,1p
cc-pVTZ	10s,5p,2d,1f/5s,2p,1d	4s,3p,2d,1f/3s,2p,1d
cc-pVQZ	12s,6p,3d,2f,1g/6s,3p,2d,1f	5s,4p,3d,2f,1g/4s3p,2s,1f
cc-pV5Z	14s,9p,4d,3f,2g,1h/8s,4p,3d,2f,1g	6s,5p,4d,3f,2g,1h/5s,4p,3d,2f,1g
cc-pV6Z	16s,10p,5d,4f,3g,2h,1f/10s,5p,4d,3f,2g,1h	7s,6p,5d,4f,3g,2h,1f/6s,5p,4d,3f,2g,1h

Al igual que ocurría con los conjuntos de base ANO, los cc tienen capacidad para generar secuencias de bases convergidas hacia el límite del conjunto de base (*basis set limit*). Por ejemplo, en la serie de cálculos con los siguientes conjuntos de base: 3-21G, 6-31G(d,p), 6-311G(2d,2p) y 6-311++G(3df,3pd) no puede ser obvio si una propiedad está convergida con respecto a un mayor conjunto de base, y es difícil estimar cual debería ser el límite del conjunto de base. Esto es parcialmente debido a que se utilizan diferentes PGTOs en cada uno de los segmentos en los que se divide la base, a diferencia de lo que ocurre con las base ANO que es de contracción general, lo que permite una estimación del valor límite del conjunto de base.

Por otra parte, las base cc, aunque de contracción segmentada, son capaces de recuperar la energía de correlación de forma similar a las ANO. El error disminuye (tanto el HF como el de la correlación) para cada paso sucesivo en el que aumenta la calidad de la base. A través de

diversos calibrados, se ha encontrado que la base cc-pVDZ proporciona alrededor del 65% de la energía de correlación, el cc-pCVTZ el 85%, cc-pCVQZ el 93%, cc-pCV5Z del 96% y cc-pCV6Z del 98% con reducción similar para el error HF. Dada esta naturaleza sistemática de las bases cc, varios esquemas han sido propuestos para extrapolar el límite del conjunto de base en el infinito.^{72, 73, 74}

La principal dificultad en el uso del conjunto de base cc es que cada paso en el que se aumenta la calidad de la base, el número de funciones crece al cubo de la función de mayor momento angular, y para poder aplicar un modelo de extrapolación es necesario al menos tres cálculos en los que se vaya aumentando sucesivamente el conjunto de base, y cc-pCVDZ es demasiado pequeño como para dar un buen valor extrapolado, lo cual limita mucho el tamaño de los sistemas que pueden ser tratados por estos conjuntos de base.

CONJUNTOS DE BASE CON CONTRACCIÓN GENERAL

❖ **CONJUNTOS DE BASE DE ORBITALES ÁTOMICOS NATURALES (ATOMIC NATURAL ORBITALS, ANO)**

En este caso las funciones de base son *orbitales atómicos naturales* (ANO) generados a partir de cálculos atómicos correlacionados.⁷⁵ Los *orbitales naturales* son aquellos que diagonalizan la matriz de densidad. Sus valores propios son los números de ocupación orbital, que representan el número de electrones que ocupa ese orbital. Para generar este tipo de conjuntos de base se sigue la siguiente estrategia: en primer lugar se realiza un cálculo HF para el sistema atómico con un conjunto

dado de PGTOs del que se obtienen un conjunto de orbitales canónicos ocupados, así como un conjunto de orbitales canónicos virtuales. Los orbitales ocupados se reservan, pero los virtuales se descartan. El siguiente paso es llevar a cabo un cálculo atómico correlacionado y proceder a la diagonalización de la parte virtual de la matriz de densidad mono-electrónica resultante. El conjunto de base se obtiene seleccionando los orbitales naturales virtuales con mayor número de ocupación. La idea es, que puesto que los ANOs son las funciones que describen óptimamente la correlación en el problema atómico, también serán útiles para describir la correlación electrónica molecular. Para cada simetría atómica (s,p,d,...) cada CGTO es una combinación lineal de todas las PGTO (contracción general), es decir, cada primitiva participa en todas las funciones contraídas.

Una ventaja de este tipo de conjunto de base es que con el esquema ANO surge el concepto de secuencia de conjuntos de base, en la cual cada base deriva de la previa por la adición del próximo orbital atómico natural más importante (con mayor número de ocupación). Esto permite una mejora sistemática de los conjuntos de base y, consecuentemente, la eliminación de posibles errores espurios que pueden surgir de una elección desbalanceada de las funciones de base. Los ANOs proporcionan un criterio natural para seleccionar funciones de base de diferentes simetrías y para aumentar el conjunto orbital basándose en la contribución que cada orbital tiene a la densidad mono-electrónica total. Por ejemplo, para los átomos del primer periodo, el examen de los números de ocupación correspondiente señala: [3s2p1d], [4s3p2d1f] y [5s4p3d2f1g] como buenas elecciones de conjuntos de base contraídos, mientras que un conjunto tal como [5s3p2d2f2g] estaría

desbalanceado y sería ineficiente para cubrir los efectos de la correlación electrónica.

Sin embargo, este tipo de conjuntos de base también presenta algunas deficiencias y limitaciones. Para empezar, puesto que el conjunto de ANOs más pequeño está construido a partir de un gran número de PGTOs, su utilización resulta cara desde un punto de vista computacional. Por otra parte, los ANOs están fuertemente predispuestos para reproducir las energías de los sistemas atómicos no perturbados, y por tanto no proporcionan tanta flexibilidad en la región de valencia, como sería deseable en cálculos moleculares de alta precisión de propiedades moleculares que dependen de la descripción de la región más externa de la valencia, como es el cálculo de polarizabilidades eléctricas. Otro tipo de cálculo que presenta un problema para los conjuntos de base ANO es aquel en el que se ven involucrados diferentes tipos de estados atómicos, como en el caso de los metales de transición, donde los estados atómicos d^{ns^2} , $d^{n+1}s^1$ y d^{n+2} a menudo tienen significantes contribuciones a la situación molecular. Las bases ANO son drásticamente diferentes en cada estado, en particular para los orbitales d , los cuales son mucho más difusos en d^{n+2} que en d^n , por tanto el uso de un conjunto de base ANO derivado de un particular estado atómico puede introducir tendencias no deseables en ese estado. Una solución parcial, la cual hemos adoptado en la presente Tesis Doctoral, es seleccionar funciones que sean funciones propias de las suma de las matrices de densidad de cada estado.^{76,77,78}

Las bases ANO recuperan la energía de correlación mucho mejor que el resto de bases, es decir, se obtiene un resultado similar con más funciones en las bases de ANOs que en las otras.

- Problema de la dependencia lineal
de las funciones de base

Un aspecto que requiere especial atención cuando se utilizan conjuntos de base con un gran número de funciones, principalmente en aquellas que incluyen funciones difusas, es que una (o varias) de esas funciones pueda ser descrita como una combinación lineal de las otras. Entonces existe una dependencia lineal, y se dice que la base está sobrecompleta. Una forma de evaluar el grado de dependencia lineal de un conjunto de base consiste en la obtención de los valores propios de la matriz de solapamiento **S**.

$$\begin{aligned} \mathbf{FC} &= \mathbf{SC}\varepsilon \\ F_{\alpha\beta} &= \langle \chi_\alpha | \mathbf{F} | \chi_\beta \rangle \\ S_{\alpha\beta} &= \langle \chi_\alpha | \chi_\beta \rangle \end{aligned} \quad (3.62)$$

Una base que presente dependencia lineal tendrá al menos un valor propio de cero y el valor más pequeño de la matriz **S** será un buen indicador de lo cerca que está el conjunto de base utilizado de la dependencia lineal. La solución de la ecuación SCF requiere ortogonalización de la base, por ejemplo, mediante la matriz **S**^{-1/2}. Si uno de los valores propios de la matriz **S** está cercano a cero esto significa que la matriz **S**^{-1/2} es esencialmente singular, lo cual derivará en problemas numéricos al intentar llevar a cabo un cálculo. En la práctica hay, por tanto, un límite superior sobre la completitud real de una base, y este límite determina la precisión de los cálculos realizados en dicha base.

- **Error de Superposición de Base**
(Basis Set Superposition Error, BSSE)

A menudo, cuando se realizan cálculos de estructura electrónica, se está interesado en evaluar la energía de interacción (de enlace) de complejos moleculares. Para dos fragmentos A y B, la energía de interacción del complejo AB viene dado por:

$$\Delta E_{AB} = E_{AB} - E_A - E_B \quad (3.63)$$

donde E_A y E_B son las energías de los fragmentos y E_{AB} la energía del complejo. Para una descripción balanceada de los fragmentos y del complejo, la energía de interacción debe ser calculada por métodos "size-extensive". Sin embargo aún así existe un segundo problema en el cálculo de las energías de interacción cuando se usa un conjunto de base finito: el error de superposición de base.

La energía de interacción de la ecuación (3.63) se podría calcular a partir de la energía de cada fragmento, E_A y E_B , con su propia base y la energía E_{AB} con la combinación de las bases de los dos fragmentos. Pero como consecuencia de realizar este procedimiento con conjuntos de base finitos, se introduce un error sistemático en la energía de interacción.

Este error es debido a que la energía de un fragmento individual en la presencia de las bases de otro fragmento, será menor que su energía calculada solamente con su propia base. La energía de interacción calculada contendrá, además de la "pura" energía de interacción, una contribución espuria de atracción debida a la mejor descripción de los fragmentos en la combinación de bases y no debida a una verdadera interacción física entre los fragmentos. Esta contribución atractiva en la energía de interacción entre los fragmentos, la cual se presenta aún en

ausencia de una interacción genuina entre los mismos, es lo que se conoce como error de superposición de base.

El BSSE se deriva de la mejor descripción de cada fragmento en presencia de la base del otro fragmento. Una estrategia para solucionar este problema, sugerida por Boys and Bernardi⁷⁹ es realizar todos los cálculos, tanto los de los fragmentos como los del complejo, con la misma combinación de conjuntos de base. Esto es, en el cálculo del fragmento A, la presencia de la base fantasma (*ghost basis*) del fragmento B sirve para contrabalancear el efecto que la base de B tiene sobre el fragmento A en el cálculo del complejo AB. La energía de interacción calculada de este modo es conocida como “*Counterpoised-corrected interaction energy*”:

$$\Delta E_{AB}^{CP} = E_{AB} - E_A^{CP} - E_B^{CP} \quad (3.64)$$

Aquí ΔE_A^{CP} es la energía corregida del fragmento A calculada con la totalidad de la base del complejo AB (esto es, incluyendo las funciones fantasma localizadas en el sistema B), y similarmente para ΔE_B^{CP} . La corrección counterpoise para la energía de interacción, para una geometría dada, resulta ser:

$$\Delta E_{corr}^{CP} = \Delta E_{AB}^{CP} - \Delta E_{AB} \quad (3.65)$$

donde ΔE_{AB}^{CP} es calculada de acuerdo con la ecuación (3.64) y ΔE_{AB} con la (3.63) Insertando la (3.63) y la (3.64) en la (3.65) la corrección counterpoise quedaría expresada como:

$$\Delta E_{AB}^{corr} = (E_A - E_A^{CP}) + (E_B - E_B^{CP}) \quad (3.66)$$

Para funciones de base de carácter variacional, el error de superposición de base será siempre positivo, puesto que $E_A > E_A^{CP}$ y E_B

> E_B^{CP} . Para funciones no variacionales la corrección no es positiva por principio, pero cabe esperar que lo sea. Por supuesto, en el límite de una base completa, no existiría el error de superposición de base.

3.4. TRATAMIENTO DEL ENTORNO

3.4.1. Tratamiento Continuo del Solvente: PCM

En muchas ocasiones el medio de reacción juega un papel importante en los sistemas moleculares, ya que puede afectar a su estructura electrónica y molecular y, consecuentemente, a la reactividad del compuesto químico. Por tanto, se hace imprescindible considerar, las interacciones que el sistema molecular tenga con el solvente cuando se estudian sistemas electrónicos de transferencia de carga, que son los más susceptibles de ser alterados por efecto de un disolvente polar.

Existen distintos modelos de solvatación. Sin embargo, nos vamos a centrar únicamente en aquellos que tratan de un modo continuo el solvente. En los modelos continuos de solvatación el disolvente está caracterizado como un medio continuo sin estructura que se polariza por efecto del soluto, sobre el cual provoca una respuesta electrostática que afecta a su energía, estructura y propiedades. Un modelo de solvatación de este tipo es el PCM (*Polarizable Continuum Model*)^{80, 81} donde el solvente es tratado como un dieléctrico continuo infinito, mientras que el soluto se localiza en una cavidad molecular obtenida en términos de esferas entrelazadas localizadas alrededor de

cada átomo del soluto. Este procedimiento garantiza que la cavidad mantenga la forma real de la molécula. Dentro dicha la cavidad, el campo de reacción se describe utilizando unas cargas aparentes (cargas de solvatación) que se extienden sobre la superficie de la cavidad de modo que reproducen el potencial electrostático debido a la polarización del dieléctrico. Las cargas se usan para calcular las interacciones soluto-solvente, modificando la energía total del soluto y perturban el Hamiltoniano molecular mediante un operador. Si el cálculo PCM se combina con la metodología CASSCF, el campo de reacción sería inicialmente calculado de un modo multiconfiguracional autoconsistente a nivel CASSCF, con lo que se obtendría de esta forma la contribución electrostática soluto-solvente. La función de onda perturbada por el campo de reacción para un estado específico CASSCF se puede usar después para calcular cualquier propiedad electrónica en solución, y ser añadida al correspondiente Hamiltoniano monoeléctrico, por ejemplo, para realizar un cálculo CASPT2/PCM.

Este modelo tiene también en cuenta el carácter de no-equilibrio del estado excitado solvatado. Para ello, en el cálculo del campo de reacción del estado excitado se hace una separación entre la parte óptica y la parte inercial teniendo en consideración la dependencia con el tiempo de la reorganización de la carga electrónica en el momento de la excitación, en la cual sólo la polarización electrónica del solvente está en equilibrio con la densidad electrónica del estado excitado del soluto. En el modelo, el régimen de no-equilibrio utiliza el formalismo de la constante dieléctrica en la frecuencia óptica, relativa al cuadrado del índice de refracción del solvente n^2 , que por ejemplo, para el agua es 1.776. En el régimen de equilibrio los grados de libertad nucleares

también están equilibrados con la densidad electrónica del estado excitado y entonces se emplea la constante dieléctrica del agua (78.39). La absorción del estado fundamental (estado inicial) se calcula usando el campo de reacción completo, mientras que para el estado excitado (estado final) se divide entre la parte óptica, calculada explícitamente para un estado específico, e incorpora la parte inercial a partir del cálculo del estado fundamental. Para el estudio de un proceso de emisión se procede de forma análoga, teniendo en cuenta que los estados inicial y final antedichos corresponden al estado excitado y fundamental, respectivamente.

3.4.2. Métodos híbridos: QM/MM[†]

A pesar de la creciente capacidad computacional disponible, en la actualidad no se pueden tratar sistemas con un gran número de átomos (enzimas, o proteínas en general) utilizando la mecánica cuántica (QM), que queda limitada a sistemas relativamente pequeños, de algunas decenas o pocas centenas de átomos, dependiendo del nivel de teoría empleado. La simulación de sistemas complejos de gran tamaño sigue siendo un desafío para la química computacional. Sin embargo, el interés por modelar los sistemas biológicos de modo que se pueda comprender y racionalizar detalladamente su reactividad química es cada vez mayor. Está claro que no se pueden utilizar

[†] Este apartado está basado fundamentalmente en las referencias Sherwood, P. (2000) y Lin, H. (2007).

métodos basados fundamentalmente en la mecánica clásica, como por ejemplo los métodos de mecánica molecular (MM), donde los campos de fuerzas están basados en diferentes tipos de potenciales, como por ejemplo potenciales empíricos, pequeñas amplitudes de vibración, torsión, interacciones de Van der Waals, e interacciones electroestáticas, que si bien han sido muy usadas en simulaciones de dinámica molecular (*Molecular Dynamics*, MD) en sistemas orgánicos y biológicos de gran tamaño, son, sin embargo, incapaces de describir los cambios en la estructura electrónica, o los fenómenos de naturaleza puramente cuántica que tienen lugar en una reacción química. Cada cambio en la estructura electrónica que se da en procesos que involucran la formación y ruptura de enlaces, la transferencia de carga y/o excitación electrónica requiere de la QM para un tratamiento adecuado. Con el fin de encontrar una solución a este problema se ha desarrollado una metodología híbrida que hace uso simultáneamente de la mecánica cuántica y la mecánica molecular. Estos algoritmos combinan, en principio, la precisión de la mecánica cuántica con el bajo coste computacional de la mecánica molecular y se han popularizado considerablemente en las últimas décadas.

La metodología que combina la mecánica cuántica y la mecánica molecular se conoce con el nombre de QM/MM.^{82,83} Esta metodología trata una región localizada (como por ejemplo, el sitio activo o un cromóforo y sus residuos vecinos de una enzima o proteína) con metodología QM e incluye la influencia del entorno (el entorno proteico) a nivel MM (ver Figura 3.7).

De entre los diferentes esquemas propuestos para el cálculo de la energía total, se suele determinar ésta como la suma de la energía QM, más la energía MM, más la energía de interacción entre ambas.

$$E_{\text{Tot}} = E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM/MM}} \quad (3.67)$$

El subsistema QM en general se describe mediante un Hamiltoniano del tipo del de la ecuación (3.8). La subsistema MM, que contendrá el resto de átomos del sistema, será descrita clásicamente y sus interacciones se determinarán mediante funciones de energía potencial empíricas (por tanto no podrá estar implicada en procesos de formación y/o ruptura de enlaces, ni de transferencia de carga).

La inclusión de la interacción entre el subsistema QM y el MM permite una descripción más realista en comparación con los cálculos en sistemas aislados QM. La determinación del acoplamiento entre las dos regiones constituye uno de los puntos centrales de la metodología QM/MM y es hoy en día una activa línea de investigación.

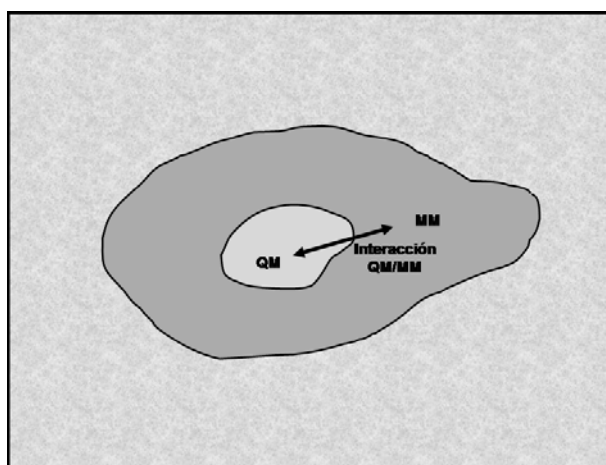


Figura 3.7. Esquema de la división de un sistema molecular en la zona QM y MM, es decir, los dos subsistemas presentes en el modelo más simple de la metodología QM/MM.

- **Interacción entre los subsistemas QM Y MM**

Según el tipo de tratamiento usado para la descripción de la interacción entre subsistemas, los métodos QM/MM se pueden dividir en tres grupos:⁸⁴

A) El esquema de Inmersión Mecánica (*Mechanical Embedding*, ME):

El cálculo QM se realiza esencialmente en fase gas, sin acoplamiento electrostático con el entorno. La interacción electrostática entre las partes QM y MM o bien se omite, o se trata a nivel MM, usando el modelo clásico de cargas puntuales para la distribución QM. Al tratar la interacción entre subsistemas a nivel MM se simplifica el proceso. Este tipo de esquema presenta fundamentalmente dos desventajas. Por una parte se necesita un conjunto preciso de cargas puntuales para los átomos de ambas regiones. Conseguir parámetros para la parte MM es relativamente fácil, pero para la parte QM donde la reacción está teniendo lugar no es sencillo, puesto que la distribución de cargas va a ir cambiando conforme el proceso químico tenga lugar. Además, puesto que en este esquema se ignora el potencial de perturbación debido a la interacción electrostática entre los subsistemas, no tiene en cuenta que la densidad de carga de la parte QM, debido a la distribución de cargas puntuales centradas en los átomos en la parte MM, se verá polarizada y alterará su distribución de cargas.

- B) El esquema de Inmersión Electroestática (*Electrostatic Embedding*, EE): La parte clásica se describe como una distribución continua de carga (por ejemplo como un conjunto de cargas puntuales) que interactúan con la densidad de carga de la región QM. Por tanto la polarización de la parte QM por la distribución de cargas MM se tiene en cuenta en el cálculo de la estructura electrónica QM. Las cargas parciales usadas para describir la distribución MM suelen ser aquellas que se usan en el campo de fuerzas (*forcefield*).^{85,86,87} El esquema EE no requiere de los parámetros electrostáticos MM para los átomos de la parte QM puesto que la interacción electrostática entre QM y MM se trata a un nivel más avanzado incluyendo ciertos términos de acoplamiento monoeléctricos en el Hamiltoniano QM.
- C) El esquema de Inmersión Polarizada (*Polarised Embedding*, PE): Se incluye la polarización de la región MM en respuesta a la distribución de cargas QM. Requiere de un campo de fuerzas MM polarizable que tenga la flexibilidad suficiente para responder a una perturbación producida por un campo eléctrico externo.

- **Átomos frontera**

Para muchos sistemas la división en la parte QM y la MM se realizará, de forma inevitable, a través de un enlace covalente (ver Figura 3.8). Se “romperá” ese enlace que une ambos subsistemas, y habrá que recurrir a algún tipo de aproximación que permita satisfacer las valencias de los átomos cuánticos que definen el enlace entre la

región cuántica y la región clásica por donde se producirá la división. Este es un problema para el que aún no existe una solución satisfactoria. A pesar de esto, se han propuesto diferentes esquemas para mitigar los problemas ocasionados por el cambio abrupto del nivel de descripción en las regiones frontera, Las más comúnmente usadas son:

- Átomo de Unión (*Link Atom*).

Este método es quizás el más utilizado y consiste en la saturación de la valencia del átomo QM involucrado en el corte empleando un átomo de unión, es decir, se introduce un átomo que no está presente en el sistema molecular original. El átomo más empleado es el de hidrógeno (HL). Este átomo se trata mediante la metodología QM y no es tenida en cuenta por la MM. El problema de la introducción de un nuevo átomo, que no está presente inicialmente, es que hace más complicada la definición de la energía QM/MM, y también la utilización de la geometría molecular inicial. Además, la polarización del enlace entre el átomo frontera QM y el átomo de unión es ficticia debido a la cercanía de la carga puntual del átomo frontera MM (el átomo al cuál está enlazado el átomo frontera de la parte QM). Este problema, conocido como sobrepolarización de la frontera, y para el que se han propuesto diferentes soluciones que mitiguen los efectos de esta interacción espuria, como se detallará más adelante. La distancia entre el átomo de unión y el átomo frontera MM suele ser de aproximadamente 0.5 Å en el caso de cortar un enlace C-C, y problemas similares cabe esperar en otros enlaces.

Puesto que el átomo de unión, por definición, no está presente, ni en la parte original QM, ni en la MM, la introducción de sus coordenadas genera grados de libertad adicionales lo que causa ambigüedad en la definición de la energía QM/MM del sistema. Una forma de evitar este problema es hacer las coordenadas del átomo link dependientes de las coordenadas del átomo frontera QM y del átomo de contorno MM, esto es, los átomos Q1 y M1 (ver Figura 3.8). Esta restricción elimina los grados de libertad extra debidos a la introducción del átomo de unión. Normalmente, este átomo estará situado en la línea que conecta los correspondientes átomos Q1 y M1. La distancia $R(Q1-HL)$ puede ser escalada respecto a la distancia $R(Q1-M1)$ a través de un factor de escala C_{HL} :

$$R(Q1-HL) = C_{HL} R(Q1-M1) \quad (3.68)$$

Durante la optimización de geometría QM/MM las distancias de equilibrio $R(Q1-HL)$ y $R(Q1-M1)$ tendrán la restricción de satisfacer (3.68). El factor de escala C_{HL} depende de la naturaleza de los enlaces que están siendo rotos y construidos. Se ha sugerido que la longitud de enlace promedio estándar entre Q1-HL y Q1-M1 es de aproximadamente 0.71 para el caso de remplazar enlaces simples C-C por enlaces C-H.⁸⁸

La sobrepolarización del enlace Q1-HL debido a la proximidad de la carga puntual M1 también se ha intentado minimizar. La forma más simple de evitar este problema es ignorar la carga M1 haciéndola cero.⁸⁹ Este método se llama esquema Z1. Si además de hacer la carga de M1 se hace la de M2 se llamará Z2. Estos esquemas que eliminan o

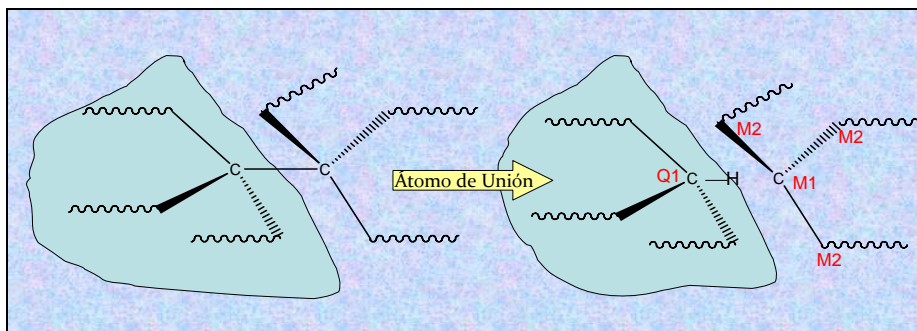


Figura 3.8. Representación esquemática de la división de un sistema molecular en subsistemas en los métodos QM/MM cuando la frontera corta un enlace covalente y se utiliza la aproximación el átomo de enlace. El átomo frontera MM se denominará M1. Aquellos átomos MM directamente enlazados a M1 se denominarán M2 (y similarmente se puede definir como M3 aquellos átomos MM enlazados a los átomos M2, etc...). El átomo QM que está directamente conectado a M1 se llamará Q1, y de modo similar a como se definió en MM se definirán los átomos Q2 y Q3 en el subsistema QM. Al átomo de enlace se le denominará HL para enfatizar que generalmente es preferido un átomo de hidrógeno.

escalan las cargas MM, tienen el problema de que cambian la carga neta de la parte MM y esto puede generar artefactos en los cálculos de energía.

Una posible mejora de estos esquemas consiste en borrar las cargas atómicas del grupo entero que contiene al átomo M1. De este modo se asegura que la carga neta de MM no cambie. Sin embargo la mejor metodología, quizás, ha resultado ser aquella en la que se produce una redistribución de carga, según el cual la carga M1 es repartida entre los átomos M2 que están conectados a M1. Con objeto de compensar la modificación del dipolo M1-M2 debido a este movimiento, se sitúan un par adicional de cargas puntuales en la proximidad del átomo M2.

- Método de Orbitales Locales

Este método ofrece una descripción de los enlaces QM/MM frontera utilizando orbitales de enlace localizados. La deslocalización de cargas que representa estos orbitales ayuda a prevenir la sobrepolarización mencionada para el método del átomo de unión. Sin embargo, el método del orbital local es mucho más complejo y se necesita un trabajo adicional para obtener representaciones precisas de los orbitales locales antes de comenzar con el cálculo QM/MM. Estos orbitales se mantienen congelados y se excluyen del cálculo QM. Están definidos por sus coeficientes de hibridación y por su población electrónica, parámetros que se determinan mediante cálculos QM sobre sistemas pequeños y que se suponen transferibles al sistema de interés.

Tanto la aproximación del átomo de unión como el método de orbitales locales han sido extensivamente usados, dando resultados razonablemente buenos si son empleados correctamente. En general, se recomienda que la partición entre el sistema QM y MM esté lo más alejada posible de los átomos implicados directamente en el proceso químico. De esta forma los resultados finales no dependen drásticamente del tratamiento usado en la descripción de la frontera de las aproximaciones utilizadas.

References

- Levine, I. N. "Química Cuántica" Ed 5; Pearson Educación: Madrid, 2001.
- Szabo, A.; Ostlund, N. S.; In "Modern Quantum Chemistry", McGraw-Hill, 1982.
- Jensen, F. In "Introduction to Computational Chemistry", Wiley & Sons Ed: Baffins Lane, 1999.
- Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Olsen, J. In "Molecular Electronic-Structure Theory". Wiley Ed: Baffins Lane, 2000.
- Sherwood, P. In "Modern Methods and Algorithms of Quantum Chemistry, Proceedings" Grotendorst, J. Ed. 2000, 285-305
- Lin, H.; Truhlar, D. G. "QM/MM What we have learned, where are we, and do we go from here?". In *Theoretical Chemistry Accounts*, 2007, 117 (2), 185.

¹ Planck, M. *Annalen der Physik*. 1900, (1) 4, 719-37.

² Planck, M. *Annalen der Physik*. 1901, 4, 553.

³ Young, T. "On the theory of light and colours" (The 1801 Bakerian Lecture) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1802, 92, 12-48.

⁴ Young, T. "Experiments and calculations relative to physical optics" (The 1803 Bakerian Lecture) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1804, 94 1-16.

⁵ Maxwell, J. C. "On Physical Lines of Force"; In *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*; Taylor and Francis Ed: London, 1861, Vol XXI, pp. 161-75; 281-91; 338-48.

⁶ Maxwell, J. C. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 1865, 155, 459-512.

- ⁷ Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1887**, 31, 421–448, 543–544. Also Hertz, H. (1892) “*Untersuchungen ueber die Ausbreitung der Elektrischen Kraft*”; Barth J. A. Ed: Leipzig. **1892**, pp. 32–58. English title: “*On very rapid electrical oscillations*”, in Hertz, H. “*Electric Waves Being Researches on the Propagation of Electric Action with Finite Velocity through Space*”; Macmillan and Company Ed; London. 1893, pp. 29–53.
- ⁸ Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1888**, 34, 551–569. Also *Untersuchungen*, pp. 115–132; “*On the finite velocity of propagation of electromagnetic actions*” In *Electric Waves*, pp. 107–123.
- ⁹ Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1888**, 34, 609–623. Also *Untersuchungen*, pp. 133–146; “*On electrodynamic waves in air and their Reflection*”. In *Electric Waves*, pp. 124–136.
- ¹⁰ Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1889**, 37, 395–408. Also *Untersuchungen*, pp. 171–183; “*On the propagation of electric waves by means of wires*”. In *Electric waves*, pp. 160–171.
- ¹¹ Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1889**, 36, 769–783. Also *Untersuchungen*, pp. 184–198; “*On electric radiation*”, *Electric waves*, pp. 172–185.
- ¹² Hertz, H. *Wiedemanns Annalen*, **1889**, 36, 1–22. Also *Untersuchungen*, pp. 147–170; “*The forces of electric oscillations, treated according to Maxwell’s theory*”. In *Electric Waves*, pp. 137–159.
- ¹³ Einstein, A. *Ann. Physik*, **1905**, 17, 132.
- ¹⁴ Arons, A. B.; Peppard, M. B. *American Journal of Physics*, **1965**, 33 (5), 367.
- ¹⁵ Chadwick, J. *Nature*, **1932**, 129, 312
- ¹⁶ Chadwick, J. *Proc. Roy. Soc. A*, **1932**, 136, 692–708.
- ¹⁷ Rutherford, E. *Phil. Mag*, **1911**, 21, 669–688.
- ¹⁸ Geiger, H.; Marsden, E. *Phil. Mag*, 1913, 25 (148), 604–623.
- ¹⁹ Thomson, J.J. *Phil. Mag*, **1904**, 7 (39), 237–265.
- ²⁰ Bohr, N. *Phil. Mag*, **1913**, 26, 1–25.

- ²¹ Broglie de L. *Nature*, **1923**, 112, 540.
- ²² Broglie de, L. *Phil. Mag*, **1924**, 47, 446.
- ²³ Einstein, A. *Ann. Physik*, **1905**, 17, 891.
- ²⁴ Davisson, C.; Germer, L. H. *Phys. Rev*, **1927**, 30 (6), 634-638.
- ²⁵ Estermann, I.; Stern, O. *Z. Phys*, **1930**, 61, 95.
- ²⁶ Heisenberg, W. *Z. Phys.* 1927, **43**, 172; In: "*Quantum Theory and Measurement*"; Wheeler, J.A.; Zurek, W.H. Eds: Princeton Univ. Press: Princeton, **1983**, pp. 62-84.
- ²⁷ Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 79, 361-76.
- ²⁸ Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 79, 489-527.
- ²⁹ Schrödinger, E. *Die Naturwissenschaften*. **1926**, 14 (28), 664-666.
- ³⁰ Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 79, 734-56.
- ³¹ Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 80, 437-90.
- ³² Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 81, 109-39.
- ³³ Heisenberg, W. *Z. Physik*, **1925**, 33, 879-893.
- ³⁴ Madrid Casado, C. M. *Lat. Am. J. Phys. Educ.* **2008**, 2 (2), 152-155.
- ³⁵ Dirac, P. A. M. "*The Principles of Quantum Mechanics*" Ed 3; Clarendon Press Ed: Oxford, **1947**.
- ³⁶ Jordan, P. *ZS. f. Phys.*, **1926**, 38, 513.
- ³⁷ Feynman, R. P. *Phys. Rev.*, **1948**, 74, 939 - 946.
- ³⁸ Born, M.; Oppenheimer, R. *Annalen der Physik*, **1927**, 84, 457-484.
- ³⁹ Hartree, D. R. *Proc. Cambridge Philos. Soc.*, **1928**, 24, 328.
- ⁴⁰ Fock, V. A. *Z. Phys.*, **1930**, 15, 126.

- ⁴¹ A. Meckler, *J. Chem. Phys.*, 1953, 21, 1750.
- ⁴² Andersson, K.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O.; Sadlej, A. J.; Wolinski, K. *J. Phys. Chem.* **1990**, 94, 5483.
- ⁴³ Andersson, K.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 1218.
- ⁴⁴ Werner, H. J. In “*Ab initio methods in Quantum Chemistry-II*”; Lawley, K. P. Ed, John Wiley & Sons Ltd.: New York, *Advances in Chemical Physics*, **1987**, 69, 1.
- ⁴⁵ Shepard, R. In “*Ab initio methods in Quantum Chemistry-II*”, Lawley, K. P. Ed, John Wiley & Sons Ltd.: New York, *Advances in Chemical Physics*, **1987**, 69, 63.
- ⁴⁶ Roos, B. O. In “*Ab initio methods in Quantum Chemistry-II*”, Lawley, K. P. Ed, John Wiley & Sons Ltd.: New York, *Advances in Chemical Physics*, **1987**, 69, 399.
- ⁴⁷ Olsen, J.; Roos, B. O.; Jorgensen, P.; Jensen, J. H. A. *J. Chem. Phys.* **1998**, 89, 2185.
- ⁴⁸ Moller, C.; Plesset, M. S. *Phys. Rev.*, **1934**, 46, 618.
- ⁴⁹ Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülsher, M. P.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M.; Molina, V. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1996**, 388, 257.
- ⁵⁰ Roos, B. O.; Andersson, K. *Chem. Phys. Lett.*, 1995, 245, 215.
- ⁵¹ Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülsher, M. P.; Malmqvist, P.-A.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. In “*Advances in Chemical Physics: New Methods in Computational Quantum Mechanics*”, Vol. XCIII: 219. ed. Prigogine y S.A. Rice, Wiley, New York, **1996**.
- ⁵² Forsberg, N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 274, 196.
- ⁵³ Ghigo, G.; Roos, B. O.; Malmqvist, P.-A. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 396, 142.
- ⁵⁴ Finley, J.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* 1998, 288, 299.
- ⁵⁵ Bartlett, R. J. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93, 1697.
- ⁵⁶ Hohenberg, P.; Kohn, W. *Phys. Rev.*, **1964**, 136, B864.

- ⁵⁷ Feller, D.; Davidson, E. R. *Rev. Comput Chem.*, **1990**, 1, 1.
- ⁵⁸ Slater, J. C. *Phys. Rev.*, **1930**, 36, 57.
- ⁵⁹ Boys, S. F. *Proc. R. Soc. (London) A*, **1950**, 200, 542.
- ⁶⁰ Pople, J.A. In: *Molecular Orbital Methods in Organic Chemistry. Accounts Chem. Res.*, 1970, 3, 217.
- ⁶¹ Hehre, W. J.; Stewart, R. F.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.*, **1969**, 51, 2657.
- ⁶² Frisch, M. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S. *J. Chem. Phys.*, **1984**, 80, 3265.
- ⁶³ Huzinaga, S. *J. Chem. Phys.*, 1965, 42, 1293.
- ⁶⁴ Duijneveldt, van F. B. *IBM Tech. Res. Rep. RJ945*. **1971**.
- ⁶⁵ Partridge, H. *J. Chem. Phys.*, **1989**, 90, 1043.
- ⁶⁶ Dunning, T. H. *J. Chem. Phys.*, **1971**, 55, 716.
- ⁶⁷ Tatewaki, H.; Huzinaga, S. *J. Comp. Chem.*, **1980**, 3, 205.
- ⁶⁸ Dunning, T. H. Jr.; *J. Chem. Phys.* **1989**, 90.
- ⁶⁹ Wilson, A. K.; Mourik, van T.; Dunning, T. H. Jr. *J. Mol. Struct.*, **1996**, 388, 339.
- ⁷⁰ Kendall, R. A.; Dunning, T. H. Jr.; Harrison, R. J. *J. Chem. Phys.*, **1992**, 96, 6796.
- ⁷¹ Woon, D. E.; Dunning, T. H. Jr. *J. Chem. Phys.*, **1995**, 103, 4572.
- ⁷² Wilson, A. K.; Dunning, T. H. Jr. *J. Chem. Phys.*, **1997**, 106, 8718.
- ⁷³ Feller, D.; Peterson, K. A. *J. Chem. Phys.*, **1998**, 108, 154.
- ⁷⁴ Halkier, A.; Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Klopper, W.; Koch, H.; Olsen, J.; Wilson, A. K. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 286, 243.
- ⁷⁵ Almlöf, J.; Taylor, P. R. *J. Chem. Phys.* **1987**, 86, 4070.
- ⁷⁶ Almlöf, J.; Taylor, P. R.; *J. Chem. Phys.* **1990**, 92, 551.
- ⁷⁷ Widmark, P.-O.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta.* **1990**, 77, 291.

- ⁷⁸ Almlöf, J.; Taylor, P. R. *Adv. Quant. Chem.* **1991**, 22, 301.
- ⁷⁹ Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys. Phys.* **1970**, 19, 553.
- ⁸⁰ Cossi, M.; Barone, V. J. *Chem. Phys.* **2001**, 115, 4708.
- ⁸¹ Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999-3094.
- ⁸² Warshel, A.; Levitt, M. *Journal of molecular biology*, **1976**, 103, 227.
- ⁸³ Gao, J. "Review on QM/MM" In *Reviews in Comp. Chem.*, **1996**, 7, 119.
- ⁸⁴ Bakowies, D.; Thiel, W. *J. Chem. Phys.* **1996**, 100(25), 10580.
- ⁸⁵ Singh, U. C.; Kollman, P. A. *J. Comp. Chem.* **1986**, 7(6), 719-730.
- ⁸⁶ Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* **1990**, 11(6), 700-733.
- ⁸⁷ Philipp, D. M.; Friesner, R. A. *J. Comp. Chem.* **1999**, 20(14), 1468-1494.
- ⁸⁸ Dapprich, S.; Komirogi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *TEOCHEM* **1999**, 461-462, 1.
- ⁸⁹ Waszkowycz, B.; Hillier, I. H.; Gensmantel, N.; Payling, D. W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1991**, 2025.



*"Caminante no hay camino
se hace camino al andar"*

Antonio Machado

4. CONCEPTOS FOTOQUÍMICOS

4

CONCEPTOS FOTOQUÍMICOS Y FOTOFÍSICOS

4.1. LA INTERACCIÓN LUZ-MATERIA

Cuando la luz interacciona con la materia, ésta puede absorber la energía de los fotones siempre que dicha energía coincida con la diferencia existente entre dos de sus estados energéticos, o dicho de otro modo, cuando los cuantos de luz de una determinada frecuencia entren en resonancia con las diferencias entre estados energéticos de la molécula. Los cuantos de energía absorbidos se distribuyen entre los distintos grados de libertad o movimientos que la molécula posee (cada uno de ellos corresponde a un estado energético distinto). En orden de energía creciente se pueden ordenar en: traslacionales, vibracionales, electrónicos, o nucleares. Desde el punto de vista puramente fotoquímico van a interesar principalmente los estados vibracionales y los electrónicos, puesto que son estos los que van a verse implicados en la mayoría de procesos biológicos.

Antes de absorber la radiación electromagnética y adquirir energía de ella, las moléculas se encuentran en su estado electrónico fundamental. Existe un umbral de energía vibracional denominado de punto cero, que es el estado de mínima energía en que se puede encontrar la molécula, la cual consideraremos inicialmente vibrando alrededor de la posición de equilibrio más estable en ese estado electrónico. Los estados energéticos vibracionales superiores se pueden poblar térmicamente, sin embargo, para poblar un estado electrónico

distinto del fundamental ya es necesaria, en general, la participación de radiación electromagnética visible y/o ultravioleta.

La absorción de energía radiante desde el estado fundamental S_0 se invierte en cambiar la distribución de carga de la molécula mediante la excitación o reubicación de sus electrones. Esto se ve reflejado en la modificación de la ocupación de los nuevos orbitales moleculares topológicamente equivalentes a los que conforman la configuración electrónica del estado fundamental. Se dice que la molécula se polariza debido al campo eléctrico generándose un momento dipolar de transición (TDM, *Transition Dipole Moment*). El TDM se puede calcular como:¹

$$\text{TDM}_{n \rightarrow m} = \sum_{\alpha=x,y,z} \langle \Psi_n | z_{\alpha} | \Psi_m \rangle \quad (4.1)$$

Dependiendo de la energía puesta en acción, la molécula alcanza unos niveles energéticos u otros, lo que denominamos estados electrónicos excitados (S_1 , S_2 , S_3). No todas las transiciones energéticas son igualmente probables, lo cual se manifiesta en la forma de poblar los estados: habrá más población en los más probables. No hay que olvidar que estamos hablando de fenómenos colectivos que implican gran cantidad de moléculas. Si se registra el espectro de absorción o intensidad de radiación absorbida por un conjunto de moléculas, se observa un grupo de bandas de diversa intensidad a diferentes energías, representando a cada estado electrónico-vibracional poblado al absorber. La intensidad es un fenómeno colectivo. Su máximo valor se dará a aquella energía en la que la transición será más probable. Salvo en experimentos específicos en los que la energía de la absorción puede

controlarse, en un proceso natural existirá un rango de energías que poblará cada uno de los estados excitados.

La fuerza de oscilador (f) es una medida de la intensidad de la banda espectral. Es un concepto clásico adaptado a la mecánica ondulatoria que implica la probabilidad de que el sistema pueda acceder desde su estado fundamental a un estado excitado como resultado de la absorción de un fotón. Para una transición entre un estado inicial (n) y un estado final (m), la fuerza del oscilador es directamente proporcional al cuadrado del módulo del momento dipolar asociado a dicha transición por la diferencia de energía entre los dos estados.

$$f_{n \rightarrow m} = \frac{2}{3} \Delta E_{nm} |\text{TDM}_{n \rightarrow m}|^2 \quad (4.2)$$

El principio de Franck-Condon dice que la transición más probable es aquella que tiene lugar sin cambios relativos en las posiciones de los núcleos de la molécula, ya que la transición electrónica debida a la absorción de la energía del fotón es muy rápida en comparación con el movimiento nuclear y, por tanto, mientras ésta se produce los núcleos prácticamente permanecen congelados en su posición de equilibrio del estado fundamental. Esta transición se denomina transición vertical.

La excitación de un electrón de un estado cuántico a otro superior es sólo el primer paso de un largo camino que puede incluso conducir a la formación de un producto fotoquímico final. Los estados electrónicos vienen representados por curvas (en realidad hipersuperficies en muchas dimensiones) de energía que constituye el potencial al que se ven sometidas las moléculas debido a las diferentes

distribuciones de la densidad de carga. Dichas superficies se denominan superficies de energía potencial (*potential energy surfaces*, PES).

Los estados excitados que se han poblado tras la absorción tendrán un tiempo de vida limitado, ya que la molécula es inestable en esa situación respecto al estado fundamental, y buscará, por tanto, canales de relajación energética. La relajación energética se produce a través de un gran número de fenómenos que se diferencian unos de otros esencialmente en su tiempo de ejecución o dicho de otro modo, en su probabilidad. En algunos de estos procesos de desexcitación se pueden ver involucrados estados con diferente multiplicidad de espín, como es el caso del T₁ (el triplete más bajo en energía).

Las principales vías de desexcitación se pueden clasificar en procesos radiativos o no radiativos y aparecen en la Figura 4.1.

La absorción energética es el proceso más rápido de todo el mecanismo, del orden de los femtosegundos (10^{-15} s), puesto que, inicialmente pues únicamente implica a los electrones y no hay reorganización nuclear. Tras la absorción de energía, que será más probable a un estado electrónico de la misma multiplicidad de espín que el fundamental (generalmente un singlete) la mayoría de las moléculas se hallarán en un estado vibracional excitado.

El primer paso de la desexcitación consistirá en la relajación vibracional intramolecular (*Intramolecular Vibrational Relaxation*, IVR), es decir, la energía se disipará a través de vibraciones, cedidas térmicamente al exterior, por ejemplo a las moléculas de solvente. El último caso constituye un proceso que se denomina transferencia de energía vibracional (*Vibrational Energy Transfer*, VET). Estos fenómenos son muy rápidos (10^{-14} – 10^{-11} s), aunque su velocidad depende del

tamaño molecular. En ese tiempo las moléculas en el estado excitado van ajustando las posiciones de sus núcleos hacia la geometría más favorable en el mínimo (su mínimo estable de energía potencial), que será distinta a la de S_0 puesto que la distribución electrónica varía. La molécula, en promedio, recorre un camino de mínima energía desde esa disposición inicial, la Franck-Condon, hacia el mínimo del estado excitado. A lo largo de ese camino se puede cruzar con superficies de energía potencial de la misma multiplicidad de espín, produciéndose una conversión interna (IC, *Internal Conversion*), o con distinta multiplicidad de espín, caso en el que se produciría un Cruce entre Sistemas (ISC, *Intersystem Crossing*). En función de si existe o no un cruce efectivo entre ambas superficies se hablará en términos de cruce evitado (*avoided crossing*, AC) o de intersección cónica (*conical intersection*, CI). Todas aquellas moléculas que alcanzan una región de mínimo se encuentran atrapadas en una disposición energética que ha de relajarse mediante un mecanismo específico, más lento y menos probable, que es la emisión radiativa hacia el estado energético inferior. La emisión puede producirse entre estados de igual o diferente multiplicidad de espín, y se denomina fluorescencia o fosforescencia respectivamente, aunque en sistemas complejos con átomos de elevado número atómico la diferenciación por el espín se pierde y se habla simplemente de luminiscencia. Como se puede ver en la Figura 4.1, la emisión puede tener lugar desde diferentes regiones de la superficie, es decir, puede ser múltiple.

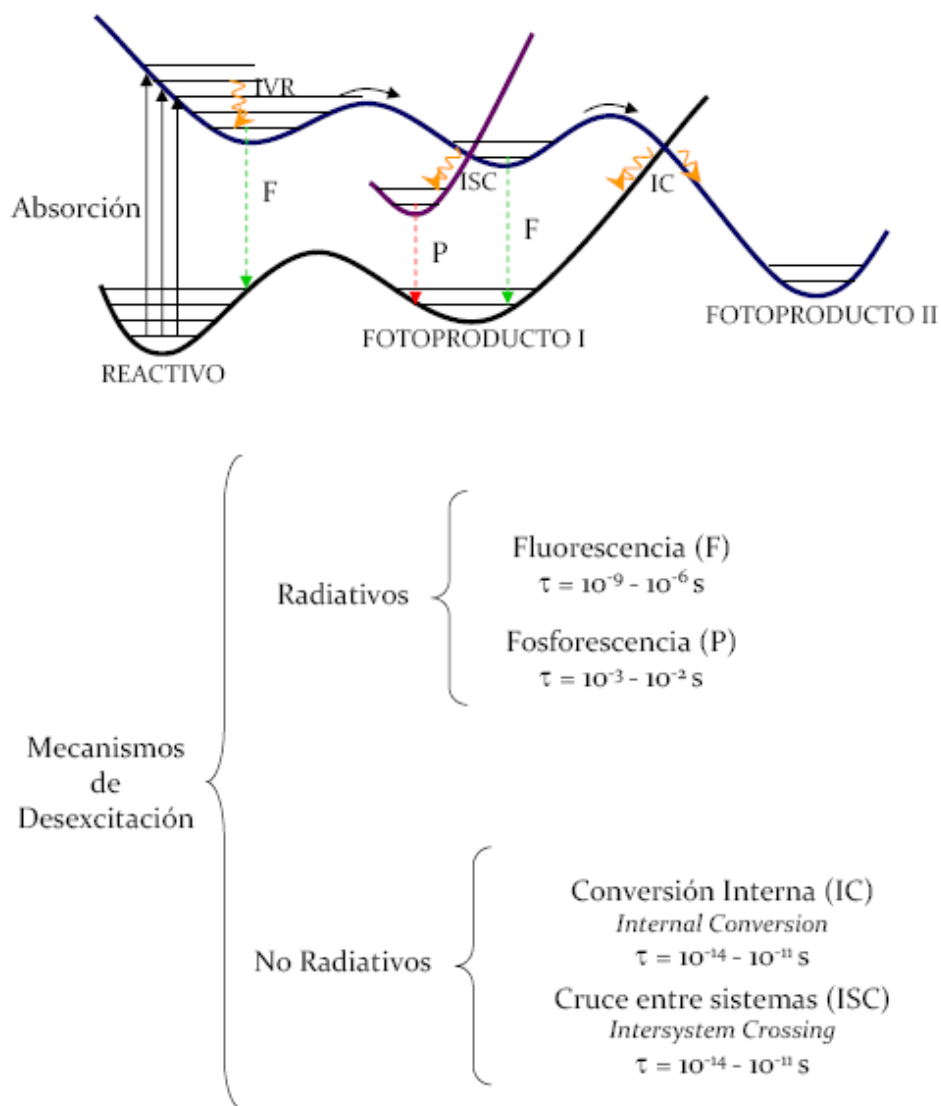


Figura 4.1. Principales Mecanismos de Desexcitación Intramoleculares.

La regla empírica de Kasha, clásica en fotoquímica, indica que las emisiones tienen lugar desde el estado excitado más bajo en energía (esto es desde S_1 o T_1 , y no desde estados electrónicos superiores como S_2 , S_3 , T_2 ...). La razón es la existencia de numerosos cruces entre superficies de los estados excitados entre sí, lo que implica una gran probabilidad de que se produzcan decaimientos ultrarrápidos hacia el estado excitado de menor energía. Los cruces (CIs) entre dicho estado y el fundamental son menos frecuentes, dado que el fundamental se halla en general bien separado energéticamente, y la vida media del estado excitado será mayor. Como resultado del proceso global, obtendremos energía radiante de longitud de onda mayor que la absorbida por la molécula, ya que la molécula ha relajado su energía vibracionalmente hasta alcanzar el mínimo del estado excitado desde el que se produce la emisión. Este fenómeno se denomina desplazamiento de Stokes (*Stoke's shift*)^{2,3}. Los tiempos de emisión (tiempos de vida media radiativa, τ) de los procesos radiativos son altos en comparación con los de otros procesos de relajación, (entre 10^{-9} – 10^{-6} s para la fluorescencia y 10^{-3} – 10^{-2} s para la fosforescencia), y dependen de la probabilidad de transición entre estados. Las transferencias de población entre estados electrónicos de diferente multiplicidad de espín como en el caso de la fosforescencia, o dentro de los mecanismos no radiativos de desexcitación de un ISC están prohibidas, a no ser que el acoplamiento espín-orbita favorezca la mezcla de los estados singlete y triplete, dando como resultado que la transición se encuentre permitida (ver apartado 4.3).

El rendimiento cuántico (*quantum yield*, ϕ) mide la relación entre la radiación absorbida y la emitida. Los sistemas que presentan una emisión intensa tienen un rendimiento cuántico cercano a la unidad.

Toda reducción del rendimiento cuántico indica que la molécula se ha relajado a través de un mecanismo diferente, y se dice que ha sufrido una desactivación (*quenching*). El mecanismo de decaimiento no radiativo más frecuente es el que experimenta una molécula cuando a través de su desexcitación vibracional encuentra un canal de cruce (*funnel*) entre dos superficies de energía potencial y se produce, como se ha comentado anteriormente, una IC o un ISC dependiendo de la multiplicidad de los estados implicados. Este proceso será tanto más rápido cuando más cercanos en energía se encuentren estos estados. Los tiempos asociados a estos fenómenos son del orden de los de la relajación vibrónica, $10^{-14} - 10^{-11}$ s, puesto que se trata precisamente de eso, de una relajación vibracional gracias al acoplamiento de los estados vibrónicos de ambos estados electrónicos.

4.2. REACCIONES FOTOQUÍMICAS

El proceso global de desexcitación puede dar como resultado una reacción fotoquímica cuando finalmente el mínimo del estado fundamental que se alcanza tras la relajación no es el mismo del que se partía antes de la interacción de la molécula con la luz. Dentro de este tipo de procesos se puede hablar de fotoquímica adiabática y de fotoquímica no adiabática. En el contexto de la aproximación de Born-Oppenheimer,⁴ la fotoquímica adiabática se define como un proceso que transcurre a través de una única superficie de energía potencial, mientras que un proceso fotoquímico no adiabático se define como un proceso que se inicia en la superficie de energía potencial de un estado

excitado y que finaliza en la superficie de energía potencial de otro estado electrónico, generalmente el fundamental. En la Figura 4.2 se esquematizan ambos tipos de reacciones fotoquímicas. Tras la absorción de energía el reactivo, R, es promovido a un estado electrónico excitado R^* . El proceso $R^* \rightarrow P$ de la parte derecha del esquema constituye un camino de reacción adiabático. El de la izquierda sería un camino de reacción no adiabático, puesto que parte de la reacción transcurre a través de la superficie de energía potencial del estado excitado y, posteriormente, tiene lugar un decaimiento no radiativo hacia la superficie de energía potencial del estado fundamental. Los procesos fotoquímicos tendrán lugar en competición con los procesos fotofísicos de la parte central del esquema, y que conducen a la regeneración del sistema reactivo de partida. El camino de la reacción fotoquímica vendrá determinado por la magnitud de las barreras energéticas en las superficies del estado fundamental y del excitado. Las emisiones tendrán lugar, fundamentalmente, desde las geometrías correspondientes a los mínimos relativos de la superficie del estado excitado. La eficiencia del proceso no radiativo que puede tener lugar a través del cruce de superficies será el elemento clave en los mecanismos fotoquímicos no adiabáticos. Por tanto, dentro del panorama fotoquímico se puede distinguir, atendiendo al número y naturaleza de las hipersuperficies implicadas, tres tipos básicos de esquemas, dentro del marco de los procesos fotofísicos, de la fotoquímica adiabática y no adiabática.

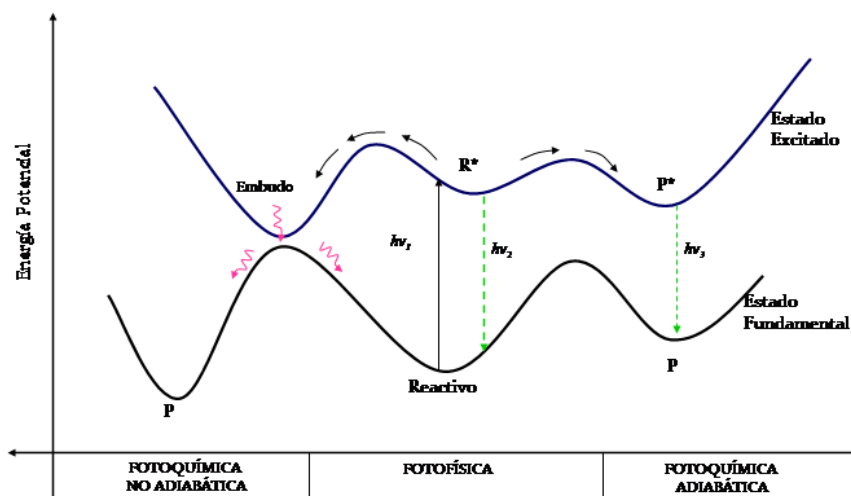


Figura 4.2 Procesos Fotoquímicos.

Los algoritmos teóricos necesarios para localizar mínimos de energía, estados de transición y caminos de reacción adiabáticos en las hipersuperficies excitadas son, en general, una extensión de los ya conocidos y empleados para el estado fundamental. Sin embargo, los aspectos computacionales ligados a la descripción de los procesos de decaimiento no radiativo, IC e ISC, que se producen mediante cruces evitados o CI son más complejos y requieren métodos especiales ya que en la descripción de estas zonas de cruce la aproximación de Born-Oppenheimer deja de ser válida.

Un punto de intersección entre dos superficies de energía potencial representa una situación muy probable en la que se puede pasar de un estado electrónico a otro. Es un pico en la superficie del

estado de menor energía que conecta ambos estados electrónicos y por donde se pueden seguir diversos caminos de reacción para conducir a diversos fotoproductos. El mecanismo de este decaimiento no radiativo fue sugerido por Teller,⁵ quién originalmente señaló que el lugar más probable para que ocurra la conversión interna reside en los cruces entre superficies. Zimmermann⁶ y Michl⁷ fueron los primeros en sugerir, de forma independiente, que ciertos fotoproductos se originan gracias a la conversión interna mediada por un cruce entre superficies. Cuando dicho cruce es efectivo toma la forma de una CI. Tanto Zimmerman como Michl utilizaron el término embudo (*funnel*) para describir esta característica. Se entiende que se tiene una intersección cónica cuando representando la energía respecto a las F coordenadas nucleares se obtiene una intersección a lo largo de la hiperlínea de dimensión F - 2 del sistema, siendo F = 3N - 6 los grados de libertad totales del sistema. De esta forma, el espacio total de coordenadas se divide en: el subespacio de intersección: de dimensión F - 2, en el que los dos estados tienen la misma energía y el subespacio de ramificación (*branching subspace*) de dos dimensiones, a lo largo de la cual la degeneración desaparece. Estas dos dimensiones son:

- **Vector diferencia de gradiente:**

$$x_1 = \frac{\partial(E_1 - E_2)}{\partial Q} \quad (4.3)$$

- **Vector acoplamiento no adiabático,** donde Q representa las coordenadas nucleares del sistema.

$$x_2 = \left\langle \psi_1 \left| \frac{\partial \psi_2}{\partial Q} \right. \right\rangle \quad (4.4)$$

Si se representa la energía de los dos estados implicados en la intersección en función de las coordenadas del espacio de ramificación se obtiene la forma de doble cono que da nombre a la intersección, como se puede ver esquematizado en la Figura 4.3. La diferencia más pronunciada entre las pendientes de la hipersuperficie superior e inferior se la a lo largo de la dirección x_1 . Por otro lado, a lo largo de la dirección de x_2 , el desplazamiento nuclear que mezcla las dos funciones adiabáticas en el punto de intersección cónica es el óptimo.

La dimensión $F - 2$ del subespacio de intersección viene dada de las dos condiciones necesarias para que se produzca esa intersección:

- Que la energía de los dos estados implicados sea la misma.
- Que la interacción entre ellos sea nula.

Estas condiciones equivalen a requerir que, en un tratamiento multiestados, los elementos del Hamiltoniano efectivo 2×2 sean $H_{11} = H_{22}$ y $H_{12} = H_{21} = 0$. Estos requerimientos hacen disminuir en dos los grados de libertad del sistema, lo que significa que la dimensión del espacio de la intersección cónica es $F - 2$.

Supóngase que se parte del punto A de la intersección cónica representada en la Figura 4.3. Se modifica la geometría a través de una coordenada de reacción determinada perteneciente al espacio de intersección (diferente de x_1 y x_2) hasta el punto B, el sistema mantiene la degeneración pero la energía habrá cambiado de E_1 a E_2 . Las coordenadas que definen el espacio de ramificación x_1 y x_2 , tampoco tienen por qué ser las mismas en el punto A y B, ni la topología de cada una de las superficies que se cruzan.

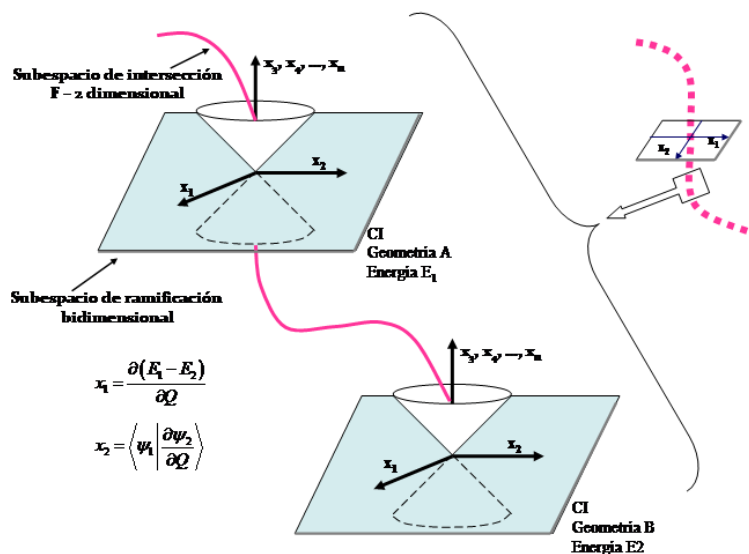


Figura 4.3.- Esquema de una hiperlínea de intersección entre dos PES.

La línea que enlaza los puntos A y B se denomina a menudo *seam* o costura de la intersección cónica. Se trata de una hiperlínea consistente en un número infinito de puntos de intersección cónica. El decaimiento no radiativo de una superficie a otra puede ocurrir en las proximidades de cualquier punto de esta la hiperlínea, la cual juega un papel primordial para comprender detalladamente el comportamiento dinámico del sistema. La intersección cónica más relevante desde un punto de vista fotoquímico será la que primeramente se acceda a lo largo de un camino de reacción (ver 4.6.3), pues corresponde a una mayor probabilidad de que en esa zona se lleve a cabo de hecho la conversión interna.

4.3. EL ACOPLAMIENTO ESPÍN-ÓRBITA

Se conoce como acoplamiento espín-órbita* a la interacción del momento magnético de espín electrónico (\vec{S}) con el momento magnético debido al movimiento orbital del electrón (\vec{L}). La mezcla de estados de diferente multiplicidad es una consecuencia del acoplamiento espín-órbita (SOC, *spin-orbit coupling*).

La regla de selección de espín se debe al hecho de que el operador del momento dipolar eléctrico no opera sobre el espín, y por tanto, el resultado de la integración sobre las variables de espín dará siempre cero si las funciones de espín de dos estados son diferentes, quedando sólo permitidas aquellas transiciones entre estados de la misma multiplicidad. De hecho, las absorciones singlete-triplete son prácticamente inobservables en el espectro de hidrocarburos y de otras especies moleculares que no tengan átomos pesados. Sin embargo, estrictamente hablando, el momento angular de espín y sus componentes no son constantes en las moléculas no lineales y la clasificación de los estados por su multiplicidad constituye una aproximación. El acoplamiento espín-órbita es el término más importante de los del Hamiltoniano fuente de la mezcla estados de diferente multiplicidad. La interacción entre el momento angular de espín de un electrón y su momento orbital angular queda reflejada en el Hamiltoniano espín-órbita, \mathcal{H}_{so} , el cual se puede expresar como:¹

* IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997) 1996, 68, 2277

$$\mathcal{H}_{SO} = \frac{e^2}{2m_e^2 c^2} \sum_j \sum_\mu \frac{Z_\mu}{|r_j^\mu|^3} \vec{l}_j^\mu \cdot \vec{s}_j \quad (4.5)$$

Donde \vec{l}_j^μ es el operador momento angular del electrón j , r_j^μ es el vector que apunta al electrón j desde el núcleo μ . El acoplamiento espín-órbita es particularmente relevante para átomos de alto número atómico, Z_μ . La presencia de un producto escalar inseparable $\vec{l}_j^\mu \cdot \vec{s}_j$, donde un operador actúa sólo en la parte espacial de la función de onda y el otro sólo sobre su espín ocasiona una interacción entre varias funciones de onda de multiplicidades puras. Las funciones propias del \mathcal{H}_{el} serán por tanto mezclas de funciones de distinta multiplicidad. Sin embargo, \mathcal{H}_{SO} constituye sólo un término muy pequeño del \mathcal{H}_{el} y la mezcla, por tanto, no va a ser severa, por lo que la función de onda contendrá predominantemente funciones de una única multiplicidad. Aunque, eso sí, los estados singlete tendrán una pequeña contribución de triplete, y los triplete una pequeña contribución de singlete y, consecuentemente, el momento de transición singlete-triplete podrá ser distinto de cero y la transición $S_i \rightarrow T_i$, aumentará su probabilidad. La longitud del vector de acoplamiento espín-órbita se calcula como:

$$SOC = \sqrt{(\mathcal{H}_{SO}(x))^2 + (\mathcal{H}_{SO}(y))^2 + (\mathcal{H}_{SO}(z))^2} \quad (4.6)$$

Valores de 0.1 cm^{-1} para el SOC electrónico se consideran ya bastante altos en pequeñas moléculas orgánicas, considerando, además, que su valor se incrementa al considerar las contribuciones vibrónicas.

4.4. FORMACIÓN DE EXCÍMEROS.

El término *excímero*, introducido por primera vez por Stevens y Hutton,⁸ hace referencia a un dímero cuyo estado electrónico excitado es enlazante mientras que su estado fundamental es disociativo, es decir, que se disociaría en sus monómeros en ausencia de restricciones externas.

El excímero constituye una entidad física, y no química puesto que sólo existe en el estado excitado, y al disiparse la energía el sistema revierte a su par de monómeros separados (ver Figura 4.5), aunque en el caso de algunas moléculas aromáticas, la interacción de tipo excímero es tan fuerte que a partir del excímero $^1D^*$ se forma un fotodímero estable M_2 . La fotodimerización, el caso extremo de la formación del excímero, ha sido conocida desde el siglo XIX por ocurrir en disoluciones de antraceno expuestas a la luz solar.⁹

Los estudios experimentales han mostrado que la capacidad de formar excímeros es común a la mayoría de las moléculas aromáticas planas. La naturaleza de su inusual tipo de enlace molecular es, por tanto, de gran interés para la comprensión de los procesos fotoquímicos y fotofísicos en los compuestos aromáticos. Cuando se habla de *excímero* sin hacer ningún tipo de especificación, se está haciendo referencia al *excímero singlete*, $^1D^*$, es decir el estado excitado singlete enlazante más bajo en energía. Sin embargo también puede formarse el *excímero triplete*, $^3D^*$, que es el estado excitado triplete más bajo en energía en el que los monómeros están enlazados. La propiedad fundamental de los excímeros es el hecho de su ancha y desestructurada banda de fluorescencia, la cual suele encontrarse entre 5000-6000 cm^{-1} desplazada

hacia frecuencias más bajas respecto a la fluorescencia molecular. Esta fluorescencia puede ser observada tanto en disoluciones, en líquidos y también en sólidos, siempre y cuando la estructura cristalina permita el suficiente solapamiento entre los planos moleculares. La formación del excímero es muchas veces la responsable del amortiguamiento de la fluorescencia desde el estado excitado del monómero, e incluso puede conducir a una reacción fotoquímica como, por ejemplo, sucede en el caso de la formación de fotodímeros.

El aumento de la temperatura favorece la formación del dímero, pero a muy altas temperaturas la situación se invierte produciéndose la disociación al estado excitado y al estado fundamental de los monómeros. Si la temperatura es tan alta que la disociación y la asociación son rápidas en comparación con los procesos de desactivación, se produce un equilibrio entre el excímero y el monómero excitado, observándose el decaimiento exponencial de las emisiones del estado excitado del monómero y del excímero. Por otra parte, a bajas temperaturas, cuando la disociación del excímero es despreciable, se observan dos decaimientos exponenciales. En el rango de transición entre un caso y el otro el decaimiento es no-exponencial. De forma semejante a los excímeros (en los que las dos moléculas pertenecen a la misma especie química o bien a dos especies muy similares), se puede formar complejos excitados de moléculas químicamente diferentes, que también se disocian en sus monómeros después de la desactivación.^{10,11} Estos complejos son llamados heteroexcímeros, o exciplejos.

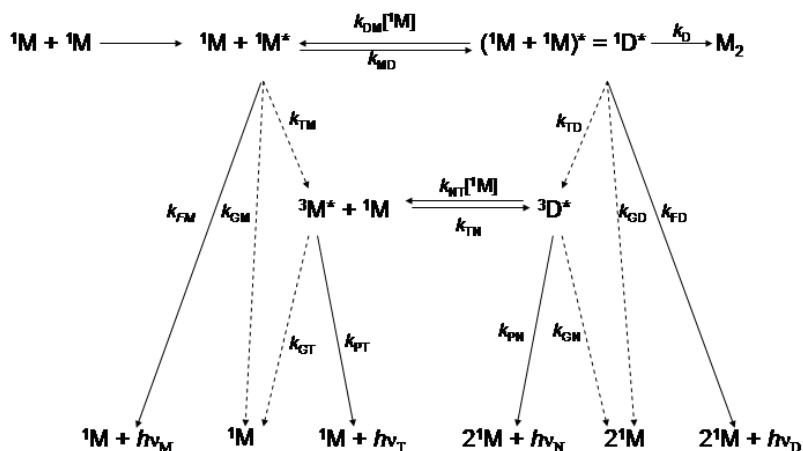


Figura 4.5.- Esquema del proceso de formación de dímeros y procesos competitivos. 1M : molécula en su estado fundamental, ${}^1M^*$: molécula en estado excitado singlete, ${}^1D^*$: excímero, ${}^3M^*$: molécula en estado excitado triplete, ${}^3D^*$: excímero triplete, k_{DM} : constante de velocidad de formación del dímero, k_{MD} : constante de velocidad de descomposición del dímero, k_{FM} : constante de velocidad de la fluorescencia del monómero, k_{GM} : constante de velocidad de la desactivación no radiativa de ${}^1M^*$, k_{TM} : constante de velocidad de población de ${}^3M^*$, k_{GT} : constante de velocidad de la desactivación no radiativa de ${}^3M^*$, k_{PT} : constante de velocidad de la fosforescencia del monómero, k_{FD} : constante de velocidad de la fluorescencia del dímero, k_{GD} : constante de velocidad de la desactivación no radiativa de ${}^1D^*$, k_{TD} : constante de velocidad de formación de ${}^3D^*$, k_{PN} : constante de velocidad de la fosforescencia del dímero, k_{GN} : constante de velocidad de la desactivación no radiativa de ${}^3D^*$, k_{NT}/k_{TN} : constante de velocidad del proceso de descomposición/formación de ${}^3D^*$ en/a partir de ${}^3M^*+{}^1M$.

4.5. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA DE EXCITACIÓN.

La transferencia de energía de excitación (EET, *Excitation Energy Transfer*) es el proceso por el cual un estado excitado de una determinada molécula transfiere su energía a una molécula vecina.¹² La importancia de la EET en el desarrollo de la vida es difícilmente sobreestimada ya que se trata de un paso clave de la Fotosíntesis, entre otros relevantes procesos biológicos. Una única molécula de clorofila ligada al centro de reacción puede recoger sólo una pequeña porción de la luz solar disponible, pero gracias a cientos de pigmentos moleculares (que se encuentran en células fotosintéticas y están organizados como agregados orientados para absorber la energía solar de forma eficiente). Dichos pigmentos transfieren su energía vía EET al centro de reacción.

4.5.1. EET Singlete-Singlete

La EET singlete-singlete (SS-EET) puede tener lugar a través de varios mecanismos. Los dos tipos de transferencia energética más comunes en fotoquímica orgánica tienen lugar a través de dos tipos de interacciones entre *D (molécula donora de la energía) y A (molécula aceptora de la energía). En el primer caso la interacción de intercambio electrónico (también conocida en la literatura como mecanismo de solapamiento orbital) es la responsable de la transferencia de energía. El segundo caso conlleva una interacción dipolo-dipolo (o mecanismo coulombiano o de resonancia). Los desarrolladores de ambas teorías fueron Dexter¹³ y Förster,¹⁴ respectivamente, y en honor a ellos éstas se suelen conocer con el nombre de transferencia de energía de Dexter y transferencia de energía dipolo-dipolo de Förster. La diferencia entre los

dos mecanismos es que en el mecanismo de EET de Förster la interacción entre *D y A tienen lugar a través del espacio por el solapamiento de los campos eléctricos dipolares de *D y A, mientras que en el mecanismo de Dexter la interacción entre *D y A se produce a través del solapamiento de sus orbitales frontera.

- **Mecanismo de intercambio electrónico o de Dexter**

Se suele describir a través del solapamiento de los orbitales moleculares frontera entre un estado excitado electrónicamente de la molécula donora y una segunda especie molecular que actúa como aceptora (o entre *D y grupos que sean accesibles intramolecularmente). Si un orbital de *D (particularmente su HOMO o LUMO parcialmente ocupado) solapa con un orbital de A (con su HOMO o LUMO parcialmente ocupados) se puede producir un intercambio electrónico en la región del solapamiento orbital. Las interacciones entre el HOMO parcialmente ocupado de *D con el HOMO de A (o entre el LUMO parcialmente lleno *D y el LUMO de A) es generalmente estabilizante. El grado de estabilización dependerá de factores tales como el solapamiento efectivo y la diferencia de energía entre los orbitales que interactúan. De esta forma, en este mecanismo, la apropiada aproximación espacial de los orbitales frontera determina la reacción fotoquímica.

- Mecanismo dipolo-dipolo de Förster

Se trata de un proceso de transferencia de energía que ocurre a través de la interacción del campo eléctrico oscilante dipolar. *D induce una oscilación electrónica en A que tiene como consecuencia la formación de *A . Este tipo de interacción no requiere un contacto de tipo Van der Waals entre *D y A o al solapamiento de sus orbitales. Se puede visualizar la transferencia de energía como un mecanismo entre de transferencia de señal entre una antena-transmisora y una antena-receptora. Según la teoría clásica de la radiación electromagnética todos los electrones de una molécula son considerados osciladores armónicos los cuales oscilan (vibran) a lo largo del marco de la molécula. *D posee un electrón excitado, que por tanto estará en un estado excitado del oscilador armónico y realizará periódicas oscilaciones a lo largo de la estructura de la molécula, lo cual creará un dipolo eléctrico oscilante que producirá a su vez un campo eléctrico oscilante en el espacio que lo rodea. El efecto de este campo eléctrico oscilante de *D en A se puede visualizar mediante un ejemplo familiar: una antena de transmisión o una antena de recepción eléctrica. Se puede considerar inicialmente A como un receptor/oscilador que es potencialmente capaz de ser inducido a la resonancia por la oscilación del campo eléctrico de una antena que transmite *D . Los electrones no cambian de moléculas o de orbitales, las dos transiciones ($^*D \rightarrow D$ y $A \rightarrow A^*$) ocurren simultáneamente por efecto de la resonancia: el campo oscilante dipolar de *D produce un campo oscilante dipolar sobre A y se forma a A^* . Para que la energía se transfiera se requerirá de la existencia de una frecuencia de oscilación común entre *D y *A . Förster¹⁴ demostró que la

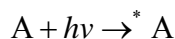
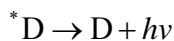
cinética de la transferencia de energía podía ser calculada a partir de los datos espectroscópicos disponibles de los cromóforos, de la distancia de separación de los mismos y de la orientación relativa de los momentos de transición dipolares del aceptor y del donador:

$$J_F = \frac{1}{R_{DA}^3} \left(\vec{D}_D \vec{D}_A - 3 \frac{(\vec{D}_D \vec{R}_{DA})(\vec{R}_{DA} \vec{D}_A)}{R_{DA}^2} \right) \quad (4.7)$$

Donde \vec{R}_{DA} es el vector entre D y A y J_F es el parámetro de acoplamiento electrónico en la aproximación de Förster.

- **Mecanismo "trivial" de transferencia de energía**

Curiosamente, existen procesos de transferencia de energía que ocurren aunque no haya interacción electrónica (sin intercambio electrónico ni interacción dipolo-dipolo) entre las dos moléculas, la donora y la aceptora. En estos casos la transferencia de energía tiene lugar a través de un mecanismo llamado "trivial". El dador *D emite un fotón (a través de un mecanismo radiativo de emisión, bien sea fluorescencia o fosforescencia) que puede ser absorbido por el estado fundamental de A y producir *A.¹⁵ Un importante punto diferenciador de la transferencia de energía "trivial" y la que se produce a través del intercambio electrónico o de la interacción de dipolo-dipolo, es que para el mecanismo "trivial", el aceptor no influye en el tiempo de vida media de la emisión, el aceptor A simplemente intercepta el fotón después de ser emitido por *D.



En función de la distancia que exista entre la molécula donora y la aceptora, el mecanismo de EET predominante será uno u otro. Ver Figura 4.6.



Figura 4.6. El mecanismo de SS-EET predominante a distancias cortas será el del mecanismo de Dexter para el que es necesario el solapamiento orbital. Conforme aumente la distancia intermolecular el solapamiento será cada vez menor y el mecanismo imperante será el de Förster. Cuando la distancia entre aceptor y donador sea mayor el único mecanismo que sobrevivirá será el mecanismo trivial.

4.5.2. EET Triplete-Triplete

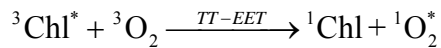
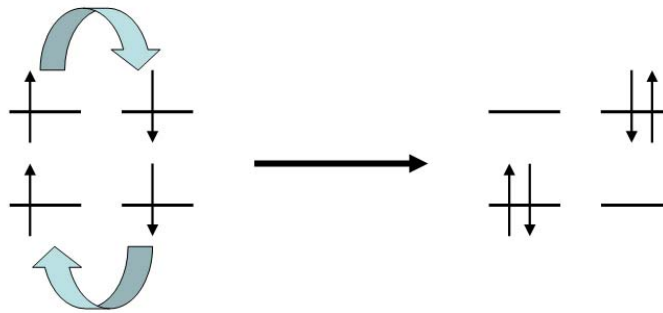
Por el mecanismo de EET de Förster sólo son posibles transferencias de energía dipolo-dipolo singlete-singlete, puesto que en las transferencias en las que se ven implicados estados tripletes los momentos dipolares de transición serán muy débiles y el acoplamiento (J_F) entre los estados insignificante (ver ecuación (4.7)). Sin embargo, el intercambio electrónico proporciona un mecanismo efectivo para la transferencia de energía triplete-triplete (TT-EET).

La TT-EET es un proceso en el que un par de moléculas o de fragmentos moleculares intercambian su energía a la vez que cambian

su espín electrónico. Cuando un sistema capa cerrada es excitado generalmente se poblará un estado singlete. Después, a través de un ISC es posible que un estado triplete adquiera población, y a partir de ese momento ya es posible la TT-EET. Este tipo de transferencia juega un papel muy importante en la fotobiología. Sin ir más lejos, en los organismos fotosintéticos “por acción de la luz solar” es inevitable que tras la fotoexcitación de la clorofila (Chl) (o de la bacterioclorofila), se produzca la formación del triplete de estas moléculas:



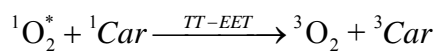
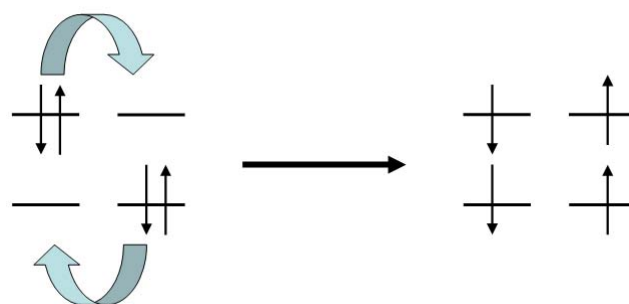
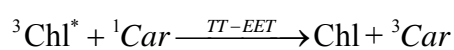
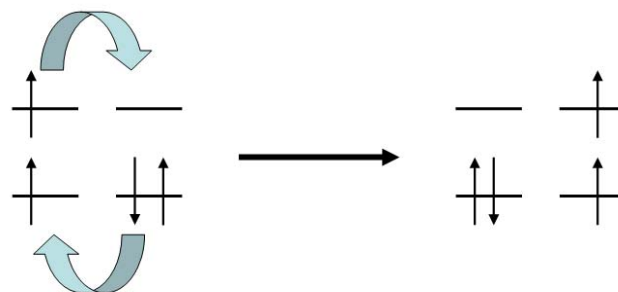
A partir del ${}^3\text{Chl}^*$ se puede generar el oxígeno singlete a mediante un proceso de transferencia de energía TT:



En este proceso ambas moléculas intercambian su energía y a la vez se produce una variación en el espín de las mismas.

La especie ${}^1\text{O}_2^*$ es altamente reactiva y puede causar daños en los tejidos biológicos de la planta. Como mecanismo de autoprotección, en las proteínas fotosintéticas existen carotenoides (*Car*) que son capaces de

evitar la formación de oxígeno singlete al amortiguar la $^3\text{Chl}^*$ ¹⁶ o bien directamente al $^1\text{O}_2^*$ ¹⁷ a través de nuevos procesos de TT-EET:



La TT-EET se puede visualizar como dos transferencias electrónicas simultáneas con diferente espín: ($\alpha \rightarrow \alpha$ y $\beta \rightarrow \beta$).

A través del mecanismo trivial no se puedan producir transferencia de energía entre estados singlete y triplete, ni entre triplete-triplete.¹²

4.5.3. Transferencia de carga

La transferencia electrónica requiere el solapamiento orbital, y por tanto sólo puede tener lugar a través de interacciones de intercambio electrónico.¹²

También se puede dar el mecanismo “trivial” de transferencia de carga, de un modo análogo al de transferencia de energía. El donador pierde un electrón que es rápidamente rodeado por el solvente y solvatado, hasta que es atraído por la especie aceptora. La fotoionización se podrá producir cuando la energía absorbida exceda al potencial de ionización de una molécula en disolución.

4.6. METODOLOGÍA QUÍMICO-CUÁNTICA APLICADA AL ESTUDIO DEL ESTADO EXCITADO

Con la finalidad de explicar y predecir las propiedades fotoquímicas y espectroscópicas de sistemas moleculares utilizando métodos teóricos se calcularán determinadas propiedades, entre las cuales, las dos más importantes quizás sean las diferencias de energía y las probabilidades de transición.³ Desde el punto de vista de la química cuántica esto significa describir la complicada topografía de las hipersuperficies de energía potencial de un modo balanceado para obtener la matriz de elementos que nos informarán sobre la probabilidad de la transferencia energética.¹⁸ El cálculo de las PES es mucho más complicado en el estado excitado que en el estado fundamental. Para describir los distintos estados excitados se necesitan diferentes cantidades de correlación electrónica y un conjunto de

funciones de base monoeléctricas capaz de describir todos los efectos simultáneamente. Además, las PESs de los estados excitados involucran un gran número de mínimos, estados de transición, cruces entre superficies y acoplamientos entre estados. A causa de la inherente complejidad de estos problemas, los métodos y algoritmos usados para el estudio de los estados excitados o no resultan tan eficientes como para el estado fundamental, o se encuentran todavía en desarrollo.^{3,18}

Con objeto de poder comparar y analizar con propiedad los datos espectroscópicos experimentales disponibles, los estados excitados deben ser calculados en los puntos significativos de su PES, que serán previamente localizados mediante los algoritmos de optimización apropiados. Las energías de absorción vertical desde el estado fundamental, las transiciones adiabáticas entre los mínimos de los estados y las diferencias de energías verticales a la geometría optimizada del estado excitado proporcionan un rango de energías responsables de las bandas de absorción y de emisión, mientras que los momentos de transición dipolar entre los distintos estados informan sobre la intensidad de las transiciones a través de la magnitud de sus fuerzas de oscilador.³ Conforme se alejan de los mínimos de energía, las PESs aumentan en complejidad. Pueden aparecer estructuras, estados de transición, que conecten diferentes regiones de las hipersuperficies y que den lugar a reacciones fotoadiabáticas, o también se pueden dar cruces entre hipersuperficies cercanas que conduzcan a reacciones fotoquímicas no adiabáticas, y como se comentó anteriormente, en estas regiones la aproximación de Born-Oppenheimer no será válida.

A continuación se recopila una revisión de los métodos químico-cuánticos más comúnmente empleados para el estudio de estados

electrónicos excitados, algunos de los cuales han sido ya más comentados en el Capítulo 3.

4.6.1. Métodos químico-cuánticos más utilizados para el cálculo de estados excitados

En primer lugar comentaremos de los principales métodos monoconfiguracionales, es decir, aquellos que usan la solución Hartree-Fock (HF) como función de referencia. El método *ab initio* más extendido de este tipo es el CIS (*Configuration Interaction Singles*).¹⁹ Su esencia consiste en considerar que un estado excitado puede ser descrito a través de los determinantes excitados que se han formado reemplazando un espín-orbital ocupado en la función de referencia HF por uno virtual. Los inconvenientes que presenta esta aproximación pueden ser parcialmente compensados si se usa la combinación lineal de todos los posibles determinantes monoexcitados para construir la función de onda del estado excitado en cuestión. El mayor defecto de este método es la casi total omisión de la energía de correlación. Se han realizado varios intentos de resolver el problema utilizando también determinantes doblemente excitados²⁰ o a través de la teoría de perturbaciones¹⁹ pero no han tenido demasiado éxito. En general las energías de excitación obtenidas a nivel CIS están muy sobreestimadas debido a la ausencia de los efectos de la energía de correlación. A pesar de la creencia de que los resultados CIS son cualitativamente útiles ya que los estados están correctamente ordenados,²¹ se pueden encontrar muchos casos en la literatura en los que la predicción del orden de los estados excitados es errónea,^{22,23,24,25} simplemente por el hecho de que la energía de

correlación afecta de modo diferente a los distintos estados excitados debido al carácter multiconfiguracional intrínseco de los mismos.

Un segundo tipo de métodos que se suele utilizar en el cálculo de estados excitados es aquel que se conoce bajo el nombre de Métodos de Propagador,²⁶ (también conocido bajo la denominación de Funciones de Green, Ecuación de Movimiento o Teoría de la Respuesta Lineal). Este tipo de algoritmo puede ser aplicado sobre varias metodologías como la interacción de configuraciones, ya sea simple o multireferencial, la aproximación coupled-cluster, o el DFT. La base de la técnica consiste en usar funciones de análisis complejas para obtener representaciones de la energía de excitación (también llamada representación de la frecuencia) y de los momentos de transición dipolar a partir de la expresión de las polarizabilidades dependientes de las frecuencias del estado fundamental. A partir de una función de respuesta lineal, se obtienen propiedades de segundo orden como la polarizabilidad. Esto se puede generalizar para órdenes superiores y, por ejemplo, a partir de funciones de respuesta cuadráticas se determinan las propiedades moleculares de tercer orden como las primeras hiperpolarizabilidades, y a partir de ellas los elementos matriciales de la absorción bifotónica. La peculiaridad de los Métodos de Propagador consiste en que no es necesario calcular la función de onda de un estado individual para obtener energías de excitación y probabilidades de transición. La calidad del resultado dependerá del tipo de función de referencia. Existe una amplia familia de métodos de este tipo. Los más populares son los que utilizan el estado fundamental HF como referencia, como la *Random-Phase Approximation* (RPA) o la aproximación *Time-Dependent Hartree-Fock* (TDHF), cuyas ecuaciones resultantes son idénticas en el caso

estático a las de la RPA²⁶ y a las de la aproximación *Coupled Hartree-Fock* (CHF).²⁷ Sin embargo, existe el problema de que los errores normales para el método RPA están sobre $\pm 1 - 2$ eV en las energías de excitación, mientras que las fuerzas de oscilador pueden diferir en un orden de magnitud.²⁸ Estos métodos no incluyen los efectos de la correlación estática debido a su carácter monoconfiguracional y por eso resultan extremadamente deficientes cuando se calculan estados multiconfiguracionales. Es más, no pueden calcular de forma general estados descritos por dobles excitaciones o estados basados en referencias de capa abierta. Es el caso del método SOPPA (*Second-Order Polarization Propagator Approximation*)^{28,29} que puede ser usado para obtener una buena descripción cualitativa del espectro, aunque a menudo yerra. Existen versiones mejoradas que utilizan una función de onda multiconfiguracional, que han proporcionado precisión en el cálculo de las propiedades moleculares, si bien no en las energías, debido a la falta de correlación dinámica.

Otra familia de métodos muy empleados para sistemas moleculares pequeños y que se basa en una única referencia, son los de la aproximación Size-Extensive Coupled-Cluster (CC). Los métodos CC para el estado fundamental se han convertido, en la práctica, en los métodos químico-cuánticos más precisos para muchos sistemas. Si bien es cierto que existen excepciones en los que la aproximación CC falla. Un ejemplo lo constituye el caso de la disociación o la cuasi-degeneración de sistemas como el ozono, el C₂ o el N₂ (entre otros),^{21,30,31,32,33} ya que en se está utilizando un nivel bajo de excitaciones en situaciones donde es claramente deficiente. En la misma línea que para el estado fundamental, los métodos CC aplicados al estudio del estado excitado

utilizan la referencia de orden cero HF, la cual por lo general será pobre para representar estos estados. Los métodos más empleados son: la *Symmetry Adapted Cluster Configuration* (SAC-CI),³⁴ la ecuación de movimiento Coupled Cluster (EOM-CC)³⁵ y la familia de aproximaciones CCx³⁶ de respuesta lineal. Aunque tienen diferentes formulaciones sus aplicaciones son similares. El método SAC-CI y el EOM-CC se pueden emplear en sistemas de capa abierta.³⁷ Los métodos CC, debido a su carácter monoconfiguracional, deben incluir altos niveles de excitaciones para intentar cubrir la mayor parte de correlación posible, compensar parcialmente la pobre función de referencia utilizada en la descripción de los estados excitados, y conseguir energías de excitación y propiedades precisas. En la práctica, en situaciones donde la función de referencia HF es bastante buena, los métodos CC son, hasta el momento, los más precisos para calcular estados excitados en moléculas capa cerrada de tamaño molecular pequeño o medio, pero sólo para aquellos estados que pueden ser bien descritos por simples excitaciones y en sistemas donde el estado fundamental es claramente monoconfiguracional. Los métodos que incluyen excitaciones triples en la expansión CC como el EOM-CCSD(T) y CC3, dan resultados de una precisión lógicamente mayor que los que sólo incluyen las dobles como el SAC-CI, EOM-CCSD o CC2, que pueden ser considerados de calidad más baja que por ejemplo los métodos perturbacionales que utilizan una referencia múltiple como el CASPT2, o aproximaciones similares. Cuando nos encontramos ante sistemas con un estado fundamental capa abierta, la precisión de los métodos CC disminuye y lo mismo ocurre cuando el carácter del estado es claramente multiconfiguracional. Un ejemplo lo encontramos en el estado 2^1A_g de los polienos, que es un

estado multiconfiguracional con grandes contribuciones de configuraciones doblemente excitadas en la descripción CASSCF. El resultado vertical CASPT2 para el estado 2^1A_g del *all-trans*-1,3,5,7-hexatrieno es 6.27 eV y puede ser considerado un buen valor de referencia ya que el método CASPT2 tiene su precisión probada con los valores experimentales de las absorciones bifotónicas en su análogo hexatrieno.³⁸ Los métodos EOM-CCSD, CCSD(T) y CCSD(\tilde{T}), (el último es la versión no iterativa para la inclusión de excitaciones triples), difieren sus resultados 1.0, 0.7 y 0.5 eV respectivamente, del CASPT2.³⁹ Se puede encontrar situaciones más dramáticas cuando el problema es claramente multiconfiguracional, e incluso la inclusión de las triples excitaciones no permiten resultados precisos. Por ejemplo, la descripción EOM-CCSD del estado 2^1A_1 del ozono conduce a enormes errores de 5 – 6 eV que la inclusión de las excitaciones triples no es capaz de solventar.³² El problema más serio que presentan los métodos monorreferenciales es su incapacidad para describir estados degenerados, por ejemplo en el caso de intersecciones cónicas, lo que imposibilita su uso generalizado en fotoquímica.

Para mejorar la actuación de los métodos, en la descripción inicial de la función de referencia debe estar involucrada más de una configuración electrónica. Esta es la base de los métodos multiconfiguracionales.⁴⁰ Se requiere varias configuraciones para describir un proceso de rotura de enlaces o para tratar el camino de transición a lo largo de diferentes estados excitados donde se dan situaciones próximas a la degeneración. Los métodos en los que la función de onda viene definida por varias configuraciones se llaman de forma general MCSCF (Multiconfiguracional SCF) e implican la

optimización simultánea del orbital y de los coeficientes de la expansión CI. La aproximación CASSCF es la que mayor éxito ha tenido. En ella el espacio multiconfiguracional es generado utilizando el criterio químico para seleccionar orbitales y electrones específicos.^{41,42} Recordemos que la energía de correlación añadida por la inclusión de varias configuraciones es la llamada estática (o no dinámica, o energía de correlación de largo rango), que dependiendo del sistema y de la naturaleza de los estados electrónicos representa una importante fracción de la energía de correlación total. El resto de la correlación (la de corto rango, llamada correlación dinámica), tiene que ser añadida sobre la función de onda multireferencial. El MRCI (*MultiReferential Configuration Interaction*) es un método muy preciso pero en general inaplicable ya que al aumentar el número de excitaciones se convierte rápidamente en inabordable. Otra aproximación prometedora es la MRCC (*MultiReferential Coupled Cluster*). La presencia del método multiconfiguracional evita la necesidad de incluir excitaciones de orden superior en la expansión CC permitiendo resultados precisos a bajo coste. Sin embargo, todavía están en desarrollo algoritmos eficientes. Resultan más útil y prácticas las aproximaciones basadas en la teoría de perturbaciones MRPT (*MultiReference Perturbative*) como el CASPT2, donde se aplica la teoría de perturbaciones Møller-Plesset de segundo orden a la función de referencia CASSCF. Aunque esta metodología no está libre de problemas como el tamaño de la referencia y la no ortogonalidad de las soluciones obtenidas, la aproximación CASPT2 (y sus extensiones LS-CASPT2, MS-CASPT2) es con diferencia la más aplicable de forma general y el método más preciso para calcular cualquier tipo de estados excitados en todo tipo de moléculas (capa

abierta o cerrada, aniones, cationes, situaciones disociativas, casos de degeneración, intersecciones cónicas, estados multiexcitados...).

La técnica TD-DFT (*Time-Dependent Density Functional Theory*), se está convirtiendo día a día más y más popular a causa de su simplicidad y su aparente comportamiento de caja negra. Como en los Métodos de Propagador se obtiene la energía de excitación y el momento de transición dipolar evitando el cálculo de un estado explícito. De momento, se puede decir que las aproximaciones TD-DFT no tienen rival *ab initio*, en cuanto a tiempo computacional, cuando se calculan estados excitados en moléculas de gran tamaño. Sin embargo, la desventaja del TD-DFT es muy notable. La mejora de los métodos *ab initio* será posible conforme avance la tecnología, pero no existe una dirección privilegiada para la mejora de los métodos DFT más allá del cambio de la parametrización de los potenciales, lo cual no parece una alternativa muy prometedora, si se tiene en cuenta la larga experiencia con los métodos semiempíricos. El TD-DFT puede únicamente ofrecer una ilustración cualitativa del espectro electrónico. Tomando de la literatura una de las muchas calibraciones existentes vemos que la aproximación TD-DFT, usando el popular funcional B3LYP, muestra de promedio 0.4 eV de desviación en el cálculo de los estados excitados de 21 moléculas diferentes y bien conocidas.⁴³ Obviamente, están apareciendo constantemente nuevos funcionales y, por ejemplo, el PBE0 o el HCTH han obtenido buenos resultados. Sin embargo, sólo técnicas corregidas empíricamente como el método DFT/MRCI dan una descripción balanceada de los estados excitados. Las preguntas obvias que plantea la utilización del DFT son: ¿cómo mejorar los resultados

cuando se usan funcionales DFT? y ¿se obtienen resultados de poder predictivo?

Resumiendo las ventajas y desventajas de los distintos métodos vemos que los monoconfiguracionales *ab initio* pueden ser útiles para describir energías de excitación y propiedades del estado excitado siempre que el problema esté subordinado a ciertas restricciones y, de hecho, los métodos derivados del CIS no son recomendables en prácticamente ninguna situación. A partir de cuidadosos calibrados TD-DFT se puede obtener una descripción de bajo nivel, pudiendo ser la aproximación DFT/MRCI la más plausible. En cuanto a los Métodos de Propagador tienen la ventaja de tener un comportamiento parcial como caja negra pero, aunque se pueden obtener representaciones cualitativas del espectro, no sirven para todos los sistemas. Finalmente, las aproximaciones Coupled Cluster que incluyen las excitaciones triples dan en muchos sistemas resultados precisos, aunque no en todos. En cuanto a propiedades moleculares y de transición, los métodos basados en CC son claramente los procedimientos de mayor precisión disponibles actualmente, aunque son computacionalmente muy pesados y es esencial realizar mejoras en su rendimiento. Para tener una descripción precisa de todos tipos de estados excitados, el método más potente del que se dispone actualmente es el CASPT2 ya que representa el único método aplicable de forma general para el cálculo de la correlación electrónica y, en particular, para estados excitados en todo tipo de sistemas moleculares, capa abierta o cerrada, multiconfiguracional, así como en situaciones de degeneración disociaciones, etc... Es esperable que en un futuro próximo, la aproximación CC multiconfiguracional tenga un uso práctico para

sistemas moleculares de tamaño razonable y es de esperar que entonces se podrán obtener resultados de alta precisión. No hay que olvidar que el completo desarrollo de los métodos requiere también de la implementación de optimizadores de geometría, algoritmos de los caminos de reacción, etc, y pasará un tiempo antes de que todas las herramientas necesarias estén disponibles.

4.6.2. Efectos diferenciales de la correlación electrónica

Para completar esta sección sobre metodología química cuántica aplicada al estudio de estados excitados sería conveniente detallar el problema inherente que existe en la mayor parte de cálculos en química cuántica debido a los diferentes efectos que puede tener la correlación electrónica. Como ejemplo, nos podemos centrar en la discusión de estructuras moleculares, una de las etapas más comunes y que más tiempo consumen en la química computacional. Existe una estrategia típica que consiste en el uso de metodologías de bajo nivel para localizar geometrías puntuales (la de los mínimos, estados de transición, intersecciones cónicas...) y corregir luego su energía utilizando un método de nivel más alto. Implícito en este procedimiento está el problema de los efectos diferenciales de la correlación. Repasemos por ejemplo que ocurre en el caso de la localización de una intersección cónica. Un protocolo usualmente utilizado es el CASPT2//CASSCF, en el que las geometrías se optimizan a nivel CASSCF y sobre estas estructuras se calculan las energías a nivel CASPT2. El cálculo CASSCF incluye la correlación no dinámica y proporciona una función de onda que describe cualitativamente los estados electrónicos. El resto de

correlación dinámica se incluye a través del tratamiento perturbativo, CASPT2. Dependiendo de la naturaleza del estado, los efectos de la correlación estática y dinámica pueden diferir afectando directamente a la descripción de la hipersuperficie. A modo de ilustración del problema en la Figura 4.7 se resume lo que se llaman efectos diferenciales de la correlación, en la localización de un cruce con el protocolo CASPT2//CASSCF. Es importante recalcar que este es un problema general de la química cuántica cuando dos niveles de teoría distintos se están utilizando para calcular energías y geometrías (CCSD(T)//CCSD o MRCI//CASSCF). Volviendo a nuestro ejemplo se pueden dar dos situaciones. En el caso de que las PES calculadas a nivel CASSCF y CASPT2//CASSCF muestran un comportamiento aproximadamente paralelo (Caso A), las geometrías optimizadas a nivel CASSCF serán por lo general correctas, a pesar de ser calculadas a un nivel inferior de teoría. Esto significa que, de la PES, la correlación dinámica contribuye de forma casi regular a los dos estados. En estas situaciones la estrategia CASPT2//CASSCF puede ser aplicada con confianza. Cuando la correlación dinámica es marcadamente diferente para los estados considerados y varía significativamente a lo largo del PES de interés, la geometría de optimización debe ser llevada a cabo al más alto nivel de cálculo (Caso B). De no ser así, las distintas contribuciones de la correlación dinámica pueden conducir a imprecisiones en la determinación de los cruces o interacciones entre los dos estados. El cruce puede estar realmente situado a otra geometría o incluso no ocurrir. Normalmente, un estado de naturaleza iónica (en el sentido del enlace de valencia) tiene grandes cantidades de correlación dinámica, en contraste con los estados covalentes, en los cuales la

correlación estática es capaz de cubrir la mayor fracción de la correlación total. Cuando ambos tipos de estados están incluidos en un cruce, la descripción CASSCF dará una visión desbalanceada de la hipersuperficie y por tanto del cruce, que puede ser solucionada incluyendo sólo la correlación dinámica por medio del método CASPT2 en la búsqueda del cruce entre estados.

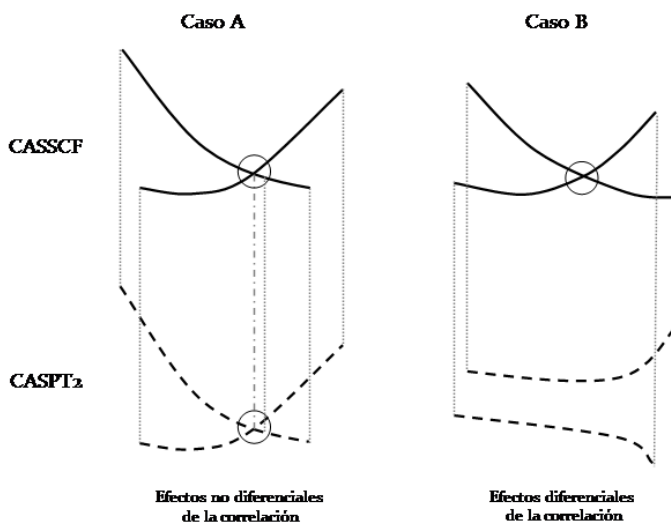


Figura 4.7.- Efectos diferenciales de la correlación electrónica.

Siempre que tratemos un problema utilizando la química cuántica no se puede olvidar que la selección de un buen conjunto de base monoeléctronica es la primera decisión a tomar para plantear un cálculo y va a determinar la precisión de los resultados obtenidos. En general, los cálculos de estados excitados requieren el uso de una base grande, difusa y flexible para describir al mismo nivel estados de naturaleza compacta como los de valencia y/o difusos como los estados

Rydberg o los aniónicos. Los orbitales naturales atómicos suplementados con funciones de base difusas o los conjuntos de base del tipo *augmented correlation-consistent* (aug-cc-pVXZ, con $X = D, T, Q, \dots$), son en general la mejor elección para representar todo tipo de estados excitados en las diferentes regiones del espectro. A causa de su construcción balanceada, los ANO suelen ser los que dan los mejores resultados con un menor número de funciones de base que otros tipos de conjuntos. En un cálculo típico de espectroscopia electrónica para una molécula de tamaño medio, una contracción ANO de tipo triple-zeta más polarización ha demostrado dar resultados precisos y fiables para estados de valencia. Para calcular estados aniónicos o Rydberg son necesarias funciones difusas específicas con pequeños exponentes en las gaussianas, situadas bien en los átomos o bien centradas en las moléculas. Conjuntos de base como el 6-31G* no son demasiado precisos, aunque considerablemente baratos desde un punto de vista computacional, y deben ser cuidadosamente calibrados para el estudio del problema en cuestión. Pueden utilizarse en el caso de que los estados Rydberg no sean competitivos con los estados de valencia en el rango de la región de energía de interés.

4.6.3. Caminos de mínima energía (MEPs).

Se ha mencionado anteriormente que, tras la absorción de energía, la molécula recorre un camino de mínima energía (*Minimum Energy Path*, MEP) desde la disposición inicial, Franck-Condon, hacia el mínimo del estado excitado. Es interesante conocer cual es este camino, puesto que a lo largo del mismo se pueden producir cruces con otras

hipersuperficies que van a determinar el comportamiento fotoquímico y fotofísico del sistema. El procedimiento que se suele utilizar para la determinación del MEP que une dos puntos de una PES es el que se conoce como el de máximo descenso.⁴⁴ Se basa en una modificación del algoritmo de optimización restringida de Anglada y Bofill⁴⁵ y sigue la aproximación de Müller-Brown.⁴⁶ Consiste en realizar sucesivas optimizaciones de geometría (o lo que es lo mismo, minimizaciones de la energía, por ejemplo a nivel CASSCF) pero restringidas dentro de una hiperesfera de energía potencial entorno a la PES que está centrada en la geometría inicial. Esta hiperesfera tendrá un radio predefinido. La estructura optimizada que se obtiene tras el primer paso se toma como centro de una nueva hiperesfera del mismo radio, y este procedimiento se repite hasta alcanzar el mínimo energético de la superficie. Se utilizan las coordenadas ponderadas en la masa, y por eso la coordenada del MEP responde a la llamada Coordenada Intrínseca de Reacción (IRC). Cada etapa de la abscisa de coordenadas corresponde a un paso el MEP calculado con una hiperesfera de un radio determinado (ver Figura 4.8).

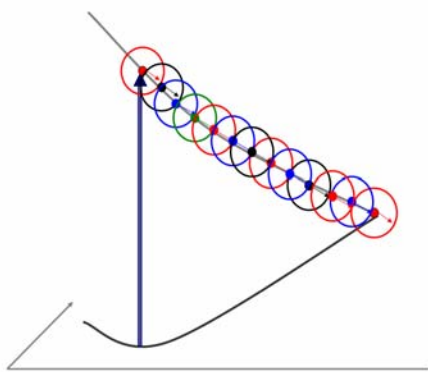


Figura 4.8. Representación esquemática del proceso de cálculo de un MEP.

References

-
- ¹ Klessinger M.; Michl, J. In *“Excited States and Photochemistry of Organic Molecules”*, VCH Publishers: New York, **1995**.
 - ² McHale, J. L. In *“Molecular Spectroscopy”*, Prentice Hall: Upper Saddle River, **1999**.
 - ³ Serrano-Andrés L.; Merchán, M. *“Spectroscopy: Applications”*. In *“Encyclopedia of Computational Chemistry”*. Schlegel Ds. P. v. P. et al.; Wiley, Chichester.
 - ⁴ Born, M.; Oppenheimer, J. R. *Ann. Physik* **1927**, *84*, 457.
 - ⁵ Teller, E. *J. Phys. Chem.* **1837**, *41*, 109.
 - ⁶ Zimmerman, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1566.
 - ⁷ Michl, J. *J. Mol. Photochem.* **1972**, *243*.
 - ⁸ Stevens, B.; Hutton, E. *Nature (London)*, **1960**, *186*, 1045.
 - ⁹ Calas, R.; Lalande, R. *Bull. Soc. Chim. France.* **1959**, 763-5, 770-2.
 - ¹⁰ Leonhardt, H.; Séller, A.; Bunsenges. V. *Phys. Chem.*, **1963**, *67*, 791.
 - ¹¹ Mataga, N.; Okada, T.; Ookari, H. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1966**, *39*, 2563.
 - ¹² Turro, N. J. *“Modern Molecular Photochemistry”*; University Science Books Ed: Sausalito, **1991**.
 - ¹³ Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 836.
 - ¹⁴ Förster, T. *Ann. Phys. (Leipzig)* **1948**, *2*, 55.
 - ¹⁵ Birks, J. B. *“Photophysics of Aromatic Molecules”*. Wiley-Interscience Ed: New York, **1970**.
 - ¹⁶ Codgell, R. J.; Howard, T. D.; Bittl, R.; Schlodder E.; Geisenheimer, I.; Lubitz, W. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **2000**, *355*, 1345.

- ¹⁷ Foote C. S.; Denny, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6233.
- ¹⁸ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. "Ab initio methods for excited states" In "Computational Photochemistry", Olivucci M. Ed. Elsevier: Amsterdam, **2005**.
- ¹⁹ Foresman, J. B.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A.; Frisch, M. J.; *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 135.
- ²⁰ Head-Gordon, M.; Rico, R. J.; Oumi, M.; Lee, T. *J. Chem. Phys. Lett.*, **1994**, 219, 21.
- ²¹ Cramer, C.J. In "Essentials of computational chemistry"; Wiley Ed; Chichester, 2002.
- ²² Molina, V.; Smith, B. R.; Merchán, M. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 309, 486.
- ²³ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Jablonski, M. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 4294.
- ²⁴ Borin, A. C.; Serrano-Andrés, L.; Ludwig, V.; Canuto, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 5001.
- ²⁵ Oliva, J. M.; Azenha, M. E. D. G.; Burrows, H. D.; Coimbra, R.; Seixas de Melo, J. S.; Canle L., M.; Fernández, M. I.; Santaballa, J. A.; Serrano-Andrés, L. *ChemPhysChem*, **2005**, 6, 306.
- ²⁶ Oddershede, J. *Adv. Chem. Phys.* 1987, 69, 201.
- ²⁷ Jorgensen, P.; Simons, J. In "Second quantization-based methods in quantum chemistry"; Academic Press: New York, **1981**.
- ²⁸ Nielsen, E. S.; Jorgensen, P.; Oddershede, J. *Chem. Phys.*, **1980**, 73, 6238.
- ²⁹ Packer, M. J.; Dalskov, E. K.; Enevoldsen, T.; Jensen, H. J. Aa; Oddershede, J. *J. Chem. Phys.* **1996**, 105, 5886.
- ³⁰ Rogh, J. W.; Olsen, J.; *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 344, 578.
- ³¹ Tobita, M.; Perera, S. S.; Musial, M.; Bartlett, R. J.; Nooijeen, M.; Lee, J. S. *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119, 10713.
- ³² Kowalski, K.; Piecuch, P. *J. Chem. Phys.* **2004**, 120, 1715.

- ³³ Helgaker, T.; Jorgensen, P.; Olsen, J. In *"Molecular Electronic-Structure Theory"*. Wiley Ed: Baffins Lane, **2000**.
- ³⁴ Nakatsuji, H. *Chem. Phys. Lett.* **1979**, 67, 344.
- ³⁵ Stanton, J. F.; Barlett, R. J.; *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 7029.
- ³⁶ Christiansen, O.; Koch, H.; Jorgensen, P.; *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, 243, 409.
- ³⁷ Hirao, K. *J. Chem. Phys.*, **1991**, 95, 3589.
- ³⁸ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Nebot-Gil, I.; Lindh, R.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 3151.
- ³⁹ Watts, J. D.; Barlett, R. J.; *Chem. Phys. Lett.* 1996, 258, 581.
- ⁴⁰ Hirao, K. Ed. In *"Recent Advances in Multireference Methods"*, World Scientific Publishing: Singapore, **1999**.
- ⁴¹ Roos, B.O.; Taylor, P. R. *Chem. Phys*, **1980**, 48, 157.
- ⁴² Roos, B.O. *Adv. Chem. Phys.* **1987**, 69, 399.
- ⁴³ Fabian, J.; Diaz, L. A.; Seifert, G.; Niehaus, T. *J. Mol. Struct. Teochem.* **2002**, 594, 41.
- ⁴⁴ De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comp.* **2005**, 1, 1029–1037.
- ⁴⁵ Anglada, J. M.; Bofill, J.M. *J. Comp. Chem.* **1997**, 18, 992–1003.
- ⁴⁶ Müller, K.; Brown, L. D. *Theor. Chim. Acta.* **1979**, 53, 75–93.



*"No hay gen para el
espíritu humano"*

Vincent Freeman/Jerome Morrow

GATACCA

Andrew Niccol, 1997

**5. EXCÍMEROS DE LAS
NUCLEOBASES DEL DNA.
FORMACIÓN Y PAPEL
DE LOS MISMOS EN SU
FOTOQUÍMICA Y
FOTOFÍSICA**

5 EXCÍMEROS DE LAS NUCLEOBASES DEL DNA. FORMACIÓN Y PAPEL DE LOS MISMOS EN SU FOTOQUÍMICA Y FOTOFÍSICA

La irradiación del material genético, DNA, con luz UV origina una serie de fenómenos que no tienen lugar si son irradiadas sólo las bases púricas y pirimidínicas del DNA. La naturaleza de los estados excitados de los multímeros de nucleobases depende tanto de la conformación de los mismos como de su secuencia.^{1,2,3,4,5,6,7,8} Entre los fenómenos espectroscópicos que se observan al pasar de los monómeros a los multímeros, destacan el hipocromismo de la banda de menor energía y el decrecimiento del potencial de ionización,^{1,7} si bien, puede que la característica más interesante de la irradiación del DNA con luz UV sea la aparición de estados de emisión con una vida media larga desplazados hacia el rojo respecto a las emisiones de los monómeros.^{7,8,9} Todo apunta a que el acoplamiento electrónico que se puede producir entre nucleobases apiladas es el responsable de estos fenómenos. Sin embargo, este acoplamiento no es suficientemente grande como para afectar significativamente al espectro de absorción de los biopolímeros, que prácticamente representa la suma de los espectros de sus monómeros constructores. Por esta razón, generalmente se asume que cuando se ilumina DNA con radiación UV, la luz inicialmente es absorbida por las bases de los ácidos nucleicos conduciéndolas a estados excitados de la misma multiplicidad que su estado fundamental. Los estados excitados de las bases del DNA más bajos en energía y que son accesibles por absorción de luz se encuentran alrededor de los 5 eV.^{1,7}

El mencionado desplazamiento al rojo de la fluorescencia es un fenómeno que se observa tanto para nucleótidos de una sola cadena como para aquellos de cadena doble. En la literatura se utiliza para esta emisión el término Fluorescencia de Excímero (*excimer fluorescence*), tal y como propuso Eisenger por primera vez.⁸ Esta denominación hace referencia a la asignación del excímero como origen de la fluorescencia desplazada hacia el rojo (*redshifted fluorescence*) y se fundamenta en que esta emisión se encuentra de un modo muy similar tanto en polinucleótidos como en dinucleótidos. En la última década, gracias al desarrollo de nuevas técnicas espectroscópicas, se ha podido obtener valiosa información experimental a ese respecto. Plessow y sus colaboradores han realizado un estudio en el que usando la técnica de fluorescencia con resolución en el tiempo y en la longitud de onda (*time-and wavelength-resolved*) con pulsos de excitación de 80 picosegundos (ps) es posible la identificación de las componentes de decaimiento lento y la emisión desplazada al rojo (atribuida al excímero).⁹ Según sus resultados, en particular para la citosina (C), en el oligonucleótido 15-mer d(C)₁₅ queda patente un claro decaimiento de varios nanosegundos (ns). Si se compara con el que se observa en el dímero d(C)₂, el decaimiento en este último resulta ser menos intenso, mientras que en el mononucleótico, CMP, el decaimiento es muy limitado y breve. Precisamente debido a que la velocidad de la relajación es más lenta en los multímeros, esos estados de tipo excímero y relativa larga vida media se han sugerido como precursores de las fotolesiones del DNA que incluyen la formación de fotodímeros.^{1,10} Por otra parte, un estudio realizado por Kohler y su equipo ha mostrado, gracias a la utilización de la técnica de espectroscopia de absorción transitoria

(*transient absorption spectroscopy*), que los excímeros se forman con altos rendimientos en una gran variedad de oligonucleótidos sintéticos de DNA y concluyen que las dinámicas del estado excitado de A · T DNA está controlada precisamente por el apilamiento de las bases.²

A pesar de que en la literatura experimental es muy nombrada la existencia de estados excitados de tipo excímero o exciplejo de las nucleobases, hasta el momento en que se realizó esta investigación no existían estudios *ab initio* que lo apoyaran. Fue en este escenario, en el que se decidió llevar a cabo cálculos químico-cuánticos precisos (y por tanto predictivos) sobre los excímeros de las nucleobases en *vacuo* usando el método CASPT2^{11,12,13} implementado en el programa MOLCAS 6.0.¹⁴

Los siguientes apartados analizan la existencia y naturaleza de los excímeros, así como su comportamiento como precursores de la formación de fotoproductos entre las bases del DNA y como responsables de sus características fotofísicas. Los sistemas elegidos para realizar estos trabajos van a ser por una parte el homodímero de citosina, como ejemplo de base pirimidínica, y el homodímero de adenina, representativo de una base púrica

5.1. Hacia la Comprensión de la Fluorescencia del DNA: El excímero Singlete de Citosina

- Construcción de las PECs del homodímero neutro de citosina en conformación cara-a-cara

Para establecer de forma teórica la existencia de los excímeros de citosina se analizan las energías de enlace de diferentes estados del homodímero neutro. Como una primera caracterización de los excímeros singlete más bajos en energía, se construyen las curvas de energía potencial (PECs) de estos estados respecto a la separación intermolecular (R) de dos monómeros de citosina, teniendo en cuenta las consideraciones que se comentan a continuación.

La geometría de equilibrio empleada para el monómero de citosina es la optimizada a nivel CASSCF utilizando el conjunto de base monoeléctrico de orbitales atómicos naturales (ANO) de primitivas C,N,O(10s6p3d)/H(7s3p), el conjunto ANO-S,¹⁵ contraído a C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]. El espacio activo empleado comprende ocho electrones distribuidos en siete orbitales moleculares π , lo que corresponde al sistema completo π excepto por el orbital más profundo de esta naturaleza que, localizado principalmente en el átomo de N del fragmento NH₂, se mantiene inactivo. Su exclusión del espacio activo se fundamenta en que cuando este orbital se incluye, el número de ocupación correspondiente a su orbital natural CASSCF se aproxima a 2.0 y, por tanto, es de esperar que su contribución a los estados excitados involucrados en este estudio no sea relevante. Esta geometría optimizada, cuyos parámetros más importantes pueden ser vistos en la

Figura 5.1, es la que mantienen invariable los monómeros de citosina en toda las PECs construidas a nivel CASPT2 (también utilizando el conjunto de base C,N,O [3s2p1d]/H[2s1p]).

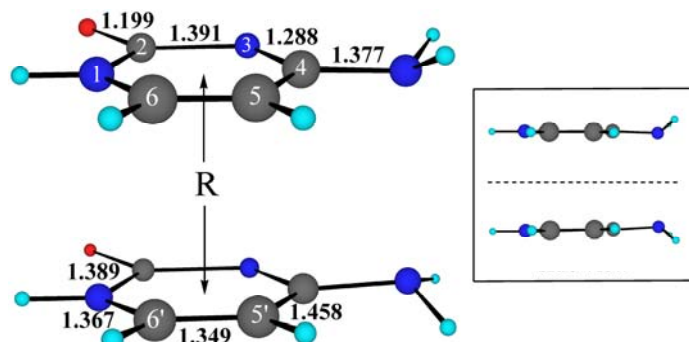


Figura 5.1. Numeración de los átomos en el dímero de citosina. Las distancias de enlace (en Å) corresponden a la geometría de equilibrio del estado fundamental del monómero calculada a nivel CASSCF(8,7)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]. El sistema formado por el homodímero tiene simetría C_s , siendo representado el plano de simetría por la línea discontinua de la vista lateral que aparece en el recuadro.

Para llevar a cabo el estudio del homodímero, se imita, en cierto sentido, la interacción de ambas citosinas en el DNA escogiendo un estereoisómero *cis-syn* con una disposición cara-a-cara y paralela. El espacio activo utilizado para los cálculos sobre el conjunto de las dos citosinas es el equivalente al que se había seleccionado para la optimización del monómero, pero en este caso dos orbitales moleculares π del ciclo son tratados también como inactivos. Estos corresponden a los MO π totalmente en fase de cada una de las citosinas. Esta decisión se basa en que el número de ocupación de sus correspondientes orbitales naturales cuando se consideran activos es prácticamente 2.0, y por tanto no se van a ver involucrados en las transiciones electrónicas que se estudian. Este sistema se describe en primera instancia a través de la

función de onda CASSCF(12,12), incluyendo cuatro raíces en el procedimiento promedio (*state-average procedure*). Posteriormente, se incluyen las correcciones de segundo orden a través de la metodología CASPT2(12,12), utilizando la técnica del *level shift* imaginario con un parámetro de 0.2 au¹⁶ para minimizar las interacciones débiles causadas por estados intrusos. Aunque como se puede observar en la Figura 5.1 el sistema tiene simetría espacial C_s, las PECs con respecto a R se calcularon sin restricciones de simetría (que en la práctica se traduce en un cálculo con simetría C₁). Este es un factor muy importante ya que la ruptura de simetría es un prerequisite necesario para describir correctamente el límite asintótico para las transiciones electrónicas más bajas de las dos moléculas.¹⁷ Los resultados obtenidos teniendo en cuenta todas estas consideraciones aparecen en la Figura 5.2.

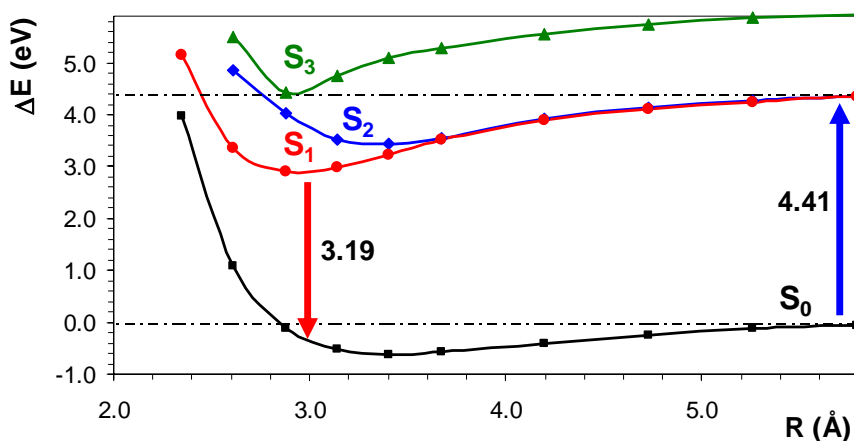


Figura 5.2. Curvas de energía potencial CASPT2(12,12)/ANO-S construidas respecto a la distancia intermolecular $R(C_5-C_5')$ de dos moléculas de citosina con apilamiento- π y conformación cara-a-cara.

- Análisis de las PECs del homodímero neutro de citosina en conformación cara-a-cara

En las curvas construidas a nivel CASPT2(12,12) existen mínimos bien definidos con energías de enlace de unas decenas de eV tanto para el estado fundamental (S_0) como para los estados excitados más bajos, como se puede observar en la Figura 5.2, donde R es la distancia intermolecular R (C_5-C_5') escogida para monitorizar el proceso, ya que es particularmente relevante en la formación de fotodímeros de tipo ciclobutano. La consideración de la energía de correlación mediante el tratamiento perturbativo es crucial para conseguir unos resultados correctos, ya que a nivel CASSCF(12,12) los resultados indicaban que el estado fundamental era repulsivo y el estado excitado más bajo en energía débilmente enlazante.

Las energías de la Figura 5.2 están referidas a dos moléculas de citosina en su estado fundamental separadas por una distancia (R) de 20 au. En el límite asintótico S_1 y S_2 están degenerados y se relacionan con las situaciones equivalentes de $C + C^*$ y $C^* + C$ (donde C y C^* representan al estado fundamental de la citosina y su estado excitado singlete más bajo respectivamente). Por tanto, la absorción $S_0 \rightarrow S_1$ calculada a 20 au corresponde a la absorción del monómero que a este nivel de cálculo es de 4.41 eV, lo que concuerda con previos resultados y evidencias experimentales.^{18,19,20} Este valor disminuye en aproximadamente medio eV cuando se calcula con simetría C_s debido a que la localización de la energía de excitación en un monómero no está permitida por restricciones de la simetría. Sin embargo, a distancias

intermoleculares cortas, las funciones de onda CASSCF(12,12) están completamente deslocalizadas sobre las dos moléculas y los estados S_1 y S_2 correlacionan con las funciones de onda $1^1A''$ y $2^1A'$ de la simetría C_s , respectivamente. S_1 se caracteriza por estar descrito principalmente por promociones monoeléctricas entre los monómeros (configuración con un 69% de peso) y S_2 por configuraciones que incluyen también transiciones monoeléctricas pero dentro del mismo monómero (configuraciones con un 40% de peso). Puesto que S_3 está relacionado con estados excitados más altos del monómero, que no son de interés inmediato para el presente estudio, no se discutirá sobre él. La emisión vertical desde la estructura del mínimo de S_1 , $(S_1)_{\min}$, se calcula a 3.19 eV. Este resultado, en principio, concuerda sorprendentemente con el máximo de la fluorescencia observada en disolución acuosa para el dímero $d(C)_2$ y el 15-mer $d(C)_{15}$ ($\lambda_{\max} = 385$ nm; 3.22 eV),⁹ que está considerablemente desplazada hacia el rojo comparado con la del monómero ($\lambda_{\max} = 313$ nm; 3.96 eV).²¹ No obstante, este resultado podría estar afectado por el error de superposición de base (BSSE) que hasta este momento no se había tenido en cuenta que pasamos seguidamente a considerar.

- **Análisis del Error de Superposición de Base**

En primer lugar, con objeto de ilustrar la importancia del BSSE se calcula éste para los estados de interés (S_0 , S_1 , y S_2) "a posteriori" en el mínimo de la PECs CASPT2(12,12), como es una práctica habitual cuando se realizan estudios teóricos. Los resultados espectroscópicos más importantes obtenidos de este modo aparecen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Energía de enlace (E_b), error de superposición de base (BSSE) obtenido a través del método counterpoise (CP-BSSE) y energía de enlace corregida (CP- E_b) calculados a nivel CASPT2(12,12)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] en los mínimos de las PECs del estado fundamental y los estados excitados más bajos del dímero de citosina representados en la Figura 5.1. Las distancias se dan en Å y las energías en eV.

Estado	R(C ₅ -C ₅)	E_b	CP-BSSE	CP- E_b
A la estructura del (S ₀) _{min} :				
S ₀	3.416	0.62	0.77	-0.15
A la estructura de (S ₁) _{min} :				
S ₁ ^a	2.954	1.51	0.97	0.54
S ₀	2.954	0.29	0.97	-0.68
A la estructura de (S ₂) _{min} :				
S ₂	3.376	0.99	0.74	0.25

^a La emisión vertical (fluorescencia) CASPT2(12,12) que incluye la corrección CP-BSSE conduce a 3.19 eV, como resultado de (4.41 eV - 0.54 eV - 0.68 eV).

La energía de enlace (E_b) ha sido obtenida como:

$$E_b(C C^*) = E_C + E_{C^*} - E_{C^*C} \quad (5.1)$$

E_C y E_{C^*} son la energía total del estado fundamental (C) y del estado excitado (C*), respectivamente, calculadas ambas a la geometría de equilibrio del estado fundamental de la citosina. E_{C^*C} representa la energía total de la supermolécula C^{*}C para una geometría dada. La correcta energía de enlace corregida con el método counterpoise (CP)²² (CP- E_b) viene dada por la expresión:

$$CP-E_b(C^*C) = E_b(CC^*) - [CP-BSSE(C^*C)] \quad (5.2)$$

donde

$$CP-BSSE(C^*C) = E_{C^*}(C, R=\infty) - E_{C^*}(C, R=C^*C) + E_C(C^*, R=\infty) - E_C(C^*, R=C^*C) \quad (5.3)$$

Para calcular el CP- E_b del estado fundamental la C^* en estas expresiones debe ser, lógicamente, sustituida por C. La geometría de los monómeros se mantiene fija en la supermolécula. La notación $E_{C^*}(C, R=C^*C)$ indica que se calcula la energía de C^* en presencia de los orbitales fantasma de C a la geometría de C^*C , mientras que en $E_{C^*}(C, R=\infty)$ los orbitales moleculares de C están a una distancia infinita de C^* . Las energías para $E_C(C^*, R)$ y $E_{C^*}(C, R)$ se obtienen a nivel CASPT2(6,6). Las funciones de onda CASSCF(6,6) utilizadas se han calculado a través del promedio de las dos raíces más bajas en energía y comprenden los orbitales moleculares del espacio activo equivalentes al respectivo cálculo CASSCF(12,12) de la supermolécula. De este modo, el único factor que influye en la variación de la energía es el considerado a través del tratamiento del BSSE.

Lo primero que se puede observar cuando se incluye el BSSE es que la energía de enlace del estado fundamental del sistema a la distancia intermolecular de 3.416 Å (donde se obtiene para este estado un mínimo a nivel CASPT2(12/12) de 0.62 eV), cambia totalmente al incluir el BSSE (-0.15 eV), de forma que el sistema no está ahora enlazado en su estado fundamental. Es decir, a 3.416 Å el estado fundamental de la supermolécula está 0.15 eV más alto en energía que la suma de las energías de los estados fundamentales de los monómeros. Esto indica que las correcciones CP-BSSE son importantes y no pueden en principio ser ignoradas.

Con el fin de evaluar la influencia que el conjunto de base escogido puede tener en la magnitud del BSSE (en este tipo de sistemas) se realiza un estudio a nivel de cálculo SCFPT2, (que sería un cálculo equivalente al MP2 pero con un parámetro de *level shift* imaginario de 0.2), utilizando varios conjuntos de base. En la Tabla 5.2 aparecen recopilados los resultados. Empleando el conjunto de base C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] (al que se nombrará a lo largo de toda esta discusión como conjunto de base A) el CP-E_b es muy similar al que se había calculado previamente a nivel CASPT2(12,12): -0.15 eV (CASPT2) y -0.12 eV (SCFPT2). Si se utiliza la base B, (perteneciente a las denominadas ANO-L²³), que tiene el mismo esquema de contracción que la base A pero con un conjunto mayor de primitivas implicadas, también se obtiene un resultado similar, -0.11 eV. La convergencia del valor de CP-E_b con el tamaño del conjunto de base es lenta. Con el conjunto de base H, el más grande de los considerados en este estudio, la interacción entre las dos citosinas es repulsiva (0.04 eV, 0.94 kcal/mol) lo que está de acuerdo con estimaciones previas en estructuras equivalentes (2.54 kcal/mol).²⁴ Cuando se usa la base B es sistema es 0.07 eV más repulsivo que si se utiliza el conjunto de base H. Observando los resultados de la Tabla 5.2 se puede concluir que utilizando el conjunto de base B, o el A que conduce a resultados equivalentes, se puede calcular el CP-E_b con una precisión de ±0.1 eV. Siguiendo un razonamiento análogo, es de suponer que para el estado excitado la influencia del conjunto de base sea similar y que por tanto también se puede calcular su CP-E_b con esa precisión, lo cual se corroborará posteriormente. Por otra parte, el conjunto de base segmentado L, que es mucho menos difuso pero de calidad comparable al del conjunto de base A, conduce a resultados

similares ($CP-E_b = -0.15\text{eV}$), aunque el E_b y el CP-BSSE son totalmente diferentes con respecto a los resultados ANO-S.

Tabla 5.2. Patrón de convergencia de la energía de enlace (E_b), del error de superposición de base (BSSE) obtenido a través del método counterpoise, y de la energía de enlace corregida ($CP-E_b$) respecto al aumento del conjunto de base calculado a nivel SCFPT2 para el estado fundamental (S_0) del excímero del dímero de citosina a la distancia intermolecular $R(C_5-C_5') = 3.416 \text{ \AA}$. Energías en eV.

Conjunto de Base	N^a	E_b	CP-BSSE	CP- E_b
ANO-S con esquema de contracción general^b				
A: C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]	274 (848)	0.64	0.76	-0.12
ANO-L con esquema de contracción general^c				
B: C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]	274 (1176)	0.67	0.78	-0.11
C: C,N,O[4s3p2d]/H[2s1p]	418 (1176)	0.41	0.47	-0.06
D: C,N,O[4s3p2d]/H[3s2p]	458 (1176)	0.42	0.47	-0.05
E: C,N,O[5s4p2d]/H[2s1p]	482 (1176)	0.30	0.36	-0.06
F: C,N,O[5s4p2d]/H[3s2p]	522 (1176)	0.30	0.35	-0.05
G: C,N,O[5s4p2d1f]/H[2s1p]	594 (1512)	0.21	0.26	-0.05
H: C,N,O[4s3p2d1f]/H[3s2p1d]	620 (1662)	0.35	0.39	-0.04
ANO-L con contracciones adicionales chequeadas^c				
I: C,N,O[4s3p1d]/H[2s1p]	338 (1176)	0.34	0.44	-0.10
J: C,N,O[5s4p1d]/H[2s1p]	402 (1176)	0.17	0.27	-0.10
K: C,N,O[6s5p1d]/H[2s1p]	466 (1176)	0.12	0.21	-0.09
Para comparar, un conjunto de base segmentado^d				
L: cc-pVDZ [3s2p1d/2s1p]	274 (486)	0.05	0.20	-0.15

^aNúmeros de funciones de base (número de primitivas).

^bConjunto de primitivas: C,N,O(10s6p3d)/H(7s3p).¹⁵

^cConjunto de primitivas: C,N,O(14s9p4d3f)/H(8s4p3d).²⁵

^dConjunto de primitivas: C,N,O(9s4p1d)/H(4s1p).²⁶

Según se puede extraer de los resultados de la Tabla 5.1, al nivel de teoría más alto, es decir, con la inclusión del BSSE y teniendo en cuenta la precisión con la que se estima el CP-E_b, tanto S₁ como S₂ son enlazados. De acuerdo con su naturaleza el mínimo de S₂ está a distancias más largas R(C₅-C_{5'}) que la calculada para el mínimo de S₁. A causa de la cancelación de errores en el BSSE, que son del mismo orden tanto para S₀ y S₁, tal y como apuntábamos, la emisión vertical permanece igual que el resultado directo CASPT2(12,12) una vez que el BSSE ha sido tenido en cuenta. Por esta razón y puesto que el conjunto de base A ya posee suficiente flexibilidad para describir los estados excitados implicados, cualquier mejora en el conjunto de base no produciría cambios significativos en las emisiones verticales verticalmente (0.04 eV con el conjunto de base I).

Sin embargo, todavía queda una cuestión por comprobar que es si la inclusión del BSSE cambia la distancia de equilibrio intermolecular a la que se encuentra el mínimo de energía potencial. Para contestar esta cuestión se ha recalculado el PECs incluyendo el BSSE. El resultado aparece en la Figura 5.3. Cuando se considera el BSSE, el mínimo de S₁ se obtiene a una distancia intermolecular más corta, R(C₅-C_{5'}) = 3.076 Å. A esa distancia, la energía de enlace entre las dos moléculas es de 0.58 eV y la emisión vertical se calcula a 3.40 eV. Esta estructura constituye nuestra mejor estimación para el mínimo de S₁ en este tipo de conformación en el que las dos citosinas se mantienen apiladas paralelamente (permitiendo una alta interacción interelectrónica de tipo π) manteniendo la geometría de su estado fundamental a la optimizada a nivel CASSCF(8,7). A partir de ahora se va nombrar a esta estructura

$^1(\text{LE})$ (mínimo local del estado excitado S_1 , *locally excited state relative minimum on S_1*).

La diferencia en el resultado obtenido para la emisión vertical entre $^1(\text{LE})$ y $(S_1)_{\text{min}}$ es de 0.21 eV cuando se calcula en la PEC que no incluía el BSSE. Es importante resaltar que la diferencia en energías de emisión vertical calculadas sin (3.19 eV) y con (3.40 eV) corrección BSSE no proviene de la inclusión de la corrección a los estados correspondientes en una misma geometría, sino del cambio en la posición del mínimo del estado S_1 , 2.954 y 3.076 Å, respectivamente. De hecho, las correcciones a la energía CP-BSSE realizadas verticalmente a cada distancia R son, en la práctica, iguales para los distintos estados. No obstante, la emisión vertical no tiene contrapartida experimental y para realizar una correcta comparación se debería calcular la resolución vibracional de la banda

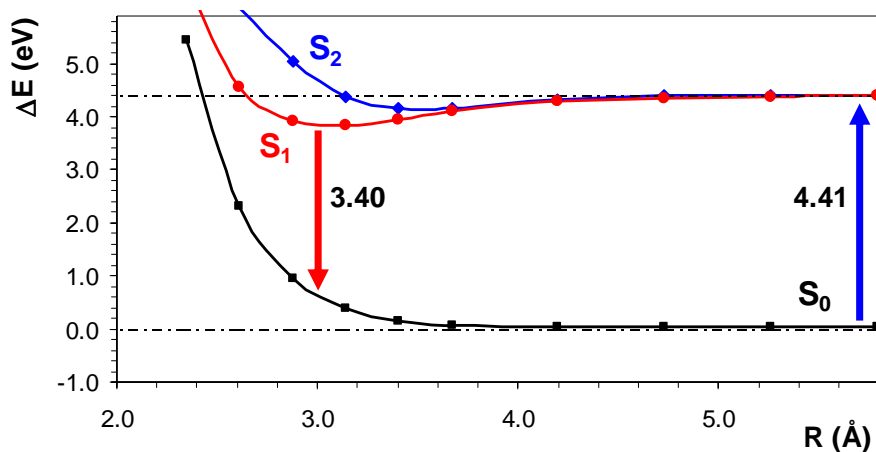


Figura 5.3. Curva de energía potencial a nivel BSSE-CASPT2(12,12)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] construida respecto a la distancia intermolecular $R(C_5-C_5')$ de dos citosinas dispuestas en apilamiento π cara-a-cara.

con el fin de determinar el máximo de la misma. A este respecto, el resultado calculado CASPT2(12,12) para la emisión vertical con (3.19 eV) o sin (3.40 eV) la inclusión del BSSE son igualmente razonables si se compara con los datos experimentales disponibles para dinucleótidos, polinucleótidos y DNA (3.2 – 3.4 eV).^{8,9}

- **Comparación de la estructura ¹(LE) con la del B-DNA**

En la Figura 5.4 aparecen dos moléculas de citosina en el estado fundamental con la conformación de tipo B-DNA²⁷ y la estructura correspondiente al ¹(LE).²⁸ Como se puede observar de las representaciones moleculares, el apilamiento de las citosinas en la conformación del B-DNA es muy diferente de la geometría ideal de sándwich que se requiere para producir un excímero totalmente estabilizado.²⁹ En el estado fundamental de la conformación B-DNA las distancias interatómicas R(C₅-C_{5'}) y R(C₆-C_{6'}) son unos 1.5 y 1.3 Å más largos que en la conformación ¹(LE). Además el ángulo diedro ∠ C₅-C₆-C_{6'}-C_{5'} varía de 0° en ¹(LE) a 38.6° en el B-DNA. Como consecuencia, el primer estado excitado singlete es 0.47 eV más estable en la disposición ¹(LE) que en el B-DNA, donde el estado vertical S₁ es sólo débilmente enlazante (0.11 eV) y la separación entre los estados S₁-S₂ muy pequeña (0.02 eV) reflejándose así el débil acoplamiento entre ellos. Debido a esto, las transiciones verticales 4.30 eV (S₁) y 4.32 eV (S₂) están también sólo débilmente desplazadas hacia el rojo al comparar con la transición vertical singlete-singlete de los monómeros de citosina.

Puesto que la estabilidad del excímero en la conformación paralela de las estructura ¹(LE) es considerablemente alta, respecto a la encontrada

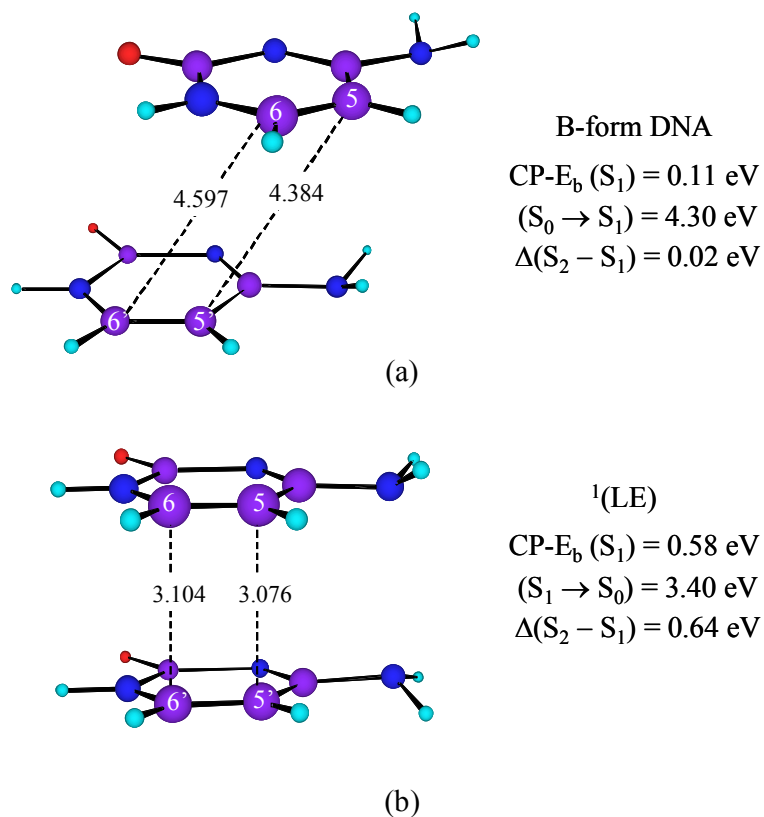


Figura 5.4. Estructuras para dos moléculas de citosina en su estado fundamental con la conformación estándar del B-DNA (a) y del mínimo local de S₁ de tipo ¹(LE). Las energías de enlace calculadas a nivel CASPT2 para el estado S₁ incluyen la corrección del BSSE a través de la corrección counterpoise (CP-E_b). También se recopilan las energías de absorción para las transiciones verticales (S₀ → S₁), la fluorescencia vertical (S₁ → S₀), así como la separación entre los dos estados excitados más bajos, Δ(S₂ → S₁). La distancia interatómica ese da en Å.

en el B-DNA, se puede considerar a las estructuras de este tipo como buenas candidatas a precursoras para la formación de fotodímeros. La formación de fotoproductos tipo dímero Pyr<>Pyr vía singlete partiendo de la estructura $^1(\text{LE})$ como precursora no va a ser tema de discusión a lo largo de esta tesis, pero un interesante estudio sobre esta posible vía de formación de CBC (ciclobutilcitosina) puede encontrarse en el artículo publicado en la revista JACS con título “*Molecular Basis of DNA Photodimerization*”,³⁰ (que se adjunta al final de esta Tesis doctoral), así como una amplia discusión sobre el tema se puede leer en la Tesis doctoral del Dr. Roca Sanjuán.³¹

5.2. Formación de CBC a partir del excímero triplete de Citosina

El importante papel que los estados triplete juegan en la química del DNA, en particular en la formación de Pyr<>Pyr, ha sido puesto de relieve^{32,33} desde que fuera señalado por primera vez por Cadet y sus colaboradores.³⁴ A pesar del hecho de que la formación de triplete tiene un bajo rendimiento cuántico, el largo tiempo de vida media de estos estados es crucial en la fotoquímica y fotofísica de los componentes del DNA, puesto que podría inducir la formación de dímeros de tipo ciclobutilcitosina (CBC) bajo condiciones de fotosensibilización.^{33,34} También existe otra vía para la formación del estado triplete de las piridinas. Como está detalladamente documentado para la citosina,³⁵ uracilo³⁶ y timina,³⁷ el estado más bajo triplete puede ser poblado a lo

largo de una conversión interna ultrarrápida a través de un mecanismo de cruce entres sistemas (ISC). No obstante, en aparente contraste con lo comentado, un reciente estudio de resolución en el tiempo para la formación de dímeros de timina realizado por Marguet y Markovitsi,³ muestra que la excitación directa de $(dT)_{20}$ conduce a la formación de los dímeros T<>T en menos de 200 ns, con la notoria ausencia de absorción por parte de ningún triplete en el espectro de absorción transitoria del oligonucleótido. Con el fin de evaluar la posible participación del estado triplete de tipo excímero en la formación del CBC se lleva a cabo la siguiente investigación.

5.2.1. El excímero triplete de Citosina

Un estudio paralelo al llevado a cabo para el excímero singlete de citosina se ha realizado para el excímero triplete (ver sección 5.1). Se han construido las PECs de los dos estados triplete más bajos en energía respecto a la distancia intermolecular R (ver Figura 5.4) de un modo análogo a como se construyeron las PECs de los estados singlete, esto es, incluyendo la correlación electrónica dinámica, utilizando un conjunto de base suficientemente flexible, calculando las funciones de onda sin restricción de simetría para conseguir el correcto límite asintótico e incluyendo las correcciones BSSE que, como se ha comentado anteriormente son cruciales para la hallar la posición del mínimo de la curva de energía potencial. Los resultados numéricos aparecen en la Tabla 5.3 junto con los de los dos primeros estados singlete.

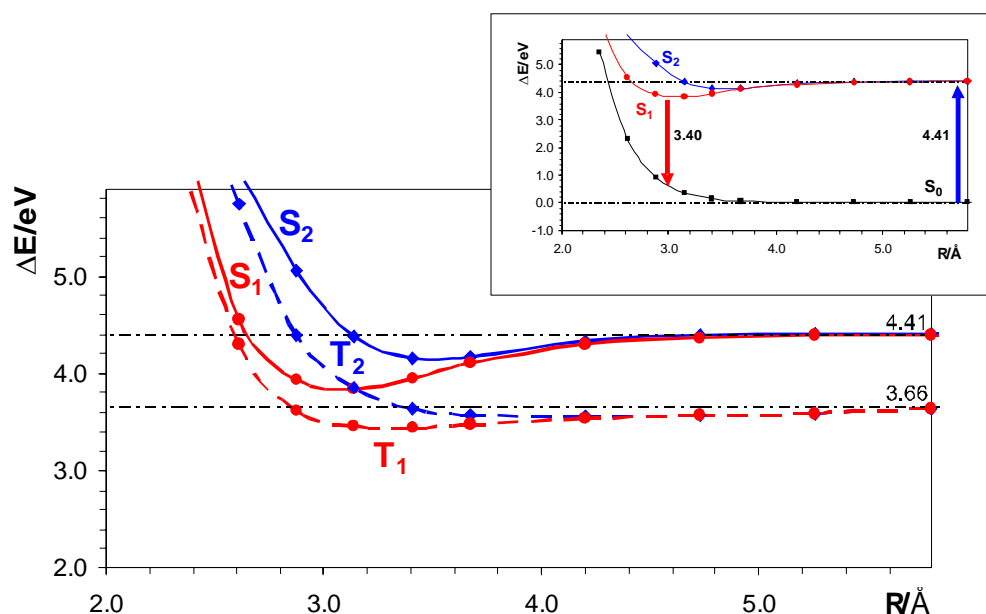


Figura 5.4. Curvas de energía potencial a nivel CASPT2+BSSE construidas respecto a la distancia intermolecular $R(C_5-C_5')$ de dos moléculas de citosina, apiladas de modo π y cara-a-cara, que involucran el estado fundamental y los dos estados triplete y singlete más bajos en energía. En el recuadro superior se ilustra la fluorescencia desplazada hacia el rojo del dinucleótido de citosina.

La energía de enlace del primer estado triplete calculado a nivel CASPT2(12,12)+BSSE es 0.22 eV. Por tanto, se puede concluir que el excímero triplete es enlazado, aunque la energía de enlace se reduce un 60% con respecto a la del excímero singlete. Se predice una emisión vertical (fosforescencia) a 3.23 eV y una transición 0-0 triplete-singlete de 3.44 eV. Como se puede ver en la Figura 5.4, a una distancia intermolecular de 3.0 – 3.4 Å, los estados S₁ y T₂ están involucrados en un cruce singlete-triplete. Esto es realmente interesante puesto que precisamente a esas distancias de separación se encuentran las bases de los biopolímeros en su estado fundamental.^{1,7} Por tanto T₂, podría ser

poblado a través de un mecanismo de ISC, y posteriormente, gracias al movimiento intrínseco de las cadenas de DNA, poblar T_1 a través de una CI. A parte del hecho de la casi degeneración que se encuentra entre los estados S_1 y T_2 , se debe considerar también la magnitud del acoplamiento espín-orbital, muy relevante para que el proceso ISC sea eficiente, y en esto último tendrá también una gran importancia el entorno del biopolímero. La posibilidad de la formación del excímero triplete aumenta en la estructura de Watson-Crick en la cual los pares A-T y G-C unidos por puentes de hidrógeno están situados en el centro de la doble hélice, y el esqueleto está formado por cadenas de glucofosfatos. Una vuelta de la doble hélice involucra 10 pares de bases y 34 Å. Por tanto, la distancia interplanar entre bases vecinas es de unos 3.4 Å, que es un valor que a menudo se encuentra en excímeros de cristales orgánicos.^{29,38}

La estructura para el mínimo local del estado excitado de T_1 se calcula a nivel CASPT2(12,12)+BSSE con respecto a la distancia intermolecular en la orientación cara-a-cara (manteniendo los monómeros a la geometría optimizada del estado fundamental). A partir de ahora se le denominará $^3(\text{LE})$. Como se recoge en la Tabla 5.3, la distancia $R(\text{C}_5-\text{C}_5')$ en el $^3(\text{LE})$ es de 3.304 Å.

Al igual que ocurría en el caso del $^1(\text{LE})$, también el $^3(\text{LE})$, es bastante estable y puede ser un buen precursor potencial para la formación de dímeros del tipo Pyr<>Pyr. De hecho se utiliza como punto de partida en el estudio realizado sobre la formación de CBC (C<>C) vía triplete que se comenta a continuación.

Tabla 5.3. Energía de enlace (E_b), error de superposición de base (BSSE) obtenido a través del método (CP-BSSE), y energía de enlace corregida (CP- E_b) calculada a nivel CASPT2(12,12) para los estados triplete y singlete más bajos en energía en el excímero de citosina con la estructura especificada. Distancias en Å y energías en eV.

Estado	R(C ₅ -C ₅)	E_b^a	CP-BSSE	CP- E_b
A la estructura (T₁)_{min}:				
T ₁	3.029	1.15	0.98	0.17
S ₀	3.029	0.41	0.97	-0.56
Emisión vertical: ^b 2.93 eV (=3.66-0.17-0.56)				
Transición 0-0: ^b 3.49 eV (=3.66-0.17)				
A la estructura (T₁)_{min}+ BSSE: ³(LE)				
T ₁	3.304	1.06	0.84	0.22
S ₀	3.304	0.61	0.82	-0.21
Emisión vertical: ^b 3.23 eV (=3.66 - 0.22 - 0.21)				
Transición 0-0: ^b 3.44 eV (=3.66-0.22)				
A la estructura (S₁)_{min}:^c				
S ₁	2.954	1.51	0.97	0.54
S ₀	2.954	0.29	0.97	-0.68
Emisión vertical: ^b S ₀ → S ₁ : 3.19 eV (=4.41-0.54-0.68)				
Transición 0-0: ^b 3.87 eV (=4.41-0.54)				
A la estructura (S₁)_{min}+BSSE: ¹(LE)				
S ₁	3.076	1.47	0.89	0.58
S ₀	3.076	0.47	0.90	-0.43
Emisión vertical: ^b 3.40 eV (=4.41-0.58-0.43)				
Transición 0-0: ^b 3.83 eV (=4.41-0.58)				

^a Energía de enlace respecto a los estados correspondientes de los monómeros.

^b Excitaciones verticales en el monómero: S₀ → T₁ (3.66 eV) y S₀ → S₁ (4.41 eV).

5.2.2. Formación de ciclobutilcitosina (CBC) vía triplete

En todos los cálculos realizados para estudiar la fotodimerización de la citosina a partir de su excímero triplete, se ha utilizado el conjunto de base ANO C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]. Las optimizaciones de geometría, los MEPs y la determinación de los cruces entre hipersuperficies se han llevado a cabo, inicialmente, a nivel CASSCF con un espacio activo que comprende el mismo sistema π empleado para optimizar el estado fundamental de la citosina, lo que representa en el dímero un total de 16 electrones distribuidos sobre 14 orbitales moleculares (todo el sistema π excepto el orbital más profundo, localizado en el fragmento NH₂ de cada citosina, que se mantiene inactivo). La correlación dinámica se incluye posteriormente usando la teoría perturbativa de segundo orden a través del método CASPT2.

Para imitar la interacción de las dos pirimidinas en el DNA, la optimización de geometría fue inicialmente llevada a cabo con la restricción de simetría C_s, permitiendo así de forma natural una interacción entre las dos moléculas en el biológicamente importante estereoisómero *cis-syn*. Se usan siete orbitales de cada representación irreducible (*a'* y *a''*) y 16 electrones, es decir, el espacio activo equivalente al que se emplea sin restricciones de simetría. Sobre las geometrías optimizadas se calculan las energías a nivel CASPT2 con simetría C₁ para cumplir con el requisito de la ruptura de simetría de la función de onda que permite describir correctamente el límite asintótico para los estados excitados electrónicos de menor energía de los dos monómeros. Para estos cálculos se mantiene adicionalmente dos orbitales π inactivos, aquellos con números de ocupación de

aproximadamente 2.0 en sus correspondientes orbitales naturales. Se utiliza el procedimiento *state-average* CASSCF(12,12) de las 2 raíces triplete más bajas en energía y para minimizar interacciones débiles de los estados intruso, se usa en el CASPT2 un parámetro para *level shift* imaginario de 0.2. Los MEPs se han construido utilizando la técnica descrita en el capítulo 4, y los cruces singlete-triplete se calculan usando la técnica de los multiplicadores de Lagrange restringidos que está incluida en el paquete de programas MOLCAS-6.0, y con la que el punto de menor energía se obtiene bajo la restricción de degeneración entre los dos estados considerados.³⁹ Las estructuras calculadas a nivel CASSCF también representan cruces a nivel CASPT2, y por supuesto se ha incluido el BSSE en todos los puntos para describir de forma precisa las energías de enlace.

- **Mecanismo propuesto para la fotodimerización de la citosina a través del excímero triplete**

A la luz de los resultados obtenidos se construye el esquema que aparece en la Figura 5.5 sobre el camino de fotodimerización de la citosina a partir del excímero triplete.

En la parte derecha de esta figura, C + C hace referencia a dos moléculas de citosina en su estado fundamental a una distancia intermolecular de 10.5 Å. Cuando aparece C* + C, uno de los monómeros está excitado electrónicamente (C*) mientras que el otro se representa en su estado fundamental. La transición entre el estado fundamental y el estado excitado triplete más bajo a esa distancia

intermolecular corresponde, por tanto, a la transición vertical $S_0 \rightarrow T_1$, 3.66 eV, lo que concuerda con resultados previos obtenidos para la citosina aislada.

Los resultados CASPT2 del MEP del estado T_1 aparecen en la Figura 5.6 donde se ha incluido también la evolución de los estados S_0 y T_2 . El punto de partida del MEP es justamente el estado ${}^3(\text{LE})$, que como se ha explicado en apartados anteriores, se perfilaba como un buen precursor de la fotodimerización. Como se puede apreciar el MEP de T_1 desde ${}^3(\text{LE})$ conduce directamente y sin barreras energéticas a una estructura coincidente a aquella obtenida a través de una optimización de geometría, que vamos a denominar intermediario por etapas o *step-wise*, ${}^3(\text{SWI})$, y que está claramente degenerada con el estado fundamental. Es decir, en ese punto el estado triplete coincide con un cruce triplete-singlete, $(T_1/S_0)_x$, una región de la hipersuperficie donde el decaimiento al estado fundamental se ve especialmente favorecido. El punto estacionario ${}^3(\text{SWI})$ se caracteriza por la formación de un enlace covalente simple entre los átomos C_6-C_6' , con una longitud de enlace de 1.669 Å. La distancia entre C_5-C_5' por el contrario está sobre los 2.8 Å (ver Figura 5.5). Por tanto, ${}^3(\text{SWI})$ no puede ser considerado un excímero sino un intermediario hacia la formación de CBC. Por otro lado, distintas optimizaciones de energía del estado ${}^3A''$ tomando como punto de partida diversas conformaciones paralelas en torno a ${}^3(\text{LE})$ conducen de forma clara a la estructura ${}^3(\text{SWI})$. Por supuesto, si las restricciones de simetría son eliminadas y se parte de dos moléculas de citosina separadas por distancias intermoleculares de 7 Å o mayores, se obtiene un triplete relajado en uno de los monómeros mientras que el otro conserva la geometría de su estado fundamental. Como se comentará

más adelante, el estado más bajo triplete del monómero tiene carácter $\pi\pi^*$ y un origen de banda de 3.04 eV, lo cual representa una estabilización de unos 0.6 eV con respecto a la transición vertical singlete-triplete.

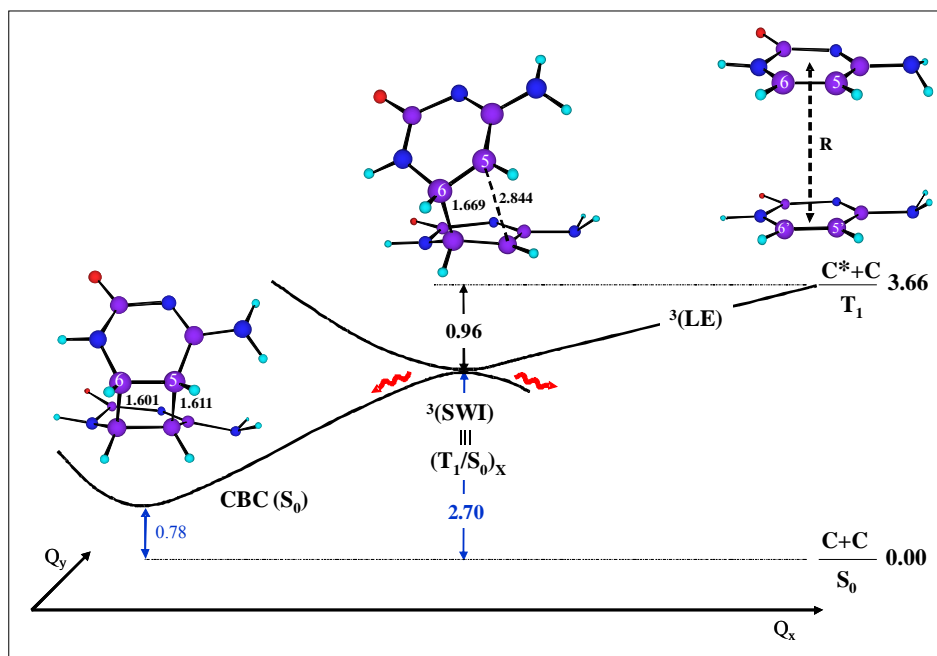


Figura 5.5. Esquema propuesto, basado en los resultados CASPT2 obtenidos, para el camino de decaimiento del estado excitado triplete más bajo en energía (T_1) del dímero de citosina a través del triplete localmente excitado ${}^3(\text{LE})$ y el intermediario step-wise ${}^3(\text{SWI})$ que conduce al estado fundamental de la ciclobutilcitosina (CBC) mediante un mecanismo de cruce entre sistemas (ISC). Se incluyen los principales parámetros geométricos intermoleculares (en Å). El resto de valores numéricos (en eV) corresponde a las energías relativas de estas estructuras respecto a las dos moléculas de citosina en su estado fundamental separadas por una distancia $R \approx 10.5$ Å. A la estructura optimizada ${}^3(\text{SWI})$ tiene lugar un cruce singlete-triplete, $(T_1/S_0)_x$. La coordenada Q_x está principalmente relacionada con la distancia intermolecular de $R(\text{C}_5\text{-C}_5')$ y $R(\text{C}_6\text{-C}_6')$, mientras que Q_y está asociada al resto de grados de libertad.

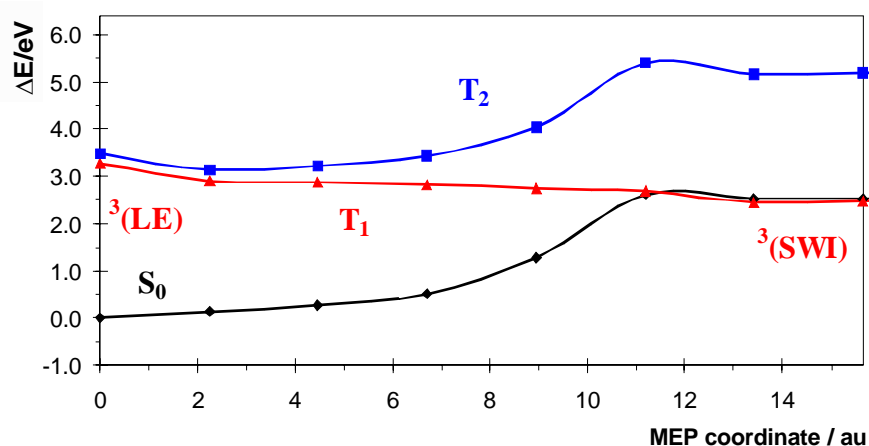


Figura 5.6. Estados excitados triplete más bajos en energía del dímero de citosina calculados a nivel CASPT2//CASSCF a lo largo del MEP de T_1 partiendo de la geometría del estado localmente excitado triplete $^3(\text{LE})$. El MEP de T_1 finaliza en el intermedio $^3(\text{SWI})$ (ver Figura 5.5) y es isoenergético con el estado fundamental (S_0).

- Naturaleza del $^3(\text{SWI})$. El triplete del ED y del FED

Con la finalidad de analizar el origen y naturaleza de las especies $^3(\text{SWI})$ se ha llevado a cabo un estudio sobre el estado triplete de menor energía del dímero de eteno (ED) y del dímero de fluoroeteno (FED), los cuales se utilizan como modelos.

El estado T_1 para el ED y el FED se ha optimizado a nivel CASSCF(4,4) utilizando como espacio activo los orbitales de valencia π (4 electrones activos) y el mismo conjunto de base que el empleado en los cálculos de la citosina. Como se puede ver en la Figura 5.7 la geometría de equilibrio para el estado T_1 del FED es similar al $^3(\text{SWI})$, mientras que la geometría del estado T_1 del ED (de tipo HOMO-LUMO)

es rectangular. Además, el enlace simple que se forma en el T_1 del FED involucra a los átomos de carbono sustituidos y la densidad de espín se localiza fundamentalmente en los carbonos restantes. La estructura de equilibrio del T_1 del FED corresponde claramente a un birradical y no es sorprendente que esté degenerado con el estado fundamental tanto a nivel CASSCF como a nivel CASPT2. Por el contrario, el estado T_1 del ED está situado alrededor de 1.5 eV por encima de S_0 , y tiene la densidad de espín de los electrones desapareados igualmente repartida entre los cuatro átomos de carbono. Es interesante comprobar que, de acuerdo con la naturaleza de los estados, las geometrías optimizadas para T_1 -ED y T_1 -FED son mínimos. Es de esperar una situación similar para el caso del $^3(\text{SWI})$ del dímero de citosina. La degeneración singlete-triplete que se da en la estructura de equilibrio $^3(\text{SWI})$, se puede entender en base al carácter birradical de los estados singlete/triplete, que tienen los electrones desapareados sobre los átomos C_5 y $C_{5'}$. Esto explica la razón por la cual la distancia de enlace C_5 - $C_{5'}$ es mayor que la que se calcula para C_6 - $C_{6'}$. Tomando en consideración que el átomo C_6 (y el $C_{6'}$) está unido a un átomo de nitrógeno, mientras que C_5 (y $C_{5'}$) lo está a uno de carbono, el C_6 y el $C_{6'}$ son centros más deficientes electrónicamente que los átomos C_5 y $C_{5'}$, puesto que la electroafinidad del nitrógeno es más alta que la del carbono. Por lo tanto, se favorece el proceso de formación del enlace simple entre C_6 y $C_{6'}$. Esto ocurre también en el FED, donde los carbonos sustituidos compensan su déficit en densidad electrónica a través de su acercamiento al otro monómero, de forma que se llega a formar un nuevo enlace.

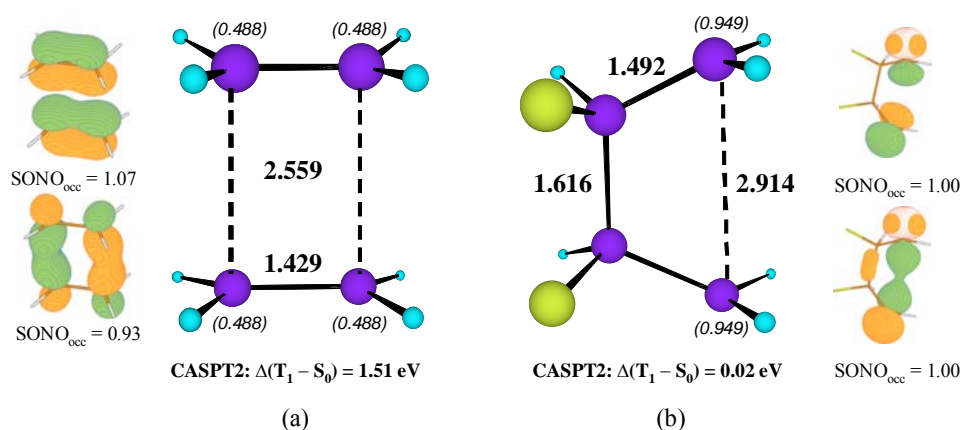


Figura 5.7. Geometría optimizada a nivel CASSCF(4,4) para el estado triplete más bajo en energía del dímero de eteno (a) y del dímero de fluoroeteno (b). Se incluye también el número de ocupación del correspondiente orbital natural ocupado por un solo electrón (SONO_{occ}), así como la diferencia de energía calculada a nivel CASPT2(4,4) entre el estado fundamental y el estado T_1 . La principal población derivada del análisis de Mulliken se especifica entre paréntesis. Las distancias se dan en Å

- **Población del estado $^3(\text{SWI})$ del dímero de citosina.**

El estado $^3(\text{SWI})$ tiene un CP- E_b de 0.96 eV y está situado 2.70 eV sobre la energía de las dos citosinas en su estado fundamental. Los mecanismos a través de los cuales se puede llegar a la población del estado triplete son varios. Es fácil visualizar como gracias a un fotosensibilizador exógeno se puede poblar el estado relajado triplete del monómero, y éste interaccionar atractivamente con el estado fundamental de la otra citosina, formando un dímero que podría evolucionar hacia la $^3(\text{SWI})$, precursor del CBC. Sin embargo, también se debe tener en cuenta la posibilidad de la fotosensibilización endógena a través de la TT-EET entre diferentes nucleobases de DNA. En cualquier

caso, la energía requerida para acceder al estado $^3(\text{SWI})$ puede estar relacionada con el umbral observado experimentalmente en diversas familias de compuestos para convertirse en potenciales fotolesionadores del DNA a través de la formación de $\text{C}\langle\rangle\text{C}$. El resultados calculado para el estado $^3(\text{SWI})$ de la citosina, 2.70 eV, es concordante con la energía del triplete de la timina en el DNA que se ha deducido experimentalmente, 2.80 eV.³³ TT-EET es muy importante y común en reacciones químicas y se utiliza para poblar específicamente el estado triplete del reactivo.⁴⁰ Este proceso es el conocido como fotosensibilización y el donador se llama sensibilizador triplete. Es importante recalcar que para una transferencia de energía eficiente tenga lugar, el donador debe absorber en la región de interés, tener un ISC eficiente y un estado triplete en energía más alto que el del aceptor, que es en este caso la especie $^3(\text{SWI})$. Los resultados presentes ofrecen una racionalización interesante del conocido hecho de que los dímeros de piridinas se forman en disolución bajo condiciones de fotosensibilización triplete.³⁴ A energías de fotosensibilización triplete-triplete mayores de 2.80 eV diversas substancias se convierten en fotogenotóxicos capaces de dañar el DNA dando lugar a los dímeros $\text{Pyr}\langle\rangle\text{Pyr}$.³³

El intermediario calculado $^3(\text{SWI})$ representa así pues, un canal para la formación de fotodímeros desde el estado triplete de la citosina en el DNA y permite entender la potencial fotogenotoxicidad vía triplete-triplete. Se sabe que la radiación UV-A (3.10 \square 3.87 eV) induce, preferentemente, la producción de dímeros de ciclobutano en los sitios donde hay timinas adyacentes (TT) sin ninguna formación detectable de fotoproductos $\text{Pyr}(6-4)\text{Pyr}$. La población directa del singlete no puede

tener lugar a tan bajas energías de irradiación y el proceso debe ocurrir entonces a través de un mecanismo de fotosensibilización por TT-EET.⁴¹ Se han hecho unos cálculos preliminares para este sistema (TT) que apoyan la existencia de un camino de reacción, similar al encontrado para CC, que incluye la formación del intermediario ³(SWI). El estado excitado singlete de la molécula pirimidínica es accesible para energías de irradiación más energéticas (UV-B o UV-C), y el mecanismo de población intrínseca del primer estado triplete del monómero se presenta operativo. Puesto que la eficiencia de la formación del estado triplete ha sido determinada en mayor cantidad en timinas que en citosinas aisladas,^{36,37} es lógico que preferentemente se generen fotoproducto de ciclobutano entre TT y en menor medida en CT, TC y CC.

El presente cruce $(T_1/S_0)_x$ favorece claramente el ISC hacia el estado fundamental, pero la eficiencia real del proceso de decaimiento a lo largo del sumidero triplete estará también relacionada con el aumento del SOC, estimado en sólo unos cm^{-1} en la estructura ³(SWI) en el *vacuo*. A ese respecto, el solvente (o en general el entorno) jugará un papel crucial en el proceso ISC.⁴² Bajo condiciones favorables de ISC, el decaimiento probablemente tendría lugar en el rango de los subpicosegundos, es decir, en un tiempo considerablemente menor que los 200 ns empleados en el estudio con resolución en el tiempo de la formación de dímeros de timina.³ Tomando esto en consideración, apoyamos la sugerencia de Marguet y Markovitsi³ en relación a la posibilidad de que la reactividad ultrarrápida del estado triplete, para dar paso a dímeros de tipo ciclobutano, ocurra con una eficiencia de casi la unidad.

- El papel de los excímeros en la formación de Pyr<>Pyr

Los resultados obtenidos en este estudio enfatizan la importancia del papel de los excímeros en la fotofísica de los oligonucleótidos (y del mismo DNA). También permiten racionalizar la fotorreactividad fotoinducida de la citosina que conduce a la formación de dímeros de tipo ciclobutano, uno de los procesos más conocidos que conducen a daños en el DNA por radiación UV.

En los apartados anteriores se ha propuesto un mecanismo de formación de CBC a partir del excímero triplete de citosina. Como hemos visto, este mecanismo, basado en cálculos *ab initio* de gran calidad, toma como estructura de partida el excímero $^3(\text{LE})$, y revela la formación, sin barreras de energía, de un intermediario, el $^3(\text{SWI})$. La estructura $^3(\text{SWI})$ se caracteriza por tener un enlace covalente entre los átomos $\text{C}_6\text{-C}_{6'}$, mientras que la distancia de enlace $\text{C}_5\text{-C}_{5'}$ es mayor. La energía necesaria para alcanzar el $^3(\text{SWI})$ a partir de dos monómeros de citosina en su estado fundamental es de 2.70 eV. Este valor está relacionado con el umbral, que necesita un fotosensibilizador determinado para producir daños en el DNA. De hecho, coincide con la energía del triplete de timina que se determina experimentalmente en el DNA, 2.80 eV. En esta estructura $^3(\text{SWI})$ se da un cruce $(\text{T}_1/\text{S}_0)_x$ que media en la desactivación no radiativa al estado fundamental a través de un mecanismo de ISC. Bajo condiciones favorables de SOC y de acuerdo al perfil calculado, que no presenta barreras, el decaimiento tendría lugar en el rango de los picosegundos. El intermediario $^3(\text{SWI})$ se puede alcanzar a través de varias estructuras iniciales diferentes (ver Figura

5.8), por lo que las conclusiones obtenidas se pueden aplicar también en situaciones donde no existan necesariamente excímeros. Los resultados ofrecen una explicación al hecho de que en disolución y bajo condiciones de fotosensibilización triplete se formen dímeros de pirimidinas.

A parte de esta vía de formación de CBC a través del estado triplete de la citosina, un estudio paralelo, que se ha realizado también en el seno de nuestro grupo de investigación, formula un mecanismo de dimerización de la citosina a través del excímero singlete.^{30,31} Según dicho estudio, partiendo de la estructura $^1(\text{LE})$ y a través de una intersección cónica que involucra los estados S_1/S_0 , se puede conseguir la formación de CBC. A lo largo de este camino de reacción se produce la formación de $^1(\text{C}^*\text{C})$, que se calcula situado 0.2 eV por debajo de la CI. En consecuencia, en competición con la fotorreacción se puede dar la fluorescencia desde $^1(\text{C}^*\text{C})$. La emisión desde el excímero relajado $^1(\text{C}^*\text{C})$ o desde $^1(\text{LE})$ puede explicar la pronunciada dependencia de la polarización observada en disolución cuando se usan técnicas de fluorescencia polarizada.^{43,44}

La presencia de una barrera energética entre $^1(\text{C}^*\text{C})$ y la CI no significa que el proceso de fotoisomerización esté impedido. El análisis de la información teórica y experimental que se tiene en la actualidad, sugiere que en el momento de la irradiación existen orientaciones reactivas que están próximas en energía a la CI, y a través de las cuales se llega a la formación de dímeros de tipo Pyr<>Pyr (ver Figura 5.8).

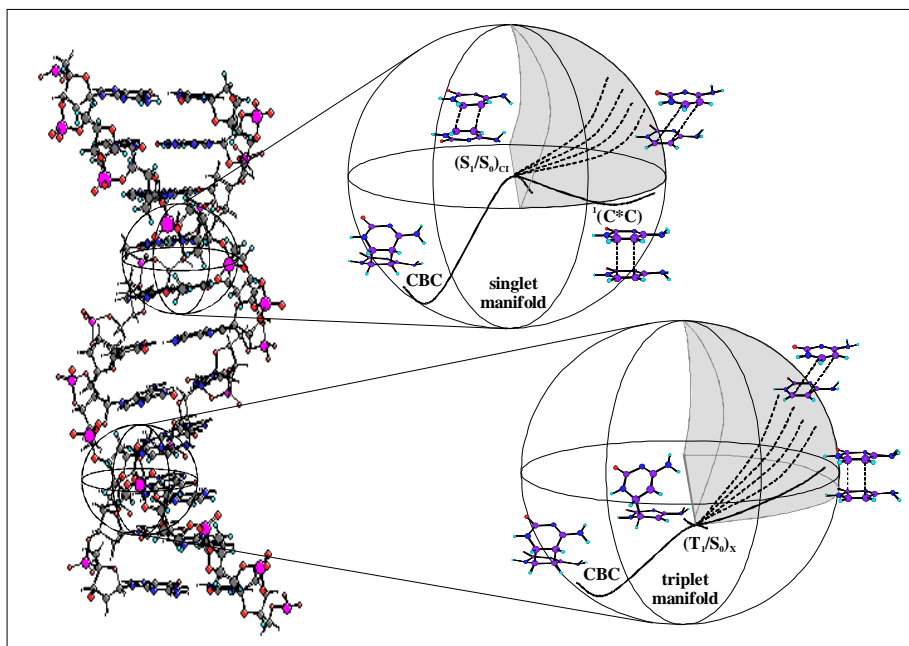


Figura 5.8. Esquema del proceso de fotodimerización del dímero de citosina con apilamiento π a lo largo del sumidero singlete y triplete. Las regiones de volumen de la de la esfera sombreadas representan regiones de la cadena de DNA con orientaciones reactivas, en las que el camino de decaimiento conduce a un cruce singlete-triplete $(T_1/S_0)_X$ y la intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$.

En base a lo comentado, la carencia de excímeros estables en un sistema apuntaría a un mayor potencial para conseguir orientaciones reactivas y por tanto la velocidad de formación del dímero será mayor. Esta situación es la que se cumple en la timina.^{2,9} Por el contrario, lo que ocurre en la citosina es que la existencia de excímeros estables hace que decrezca la efectividad de la formación de fotoproductos a través del camino de reacción singlete. Este esquema explica la razón por la cual una reacción que se produce en disolución vía el estado triplete, puede tener un estado singlete como precursor cuando los biocromóforos se

mantienen juntos, como es el caso de disoluciones a baja temperatura, o de los biopolímeros.⁷

Todas estas conclusiones se podrían aplicar al diseño de fármacos fototerapéuticos, que permitiesen disminuir la formación de dímeros de pirimidinas a través de su uso. No sorprendentemente, el uso de bioexcímeros por la Naturaleza está omnipresente. Juegan un papel fundamental en fotobiología, en procesos tales como la transferencia electrónica en la fotosíntesis,⁴⁵ y como se ha mostrado aquí, la distinta reactividad intrínseca de las nucleobases del DNA hacia la dimerización intracadena de pirimidinas.

5.3. El papel del excímero de adenina en la fotofísica de sus oligonucleótidos

- Hacia la comprensión de los mecanismos de relajación de los oligonucleótidos de adenina

Los estudios más recientes^{46,47} sobre la fotofísica de los caminos de relajación de los oligonucleótidos sugieren que, tras una población inicial por radiación de los estados de tipo excitón deslocalizados en los multímeros de las bases de los ácidos nucleicos (NABs, nucleic acids base), el sistema puede evolucionar de un modo ultrarrápido a un estado emisor de fluorescencia de tipo exciplejo/excímero o a un estado excitado localizado en un monómero de NAB. Que ocurra lo primero o lo segundo dependerá del mayor o menor grado de apilamiento entre

las NABs. Desde el estado tipo excímero/exciplejo (de tiempo de vida largo) se espera que el decaimiento al estado fundamental sea lento ($\tau > 10$ ps), mientras que la relajación a lo largo del camino del monómero debería ser ultrarrápida ($\tau < 2$ ps), como se conoce que ocurre en sistemas aislados.^{1,48} Se ha proclamado a los cuatro vientos que el estado excímero/exciplejo tiene una naturaleza de transferencia de carga (CT) y que existe una correlación entre la vida media del estado y la fuerza conductora de la recombinación de cargas.⁴⁷ La formación del exciplejo en los estados CT se ha descrito también como una nueva forma de reacción fotoquímica, entre piridinas y aceptores electrónicos cianoaromáticos.⁴⁹ El destino del estado excitado dependerá de la extensión en la que se produzca la reorganización de carga entre los monómeros y de la posición relativa de los estados excímero CT y no-CT. Esta información puede ser obtenida a través de la teoría. En el caso del DNA, la validación dinámica de este modelo sólo cuenta con el apoyo de un estudio teórico para la adenina, basado en la metodología del Funcional de Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT, *Time-Dependent Density Functional Theory*) y aplicada a dímeros de adenina, de la 9-metiladenina y a trímeros. Según este estudio, los estados CT son los estados más bajos en energía en disolución.⁵⁰ Los resultados de la metodología TD-DFT en cálculos que involucran simultáneamente estados CT y no-CT deben ser siempre tomados con mucha cautela puesto que es bien conocida la tendencia del TD-DFT hacia una severa infraestimación de las energías de excitación CT.^{51,52,53,54} Particularmente en este caso, un reciente artículo publicado⁵⁵ sugiere que el mencionado estudio TD-DFT infravalora las energías de excitación CT en cerca de 1 eV. Está claro que existe la necesidad de tener estudios teóricos

realizados con teoría de mayor calidad. En este trabajo, centramos nuestro interés en el análisis de los estados electrónico excitados responsables de las propiedades espectroscópicas para diferentes conformaciones de dímeros de adenina (9H-adenine, A) en *vacuo* y en disolución acuosa. En él se va a ofrecer la posición relativa y las energías de enlace de los estados excímero, las energías de excitación y fuerzas de oscilador para la espectroscopia de absorción transitoria, y un modelo global para la dinámica de desactivación del homodímero. Los resultados, obtenidos a través del preciso método *ab initio* químico cuántico CASPT2, utilizando un conjunto de base de alta calidad de tipo ANO-S y usando el Modelo Polarizable Continuo (PCM)^{56,57} para los efectos de la solvatación, pretende proporcionar las bases necesarias para el establecimiento de modelos más completos que ayuden a entender la dinámica de relajación del DNA.

A partir de experimentos de absorción del estado excitado de femtosegundos^{1,2,58} llevados a cabo en una gran variedad de oligonucleótidos sintéticos de DNA en disolución acuosa, entre ellos el (dA)₁₈, se obtienen decaimientos exponenciales que incluyen tiempos de vida de relajación mayores de 100 ps y que se atribuyen al decaimiento desde excímeros singlete. Se sugirió que, tras la irradiación con un láser de bombeo a 266 nm, un alto porcentaje de los fotones absorbidos generaban excímeros cuyo decaimiento transitorio, medidos gracias a la irradiación con el láser de prueba de 250 nm, coincidía con la señal de repoblación del estado fundamental (absorción a 570 nm) para tiempos mayores de 10 ps. Un estudio adicional con resolución en el tiempo⁶ de la (dA)₂₀ proporcionó evidencias de la evolución temporal a través de tres estados distintos. El primero de ellos está caracterizado por una

relajación ultrarrápida con un tiempo de decaimiento de ~ 0.35 ps asignado a una relajación de tipo monómero. El segundo y tercer estado tienen vidas medias relativamente grandes (~ 4.3 ps y ~ 182 ps respectivamente), lo que sugiere que son de naturaleza excimérica. Para determinar la naturaleza y la posición relativa de los diferentes estados excímeros del homodímero de A en fase gas y en solución, se estudian diferentes orientaciones moleculares del dímero apilado utilizando la teoría CASPT2 y CASPT2/PCM.

La caracterización de los estados más bajos en energía singlete del homodímero de adenina en diferentes disposiciones se lleva a cabo usando el método CASPT2 implementado en el programa MOLCAS 6.3. Para minimizar las interacciones débiles de estados intrusos se utiliza la técnica del *imaginary level-shift* (0.2 au). En todos los cálculos se usa el conjunto de base de tipo ANO-S con el conjunto de primitivas C,N(10s6p3d)/H(7s3p), contraído a C,N[3s2p1d]/H[2s1p]. El método CASSI^{59,60} se utiliza para calcular el momento de transición CASSCF, y es la diferencia de energía a nivel CASPT2 la que se usa para calcular las fuerzas de oscilador. Considerando nuestro interés en el cálculo de los estados $\pi\pi^*$ del homodímero, el espacio activo para la función de onda CASSCF comprende un total de 12 electrones distribuidos sobre 12 orbitales π , es decir, CASSCF(12,12), lo que corresponde a 6 orbitales moleculares de cada adenina. Otros estados, como los $n\pi^*$ estarán mucho más altos en energía en estas conformaciones y jugarán un papel de menor importancia.^{61,62} Para seleccionar el conjunto de base y el espacio activo, se han realizado previamente una serie de cálculos de calibrado a nivel CASPT2 para los estados singlete más bajos en energía del monómero de adenina (usando para esta molécula la geometría del

estado fundamental optimizada a nivel CASSCF (11,12)/6-31G(d,p)).⁶³ La Tabla 5.4 recoge los resultados obtenidos para distintos conjuntos de base y espacios activos. Como se puede observar, si se usa el espacio reducido (6,6) para la adenina, se pueden obtener resultados que están de acuerdo con los valores obtenidos utilizando espacios activos más grandes.^{63,64}

Para el estudio del homodímero de adenina se consideran diferentes orientaciones moleculares en *vacuo* y en agua, empleando en el último caso el modelo PCM implementado en el programa MOLCAS. Esta aproximación usa un dieléctrico continuo polarizable en el exterior de una cavidad con una forma adaptada a la molécula, para simular los efectos más importantes de solvatación. El cálculo de energías se realiza de modo multiconfiguracional a nivel CASSCF y el resultado se añade al Hamiltoniano como una perturbación, (aproximación CASPT2/PCM. Este modelo (que se puede ver más detalladamente en el capítulo 3) se considera suficientemente eficaz para incorporar los efectos principales de la solvatación en el estado fundamental y en los estados excitados $\pi\pi^*$ del dímero de adenina.

Teniendo en cuenta todas estas especificaciones teóricas, se realizan diferentes conjuntos de cálculos con seis disposiciones moleculares diferentes para el homodímero de adenina:

- La del dímero de adenina en el mínimo local del estado excitado $^1(\text{LE})$, inspirado en el homodímero análogo de citosina (ver sección 5.1).
- La orientación del dímero de adenina según los parámetros estándar del B-DNA pero utilizando también la geometría optimizada del estado fundamental de los monómeros.

- La del estado excitado excímero optimizado cara-a-cara, $^1(A^*A)_{exc}$.
- Dos orientaciones B-DNA incluyendo la estructura optimizada catiónica y aniónica de los monómeros de adenina ($^5A_{cat}A_{an}^3$) y ($^5A_{an}A_{cat}^3$).
- Y finalmente, la del estado excitado CT cuyo mínimo optimizado a nivel TD-DFT se toma de la Ref 50, $^1(A^+A^-)_{opt}$.

Tabla 5.4. Energías de los estados excitados singlete $\pi\pi^*$ de menor energía en la molécula de adenina calculadas para la geometría del estado fundamental con diferentes conjuntos de base y espacios activos

Conjunto de base	Espacio Activo (e-/MO)	E_{CASPT2} (eV)	
Monómero 9H-Adenina			
6-31G(d,p) ^a	16/13	S ₁	5.16
		S ₂	5.35
6-31G(d) ^b	10/9	S ₁	5.10
		S ₂	5.45
ANO-L C,N[4s3p1d]/H[2s]+1s1p1d ^c	10/10	S ₁	5.13
		S ₁	5.20
ANO-S C,N[3s2p1d]/H[2s1p]	6/6	S ₁	5.25
		S ₂	5.42

^a Valores extraídos de las referencias 63,65.

^b En este conjunto de base el exponente estándar de la gaussiana-d 0.8 ha sido reemplazada por el exponente más difuso 0.25. Ver referencia 66.

^c Valores tomados de la referencia 67.

Se utilizan siete raíces en el procedimiento *state average* del método CASSCF para tener en consideración el cambio en el orden de las soluciones CASSCF respecto a las CASPT2. Excepto cuando se especifique, no se ha utilizado ninguna restricción de simetría en estos cálculos. En algunos casos, donde se indicará, se han calculado a nivel CASPT2 30 raíces singlete, a geometrías del estado S_1 , con la finalidad de explorar la absorción transitoria del estado excitado.

Como se ha comentado en la sección 5.1, es crucial para describir con precisión las energías de enlace (E_b) y la posición relativa de los estados excímero, la inclusión del BSSE. Aquí, como en el caso de los dímeros de citosina, se tiene en cuenta este efecto a través de la corrección counterpoise (CP) y las correspondientes energías corregidas se llamarán BSSE-corrected o CP-corrected (por ejemplo, CP-corrected binding energy, CP- E_b).

A. El estado excitado singlete de menor energía en el excímero paralelo: $^1(\text{LE})$

Como un primer paso hacia la caracterización de menor energía en los excímeros de adenina, se construyen, a nivel CASPT2, las curvas de energía potencial respecto a la distancia intermolecular entre los centros de masas (R) de dos moléculas de adenina mantenidas a la geometría de equilibrio del estado fundamental. La orientación seleccionada es una disposición simétrica paralela cara-a-cara del dímero de adenina (ver Figura 5.9), que conduce al máximo solapamiento e interacción entre los sistemas π de los monómeros.

Aunque el homodímero posee simetría espacial C_s , no se usan restricciones de simetría en el cálculo de las energías de los estados

electrónicos, para evitar los problemas relacionados con la ruptura de simetría de la función de onda.

A partir de aquí, las energías relativas estarán siempre referidas a la de dos moléculas aisladas de adenina en su estado fundamental. La Figura 5.10 contiene las PECs de la disposición simétrica cara-a-cara. En el límite asintótico S_1 y S_2 están degenerados. Esto está relacionado con las situaciones equivalentes $A + A^*$ y $A^* + A$, donde A y A^* representan, respectivamente, el estado fundamental de la adenina y su estado excitado singlete de menor energía. Por tanto, la absorción $S_0 \rightarrow S_1$ que se calcula para una R de 20 au corresponde a la del monómero y su energía es de 5.25 eV, lo que coincide con cálculos previos (ver Tabla 5.4).

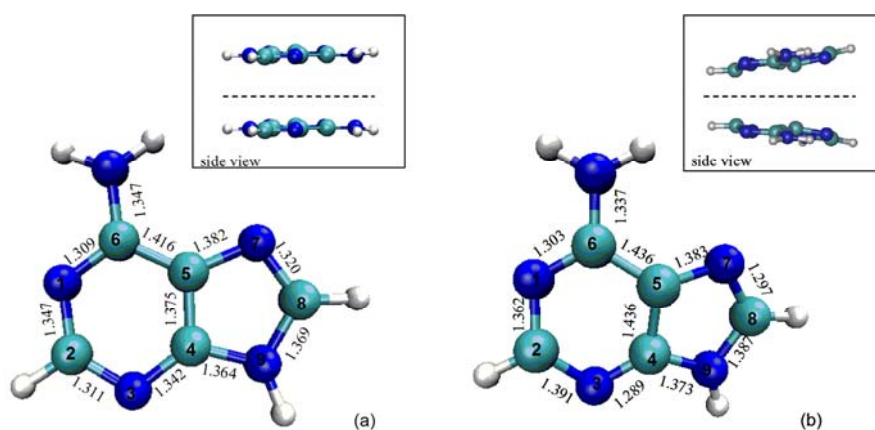


Figura 5.9. Nomenclatura para la molécula de adenina. La estructura (a) corresponde a la geometría de equilibrio del estado fundamental del monómero.⁶³ (b) corresponde al estado optimizado ${}^1(A^*A)_{exc} S_1$ del dímero de adenina. En la figura aparecen las principales distancias de enlace en Å. Los recuadros ilustran las disposición paralela cara-a-cara del dímero de adenina en (a), mientras que en (b) la orientación es la del mínimo cara-a-cara del estado optimizado ${}^1(A^*A)_{exc}$.

Cuando se obliga a las dos moléculas a estar paralelas, el PEC para el estado fundamental a nivel CASPT2 (12,12) es débilmente enlazante (ver Figura 5.10) siendo la energía de enlace de 0.13 eV con un mínimo a la distancia intermolecular de 3.704 Å. Para S_1 aparece un mínimo bien definido a 3.059 Å, con una energía de enlace de 0.83 eV. El estado electrónico S_2 es enlazante con una (CP- E_b) de 0.27 eV a una distancia intermolecular de 3.440 Å. En el mínimo local de S_1 , a partir de ahora denominado $^1(LE)$, la energía de emisión vertical calculada, 4.14 eV, es 0.3–0.4 eV menor que la fluorescencia medida en el monómero^{37,63,68,69,70,71} y puede relacionarse con el desplazamiento al rojo de la fluorescencia que se observa en los oligonucleótidos de adenina, lo que apoyaría al excímero como origen de esa emisión.

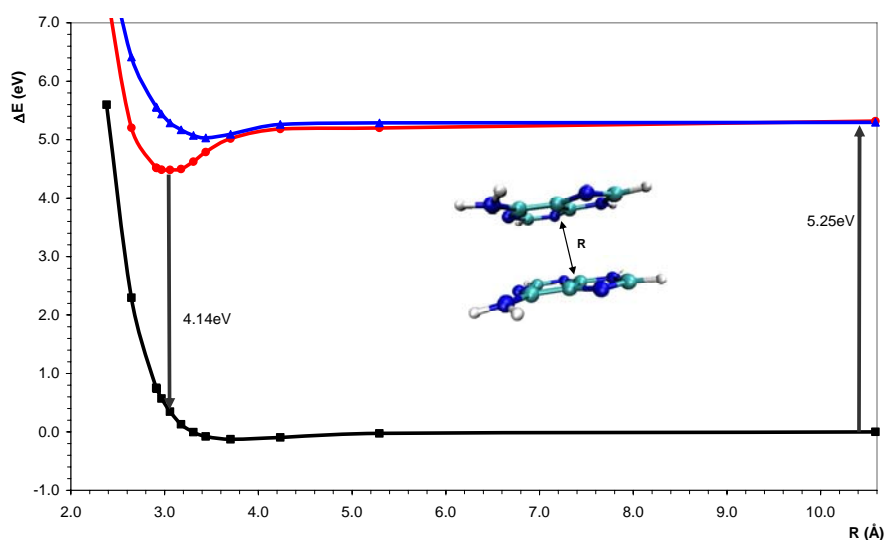


Figura 5.10. Curvas de energía potencial CASPT2+BSSE construidas respecto a la distancia intermolecular (R) de dos moléculas de adenina con apilamiento π cara-a-cara.

El pronunciado espacio de separación S_2-S_1 señala un eficiente acoplamiento entre los dos estados, como se ha visto que ocurría en sistemas relacionados (ver apartado 5.1). A la vista de estos resultados, se predice la existencia de excímeros de adenina y su formación se puede considerar como una propiedad intrínseca de los dímeros de DNA, puesto que ha sido determinada para otros dímeros de pirimidinas NABs.^{28,30,37,48,72}

La corrección del BSSE es esencial para que el cálculo de las energías de enlace sea preciso y para tener en cuenta la posición relativa de los diferentes estados exciméricos, aunque los valores de la energía vertical se ven a penas afectados, lo cual se debe al uso de los mismos orbitales promedio CASSCF para el cálculo vertical. Las PECs sin incluir el BSSE aparecen en la Figura 5.11. La diferencia más importante es que los estados electrónicos pierden un gran porcentaje de su carácter enlazante cuando el BSSE se tiene en consideración. De hecho, S_0 y S_2 tienen mínimos bien definidos en las PECs no corregidas y S_1 tiene una energía de enlace de 2.17 eV, 1.34 eV mayor que para la curva corregida CP. También decrece la distancia intermolecular del mínimo de S_1 en 0.144 Å si no se incluye el BSSE.

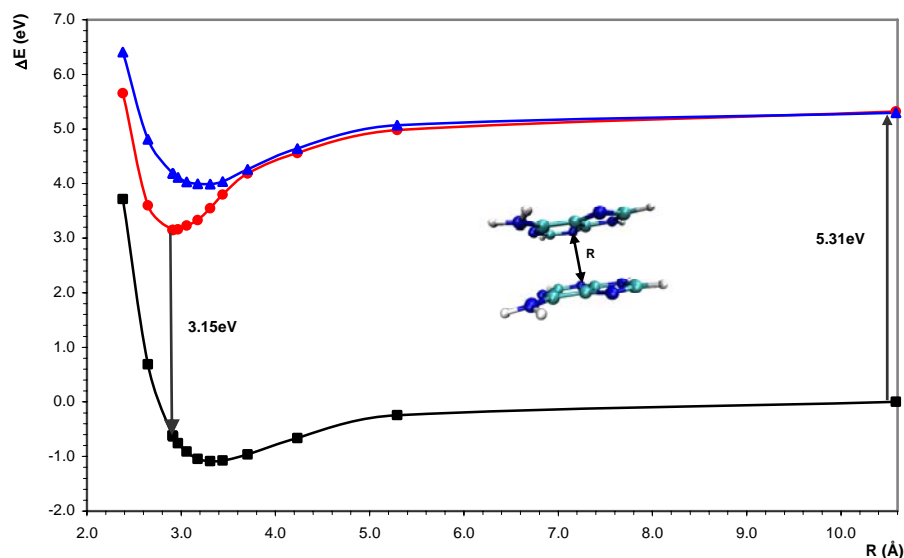


Figura 5.11. Curvas de energía potencial del estado fundamental y de los dos estados excitados singletes más bajos en energía construidas a nivel CASPT2 (12,12)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] (sin consideración del BSSE) respecto a la distancia intermolecular de dos citosinas en apilamiento- π cara-a-cara.

B. El estado excímero singlete relajado: ${}^1(A^*A)_{exc}$

Esta conformación para el homodímero se ha obtenido a través de la optimización de geometría del estado singlete de menor energía del dímero de adenina. Se usa inicialmente la restricción de simetría C_s , en la que el estado excitado de menor energía a nivel CASPT2 corresponde a la primera raíz de simetría $1A''$. Se utiliza el mismo espacio activo 12/12 distribuido en seis orbitales moleculares activos π de cada una de las representaciones irreducibles a' y a'' . Una vez optimizada la geometría, los estados excitados electrónicos singlete se calculan sin restricciones de simetría. El excímero singlete ${}^1(A^*A)_{exc}$ (cuya geometría optimizada aparece representada en la Figura 5.9 y 252

5.12), tiene una energía de enlace (CP- E_b) de 1.23 eV y está estabilizado 0.40 eV respecto al excímero de estructura $^1(\text{LE})$. La interacción entre los dos monómeros en esta conformación es la mayor posible puesto que el sistema conserva el total apilamiento de las bases y la distancia intermolecular decrece (en particular la distancia entre los átomos C_5 - C_5). La interacción entre los dos monómeros produce también una elongación del enlace C_4 - C_5 (C_4 - C_5) del monómero, el cual pierde su naturaleza de doble enlace. El estado S_2 en la geometría $^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$ tiene un CP- E_b de sólo 0.01 eV, mientras que el desdoblamiento S_2 - S_1 es de 1.74 eV, considerablemente mayor que en las otras situaciones estudiadas.

Este hecho refleja el fuerte acoplamiento entre los estados. La transición vertical a través del estado fundamental se calcula a 2.65 eV y 4.37 eV para S_1 y S_2 , respectivamente. El estado fundamental es claramente no enlazado (presenta una energía relativa de 1.37 eV sobre las moléculas aisladas de referencia). El carácter disociativo habla a favor de que esta conformación sea fuente de una emisión desestructurada y desplazada al rojo.

C. El estado singlete más bajo en la conformación del B-DNA.

El primer estado singlete en energía del dímero de adenina se estudia también en una conformación en la que la orientación relativa de los monómeros en la geometría de su estado fundamental tiene los parámetros estándar de la forma B del DNA.²⁷ Este modelo se caracteriza principalmente por un ángulo de torsión de 36° entre las dos unidades del dímero. La Figura 5.12 recopila las orientaciones relativas, las energías de enlace CASPT2, excitaciones verticales, y separación entre los estados excitados para distintas conformaciones del

homodímero de adenina. Como se puede extraer del esquema molecular, el apilamiento del estado fundamental en la forma B del DNA es muy diferente del que se encuentra en la geometría simétrica cara-a-cara (o de tipo “sándwich”) requerida para obtener los mínimos de energía ${}^1(\text{LE})$ y ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$, y que están concebidas para maximizar la interacción de apilamiento. En el estado fundamental de la forma B del DNA, las distancias interatómicas $R(\text{C}_4-\text{C}_4')$ y $R(\text{C}_5-\text{C}_5')$ son de 3.309 y 3.794 Å, respectivamente, ambas mayores que en el ${}^1(\text{LE})$ que es de 3.059 Å. El ángulo diedro $\langle \text{C}_4-\text{C}_5-\text{C}_5'-\text{C}_4' \rangle$ varía de 36° en el B-DNA a 0° en ${}^1(\text{LE})$ y ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$. El primer estado singlete en la forma B del DNA tiene una energía de enlace (CP-E_b) de 0.42 eV, siendo por tanto 0.41 eV y 0.81 eV menos estable que las formas ${}^1(\text{LE})$ y ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$, respectivamente. La separación S_2-S_1 es también más pequeña en la disposición B-DNA, lo que refleja un débil acoplamiento entre los estados.

Las transiciones verticales en el dímero de B-DNA, 5.14 eV (S_1) y 5.50 eV (S_2), están, ligeramente desplazadas hacia el azul si se compara con la transición más baja en energía singlete-singlete del ${}^1(\text{LE})$. Al mismo nivel de teoría, se calcula que el estado fundamental en la forma B es ligeramente enlazante, mostrando una energía de enlace corregida, CP-E_b , de 0.34 eV.

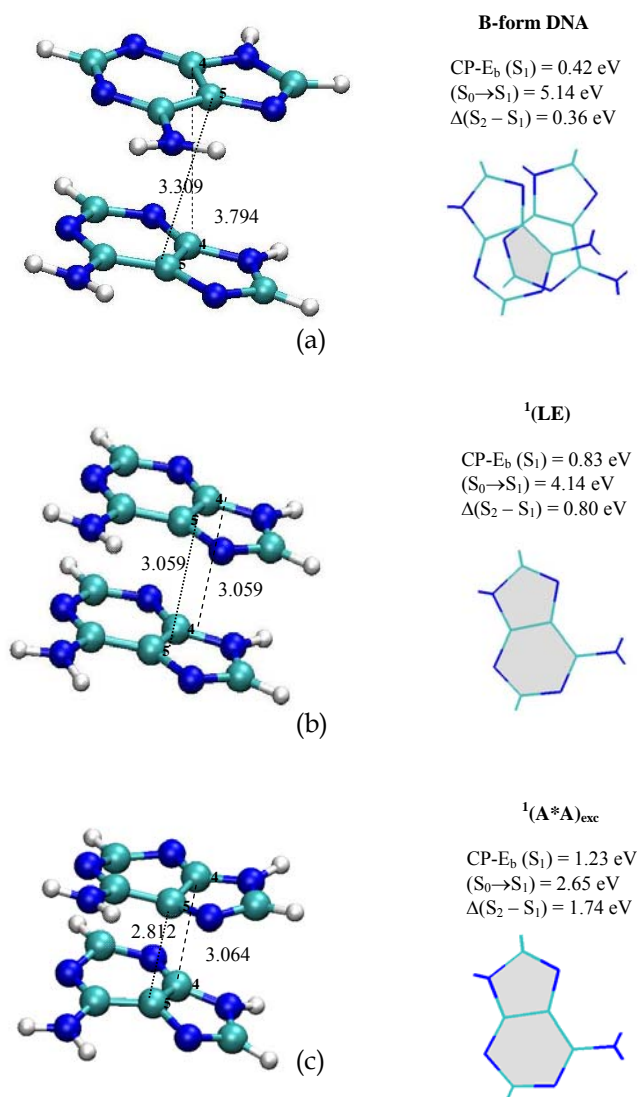


Figura 5.12. Estructuras para dos moléculas de adenina: (a) en el estado fundamental de la conformación B-DNA; (b) mínimo local del estado excitado S₁ en la estructura de tipo ¹(LE) con orientación simétrica cara-a-cara; (c) a la geometría optimizada del estado excitado, también con orientación cara-a-cara, ver en el texto. Las energías de enlace (CP-E_b) calculadas a nivel CASPT2 para S₁, las energías para las transiciones verticales (S₀→S₁), y la separación entre los dos estados más bajos en energía, Δ(S₂→S₁), están también incluidos. La distancia interatómica aparece en Å. Los esquemas de la parte derecha muestran el solapamiento en las diferentes estructuras.

D. Estados singlete de transferencia de carga. Efectos de la solvatación.

En esta sección se explora la intersección del dímero de adenina que concierne la localización de la transferencia de carga (CT) intermonomérica de los estados singlete. Con el fin de encontrar la estructura más favorable de las de este tipo, se usan varias conformaciones. Las geometrías del estado fundamental que corresponden al catión de adenina (A_{cat}) y el anión (A_{an}) obtenidos de cálculos previos a nivel CASSCF(12,10 $\pi\pi^*$)/ANO-L C,N[4s3p1d]/H[2s1p]^{73,74} fueron las que se emplearon en un primer momento. Usando estas unidades se construyen dos estructuras: ${}^5A_{\text{cat}}A_{\text{an}}{}^3$, en la que el monómero A_{cat} está situado en la posición que corresponde al extremo 5' de una hipotética cadena de DNA, mientras que el monómero A_{an} está en el 3', y la ${}^5A_{\text{an}}A_{\text{cat}}{}^3$, en la que la posición de los monómeros está invertida. En la Figura 5.13 aparecen estas dos conformaciones y en la Tabla 5.5 se recogen las excitaciones verticales, las posiciones relativas y la naturaleza de los estados excitados singlete calculados para estos sistemas aislados con y sin entorno acuoso.

Los cálculos realizados en dímeros de adenina aislados a nivel CASPT2 e incluyendo el BSSE, muestran que la cuarta y la sexta raíz corresponden a estados de CT de las conformaciones (${}^5A_{\text{cat}}A_{\text{an}}{}^3$) y (${}^5A_{\text{an}}A_{\text{cat}}{}^3$), respectivamente. En la última, el estado CT (con un 59% de carácter de transferencia de carga) es demasiado alto en energía para ser competitivo con los estados excitados singlete neutros de menor energía.

Para la conformación ${}^5A_{\text{cat}}A_{\text{an}}{}^3$, en la cual nos centraremos a partir de ahora, el estado más bajo CT (con un 80% de carácter CT) se localiza a 4.95 eV respecto al sistema de referencia (las dos moléculas de adenina aisladas). Tiene una energía de enlace de 0.30 eV, todavía menor

que la encontrada para el estado excímero más bajo en la disposición del DNA. Además, este estado CT está situado casi 1 eV por encima en energía que el estado excitado singlete más bajo $^1(A^*A)_{exc}$, (como será discutido más adelante) y está prácticamente degenerado con otros estados que presentan una naturaleza en la que la carga electrónica está deslocalizada.

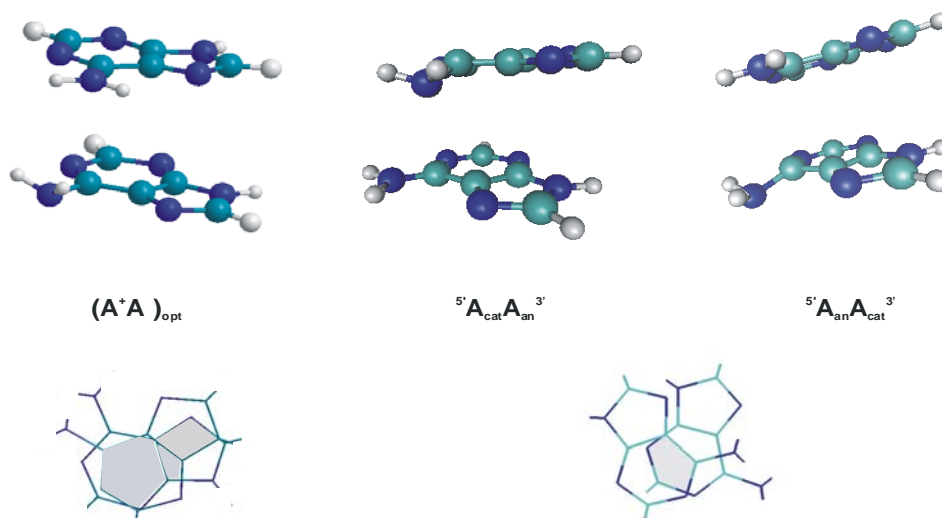


Figura 5.13. Estructuras de las distintas disposiciones estudiadas de tipo anión-cación del dímero de adenina y solapamiento entre los dos monómeros apilados. Mientras que la geometría $(A^*A^-)_{opt}$ ha sido adaptada de la referencia 50 (ver texto), la geometría optimizada del estado fundamental de los correspondientes monómeros aniónicos y catiónicos han sido construidas en un dímero orientado en la conformación del B-DNA. Las vistas inferiores muestran el solapamiento entre los dos monómeros en las diferentes estructuras.

Para analizar el papel que un entorno solvatado puede jugar en la posición relativa de los estados tipo excímeros, se han realizado cálculos en los que se modelizan los efectos que causaría un medio acuoso, mediante la aproximación del campo de reacción CASPT2/PCM. Como se observa en la Tabla 5.5, la energía del estado de tipo excímero CT se estabiliza tanto verticalmente como de forma relativa a los monómeros separados (respecto a los que pasa a estar a 4.67 eV) con lo que se convierte en el estado excitado más bajo en esta conformación. Sin embargo, si se compara con la $^1(A^*A)_{exc}$, que estaba situada a 4.02 eV en fase gas, el estado CT todavía se encuentra por encima de dicha energía. El mínimo del estado S_1 $^1(A^*A)_{exc}$ se calcula a 3.95 eV en el entorno acuoso, débilmente estabilizada respecto al valor de la fase gas, pero en cualquier caso mucho más estable que el estado CT.

Las estructuras de tipo $A_{cat}A_{an}$ están dispuestas en la conformación característica del B-DNA, en la que el solapamiento de las unidades apiladas es menor que en otras disposiciones (ver Figuras 5.12 y 5.13). Puesto que la energía de enlace y la posición relativa de los estados de tipo excímero dependen fuertemente del grado de apilamiento y solapamiento, se realizan una serie de cálculos adicionales en una estructura óptima para conseguir estados de tipo CT a bajas energías pero con un solapamiento ligeramente superior (ver Figura 5.13). La geometría utilizada, a partir de ahora denominada $(A^+A^-)_{opt}$, fue adaptada de la optimizada por Santoro y colaboradores⁵⁰ para el estado CT de menor energía del dímero de 9-metiladenina a nivel de cálculo TD-DFT/PCM/PBE0/6-31G(d). Los grupos metilo fueron reem-

Tabla 5.5. Energías (ΔE /eV) verticales (VE) y relativas (al estado fundamental de dos monómeros aislados, RE) de los estados singlete más bajos en energía en las estructuras $(A^+A^-)_{opt}$, ${}^5A_{cat}A_{an}{}^3$, y ${}^5A_{an}A_{cat}{}^3$ calculadas a nivel CASPT2 y con corrección del BSSE. También se incluye el resultado en medio acuoso a nivel CASPT2/PCM y el porcentaje del carácter CT de los estados correspondientes.

Estado	$(A^+A^-)_{opt}^a$						${}^5A_{cat}A_{an}{}^3$						${}^5A_{an}A_{cat}{}^3$					
	Fase gas		Agua		Naturaleza		Fase gas		Agua		Naturaleza		Fase gas		Agua		Naturaleza	
	VE ^b	RE	VE	RE	ΔE	CT ^c	VE ^b	RE	ΔE	CT ^c	VE ^b	RE	ΔE	CT ^c	VE ^b	RE	ΔE	CT ^c
S ₁	4.42	4.30	4.64	4.26	4.62	4.95	4.31	4.67	80%	4.62	4.95	4.31	4.67	80%	4.32	4.67	4.32	4.67
S ₂	4.60	4.34	4.67	4.29	4.58	4.91				4.58	4.91				4.61	4.96	4.61	4.96
S ₃	4.71	4.38	4.70	4.33	4.61	4.94				4.61	4.94				4.90	5.25	4.90	5.25
S ₄	4.94	4.61	4.77	4.39	4.68	5.01	34%			4.68	5.01				5.49	5.84	5.49	5.84
S ₅	5.18	4.85	4.99	4.61	5.81	6.14	45%			5.81	6.14				5.57	5.92	5.57	5.92

^a Adaptada de la Referencia 47, optimizada a nivel TDDFT.

^b El estado fundamental está localizado -0.33 eV (gas) y -0.38 eV (agua) $(A^+A^-)_{opt}$, 0.33 eV (gas) y 0.36 eV (agua) $({}^5A_{cat}A_{an}{}^3)$, y 0.35 eV $({}^5A_{an}A_{cat}{}^3)$ sobre o bajo la energía de referencia (dos monómeros aislados).

^c Basado en el análisis de población LoProp. Los estados neutrales tienen un carácter CT despreciable en todos los casos.

reemplazados por átomos de hidrógeno con distancias de enlace NH de 1.00 Å. Las geometrías de cada una de las unidades en esta geometría se parecen al monómero del catión y del anión.⁵⁰ Independientemente de la posición relativa a la cual el método TD-DFT localice a los estados CT (típicamente produce energías de excitación demasiado bajas) se puede esperar que estos parámetros geométricos sean razonables. En cualquier caso, se analizaron también otras disposiciones que pudiesen conducir a la estabilización de los estados CT. Como se puede deducir de la Tabla 5.5, el estado más bajo CT para la geometría $(A^+A^-)_{opt}$ se localizó (en la fase gaseosa) a energías superiores (~0.3 eV) que los estados no-CT, y sólo cuando el solvente se toma en consideración, se estabiliza y se sitúa próximo al resto de estados (4.39 eV). Con este valor para la energía, se situaría aproximadamente 0.3 eV por debajo de los valores que se obtienen en otras conformaciones. La transferencia de carga de un monómero a otro no es tan pronunciada (34%) en la función de onda CASSCF(12,12), si se compara también con los estados CT encontrados en otras conformaciones. Por tanto se puede concluir que, ciertamente esta estructura proporciona los estados excímeros CT más estables, pero estos todavía están más altos en energía que en la conformación ${}^1(A^*A)_{exc}$, incluso en un solvente polar como el agua, donde la excitación vertical y energía relativa del mínimo S_1 del ${}^1(A^*A)_{exc}$ se calcula a 2.58 eV y 3.95 eV, respectivamente. Cabe esperar que esta conclusión sea igualmente válida para otros homodímeros de nucleobases. Sin embargo, los estados CT podrían ser más competitivos en los heterodímeros.

E. Absorción Transitoria de los Dímeros de Adenina

Crespo-Hernández y colaboradores¹ recogieron la señal de absorción transitoria de femtosegundos para el oligonucleótido (dA)₁₈ del DNA en solución acuosa. De acuerdo con sus resultados, tras la excitación inicial se puebla rápidamente un estado que se puede asignar como singlete. La absorción desde este estado se mide a 570 nm (2.18 eV), y se observa que se produce un decaimiento a partir de tiempos mayores de 10 ps repoblándose de nuevo el estado fundamental. La población de S₀ se detecta, de forma simultánea, monitorizando su típica absorción a 250 nm (4.96 eV). Hemos calculado el espectro de absorción transitoria para los estados de menor energía en cuatro conformaciones diferentes. Las energías para las transiciones S₀↔S₁ y S₀↔S₂ y aquellas con fuerzas de oscilador importantes están recogidas en la Tabla 5.6.

Tras la absorción inicial a 266 nm (4.66 eV), probablemente se producirá una deslocalización electrónica por todas las bases de la cadena del oligómero, dándose una situación de tipo excitón.³ Después se producirá una evolución hacia diferentes estructuras de tipo excímero. El rendimiento de su formación, dependerá de la flexibilidad y la dinámica de la cadena. La mayor parte de la absorción transitoria del estado excitado tendrá lugar desde conformaciones favorables, como son los mínimos de S₁. De las cuatro estructuras estudiadas aquí, B-DNA, (A⁺A⁻)_{opt}, ¹(LE), y ¹(A^{*}A)_{exc}, las dos últimas son las que mejor apoyan el experimento fs-ESA (*Excited State Absorption*) y por tanto, se pueden considerar buenas candidatas para originar la fluorescencia desplazada al rojo. En ambas conformaciones, los estados excitados singlete, de naturaleza excimérica, presentan absorciones a estados superiores situados entre 2.09–2.33 eV. Por el contrario, en las conforma-

Tabla 5.6. Diferencias de energía CASPT2 ($\Delta E/eV$) y fuerzas de oscilador (f) de las transiciones más relevantes entre el estado fundamental y los estados excitados del dímero de adenina a diferentes conformaciones.^a

B-DNA		$(A^*A^-)^b_{opt}$		${}^t(LE)$		${}^t(A^*A)_{exc}$					
$S_0 \leftrightarrow S_1$	5.15	0.037	$S_0 \leftrightarrow S_1$	4.42	0.254	$S_0 \leftrightarrow S_1$	4.14	0.0001	$S_0 \leftrightarrow S_1$	2.65	0.011
$S_0 \leftrightarrow S_2$	5.50	0.072	$S_0 \leftrightarrow S_2$	4.60	0.009	$S_0 \leftrightarrow S_2$	4.94	$< 10^{-4}$	$S_0 \leftrightarrow S_2$	4.37	0.028
<i>Absorción desde el Estado Fundamental</i>											
$S_1 \rightarrow S_4$	0.43	0.0015	$S_1 \rightarrow S_5$	0.93	0.0157	$S_1 \rightarrow S_5$	0.92	0.026	$S_1 \rightarrow S_5$	2.18	0.029
$S_1 \rightarrow S_6$	1.03	0.0007	$S_4 \rightarrow S_5$	0.39	0.0221	$S_1 \rightarrow S_{12}$	2.33	0.182	$S_1 \rightarrow S_6$	2.24	0.224
$S_2 \rightarrow S_5$	0.75	0.0187	$S_5 \rightarrow S_{15}^{CT}$	1.72	0.0369	$S_1 \rightarrow S_{13}$	2.34	0.061	$S_1 \rightarrow S_7$	2.52	0.021
$S_2 \rightarrow S_7$	1.13	0.0131	$S_{10}^{CT} \rightarrow S_{17}$	1.02	0.0217	$S_1 \rightarrow S_{18}$	2.88	0.046	$S_1 \rightarrow S_8$	2.60	0.114
$S_2 \rightarrow S_8$	1.32	0.0003	$S_{12} \rightarrow S_{21}^{CT}$	1.06	0.0278	$S_2 \rightarrow S_{12}$	2.09	0.136	$S_1 \rightarrow S_{11}$	2.85	0.133
$S_2 \rightarrow S_{12}$	1.94	0.0015	$S_{14} \rightarrow S_{16}$	0.39	0.0233	$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.054	$S_2 \rightarrow S_{16}$	2.28	0.005
$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.0198	$S_{14} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.97	0.0637	$S_4 \rightarrow S_{15}$	1.75	0.122	$S_2 \rightarrow S_{17}$	2.43	0.134
$S_2 \rightarrow S_{14}$	2.12	0.0126	$S_{16} \rightarrow S_{20}$	0.40	0.0270	$S_5 \rightarrow S_{18}$	1.81	0.131	$S_3 \rightarrow S_{10}$	1.02	0.060
$S_4 \rightarrow S_{19}$	1.95	0.0107	$S_{16} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.57	0.0392	$S_6 \rightarrow S_{17}$	1.70	0.146	$S_3 \rightarrow S_{15}$	2.11	0.027
<i>Absorción desde el Estado Excitado^c</i>											
$S_1 \rightarrow S_4$	0.43	0.0015	$S_1 \rightarrow S_5$	0.93	0.0157	$S_1 \rightarrow S_5$	0.92	0.026	$S_1 \rightarrow S_5$	2.18	0.029
$S_1 \rightarrow S_6$	1.03	0.0007	$S_4 \rightarrow S_5$	0.39	0.0221	$S_1 \rightarrow S_{12}$	2.33	0.182	$S_1 \rightarrow S_6$	2.24	0.224
$S_2 \rightarrow S_5$	0.75	0.0187	$S_5 \rightarrow S_{15}^{CT}$	1.72	0.0369	$S_1 \rightarrow S_{13}$	2.34	0.061	$S_1 \rightarrow S_7$	2.52	0.021
$S_2 \rightarrow S_7$	1.13	0.0131	$S_{10}^{CT} \rightarrow S_{17}$	1.02	0.0217	$S_1 \rightarrow S_{18}$	2.88	0.046	$S_1 \rightarrow S_8$	2.60	0.114
$S_2 \rightarrow S_8$	1.32	0.0003	$S_{12} \rightarrow S_{21}^{CT}$	1.06	0.0278	$S_2 \rightarrow S_{12}$	2.09	0.136	$S_1 \rightarrow S_{11}$	2.85	0.133
$S_2 \rightarrow S_{12}$	1.94	0.0015	$S_{14} \rightarrow S_{16}$	0.39	0.0233	$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.054	$S_2 \rightarrow S_{16}$	2.28	0.005
$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.0198	$S_{14} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.97	0.0637	$S_4 \rightarrow S_{15}$	1.75	0.122	$S_2 \rightarrow S_{17}$	2.43	0.134
$S_2 \rightarrow S_{14}$	2.12	0.0126	$S_{16} \rightarrow S_{20}$	0.40	0.0270	$S_5 \rightarrow S_{18}$	1.81	0.131	$S_3 \rightarrow S_{10}$	1.02	0.060
$S_4 \rightarrow S_{19}$	1.95	0.0107	$S_{16} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.57	0.0392	$S_6 \rightarrow S_{17}$	1.70	0.146	$S_3 \rightarrow S_{15}$	2.11	0.027

^a Energías relativas de los respectivos estados fundamentales respecto a la de los dos monómeros separados: -0.34 eV (B-DNA), -0.33 eV (A^*A^-)_{opt}, 0.25 eV (${}^t(LE)$), 1.37 eV (${}^t(A^*A)_{exc}$).

^b Geometría adaptada de la Referencia 47. (Ver texto).

^c Sólo se muestran las nuevas transiciones con las fuerzas de oscilador más grandes.

ciones de tipo B-DNA y $(A^+A^-)_{opt}$ no se encuentran absorciones transitorias próximas a la experimental (2.18 eV), aunque sí que se ofrecen fuertes absorciones transitorias de energías más altas. De acuerdo con estos resultados, la señal monitorizada a 570 nm en el experimento de absorción transitoria podría ser causada por la transición electrónica desde el estado S_1 del dímero de adenina en las estructuras ${}^1(LE)$ o ${}^1(A^*A)_{exc}$, indicando que tiene lugar una relajación (ultrarrápida como se había sugerido)⁴⁷ de la estructura del dímero tras la excitación del DNA con el láser de bombeo y antes de la excitación con el láser de exploración.

Si las dos estructuras se toman como límites del proceso de relajación, se puede esperar un rango de energías para la fluorescencia de entre 4.14–2.65 eV, lo que cubre el dominio observado 310-550 nm (4.0–2.3 eV).⁶ Por otra parte, la repoblación del estado fundamental, que se monitoriza gracias a su absorción a 250 nm (4.96 eV), está próxima a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ que se calcula para el dímero con conformación B-DNA o para la del monómero. Esta absorción puede tener lugar en un régimen mucho más lento, como se discutirá en la siguiente sección. En resumen, aquellas disposiciones de los monómeros cara-a-cara parecen ser las mejor cualificadas para formar el excímero del homodímero.

F. Proceso de desactivación del Excímero de Adenina.

A partir de los cálculos CASPT2 descritos para el homodímero de adenina podemos proponer un modelo para la dinámica de decaimiento de los oligómeros de las moléculas de adenina apiladas (ver Figura 5.14). Podemos suponer que en el momento de la absorción el sistema adquiere una forma excitada de tipo excitón que rápidamente

evoluciona hacia la formación del estado excímero favorable en el estado excitado más bajo. Las señales de larga vida media que se encuentran en dinucleótidos son indistinguibles de las que se encuentran en secuencias de homoadeninas, lo que apunta a que el mismo estado de tipo excímero se forma en todos los sistemas.⁴⁷ La absorción inicial (250 nm, 4.96 eV en el experimento fs-ESA)^{1,6} se espera que tenga lugar desde el estado S_1 del monómero (calculado a 5.25 eV) y sobre todo desde la estructura B-DNA (5.14 eV verticalmente, y 4.80 eV adiabáticamente). Desde ese momento, se pueden imaginar dos principales caminos de decaimiento. La predominancia de uno u otro dependerá del balance entre las fuerzas que conduzcan a una fuerte interacción de las nucleobases apiladas y de las fuerzas mecánicas involucradas en la flexibilidad inherente de las cadenas del oligómero de DNA. El sistema podría adoptar una conformación más apilada, decayendo de una forma ultrarrápida hacia estructuras tipo excímero más favorables, o, en caso de que se adopten conformaciones de menor apilamiento, o incluso ninguno, la población se puede localizar en el monómero y sufrir un decaimiento ultrarrápido al estado fundamental a través de la bien conocida intersección cónica del monómero ($gs/\pi\pi^*$)_{CL}, localizada a nivel CASPT2 cerca de los 4.0 eV (ver Figure 5.14).^{63,65} Este camino de relajación, cuando las nucleobases no están apiladas, es el dominante en las dinámicas de dinucleótidos tras la excitación a 267 nm (4.96 eV), lo que se refleja en el comportamiento de las dinámicas en la región transitoria azul⁶ y se le asignan tiempos de vida de ~2 ps (puesto que la etapa limitante de velocidad es la transferencia vibracional de energía al entorno.)⁴⁷ Obsérvese la Figura 5.14, que puede ser entendida como un esquema de niveles de energía. La evolución desde S_1 desde las estructuras inicialmente fotoinducidas

hacia diferentes conformaciones exciméricas no requiere pasar secuencialmente por cada una de las disposiciones representadas. Gracias a la flexibilidad inherente del DNA, que permite movimientos nucleares a gran escala, el grado de solapamiento y apilamiento de los excímeros pueda aumentar y el dímero puede evolucionar hacia situaciones más estables. Existe la hipótesis¹⁶ de que el dímero puede alcanzar una conformación excimérica de separación de cargas (A^+A^-)* que sería responsable de la mayor parte de la emisión. Para distintos heteronucleótidos se ha encontrado una correlación entre sus vidas medias y la fuerza conductora para la recombinación de cargas (considerando la diferencia entre los potenciales de ionización y las electroafinidades). La situación es menos clara para los homodímeros, en particular en la timina donde los excímeros no son detectados,¹ probablemente porque en este caso hay otros canales de desactivación como muestran cálculos CASPT2.³⁷ En el caso del homodímero de adenina hemos encontrado que los estados CT no son las conformaciones más estables de excímero, incluso en disolución acuosa, Este hecho no implica que no puedan ser alcanzados en importantes cantidades, porque a causa de la evolución del sistema, el rendimiento de formación de las diferentes conformaciones en el estado excímero depende también de la capacidad de la cadena en adoptar la posición favorable para el propio apilamiento. Es más, la situación puede ser bastante diferente en heterodímeros de NABs, no sólo porque el grado de solapamiento y apilamiento es mucho menor, sino también porque la fuerza de recombinación de cargas será más favorable que en homodímeros, en particular para pares de bases de purinas y pirimidinas, en las que se compensará fácilmente su respectivo carácter

donor y aceptor. En los homodímeros, sin embargo, hemos encontrado que las conformaciones cara-a-cara (giradas 36° respecto a la forma B-DNA), donde el solapamiento entre las nubes electrónicas π es máximo, dan lugar a situaciones de excímero mucho más estables, y se espera que se alcancen en cantidades notables. La buena correspondencia entre el espectro de absorción transitoria experimental y el calculado también apoya esta conclusión. Las conformaciones cara-a-cara, particularmente

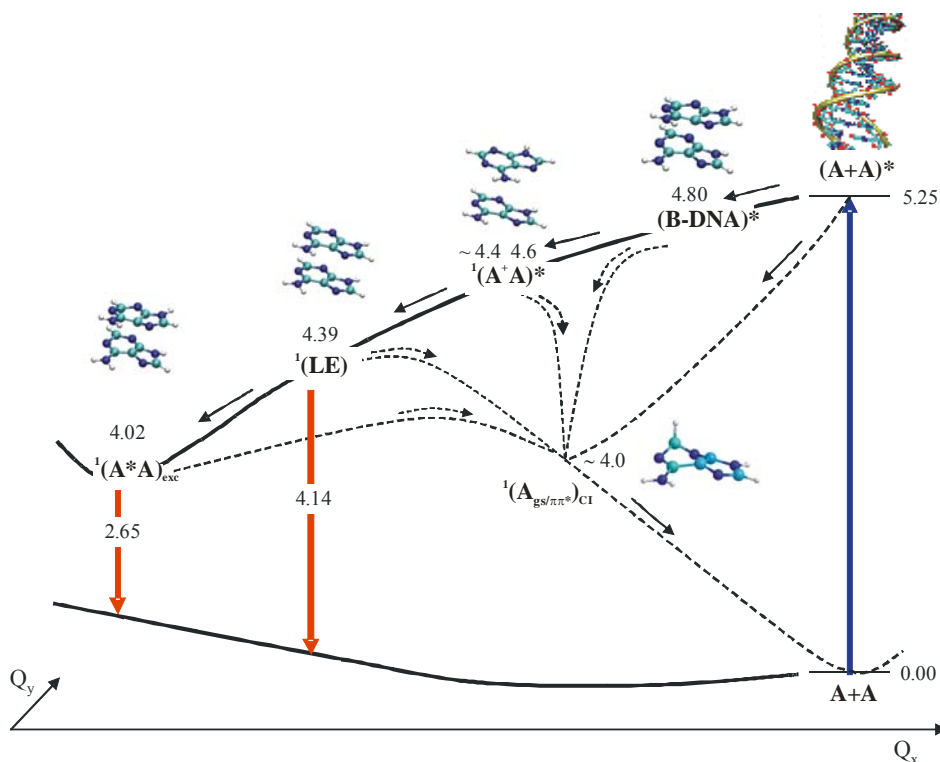


Figura 5.14. Esquema propuesto, basado en los datos CASPT2 expuestos, para el camino de decaimiento del estado excitado singlete más bajo en energía (S_1) del dímero de adenina que involucra varias conformaciones del excímero y del monómero de adenina que involucra varias conformaciones del excímero y la intersección cónica del monómero de adenina ($gs/\pi\pi^*$)_{Cl}. Los valores de las energías relativas se dan en eV. La coordenada Q_x está principalmente relacionada con la distancia intermolecular promedio de las dos unidades, mientras que Q_y está asociada al resto de grados de libertad del monómero y del dímero.

$^1(A^*A)_{exc}$, son análogas a aquellas adquiridas por los homodímeros de citosina⁷⁵ y de timina⁷⁶ y que son precursores de la formación de dímeros de ciclobutano pirimidina, con rendimientos de formación importantes.^{4,77} En el homodímero de adenina las energías de emisión calculadas para el excímero comprenden el intervalo desde 4.14 eV, emisión vertical desde $^1(LE)$ hasta 2.65 eV, emisión vertical desde $^1(A^*A)_{exc}$. El dominio que se sugiere para la emisión del excímero es de 4.0–2.3 eV,⁶ considerablemente desplazada al rojo respecto a la fluorescencia del monómero (4.5–4.8 eV).^{63,68,69,70,71}

Una vez que se ha alcanzado la estructura del excímero, el decaimiento hacia el estado fundamental debería ser mucho más lento. El principal canal para la conversión interna en el homodímero de adenina es la intersección cónica del monómero ($gs/\pi\pi^*$)_{CI}, localizada cerca de los 4.0 eV, esto es, casi isoenergética con la estructura del excímero más estable $^1(A^*A)_{exc}$. Como el excímero es un mínimo en la superficie de energía potencial de S_1 , probablemente existirá una barrera en el camino de decaimiento hacia la CI, a la cual se puede atribuir el proceso de poner en libertad la interacción de apilamiento y la localización de la excitación en uno de los monómeros. Es de esperar que a través de varios tipos de barreras, con diferentes pesos, todos los caminos conecten la superficie de energía del excímero con el canal CI. Por tanto, se puede atribuir a este canal de desactivación las vidas medias de entre 103 y 182 ps, que se han encontrado en diferentes oligómeros^{1,6,47} de adenina cuando se ha estudiado la desactivación del singlete al estado fundamental. Además también se apoya la idea de que existen varios canales de decaimiento desde los diferentes mínimos del excímero. Los resultados obtenidos para el sistema en agua no cambia el

esquema global, incluso cuando la estabilización de los estados CT es mayor (~0.2-0.3 eV) que la que experimentan los estados no CT (< 0.1 eV) (ver tabla 5.4 y el texto). En el entorno polar es, sin embargo posible que la participación de los estados CT aumente.

Para algunos heterodímeros de NABs las vidas medias del decaimiento se han recogido en el rango de 10-100 ps.⁴⁷ Recientes experimentos fs-ESA realizados en cadenas con oligómeros alternantes (d(GC)₉) o parcialmente no alternantes (d(C₄G₄), d(C₅T₄G₅), d(C₅A₄G₅))⁷⁸ muestran como los últimos decaen mucho más lentamente, lo que puede ser claramente atribuido a la predominancia del apilamiento en el homodímero, promotora de una más fuerte interacción y estados excímero más bajos en energía con vidas medias más largas. La importancia de los excímeros CT será menor en esos casos. Finalmente, es importante recordar que, especialmente en dímeros de pirimidinas, existían otros canales de desactivación hacia la formación de los aductos de bipyrimidinas como ya se ha descrito para los homodímeros de citosina y timina.^{30,76} En el caso del dímero de citosina, la correspondiente intersección cónica se calculó a 3.5 eV, competitiva con la del monómero, a 3.6 eV, y ligeramente mayor que la del estado excímero ¹(C*C)_{exc} a 3.3 eV. Para la timina, por el contrario, la CI que conduce a la formación del aducto se encontró cerca de los 3.3 eV, mucho menor que el estado excímero ¹(T*T)_{exc} a 3.6 eV, y la CI del monómero a 3.9 eV. Esto explicaría la causa de que se encuentre un rendimiento en la formación de aductos de timina que en los aductos de citosina.^{30,76} No se debe olvidar, que en todos los sistemas existirían también caminos adicionales de desactivación que tendrían lugar vía

tripleto. Su importancia tendrá relación con el grado de acoplamiento espín-orbita.³⁰

- **Papel de los excímeros en el control de la fotofísica y fotoquímica de las NABs**

El mayor objetivo de la presente investigación es entender el papel que los excímeros de adenina desempeñan en la fotofísica y fotoquímica de los oligonucleótidos de adenina. Nuestros cálculos en el homodímero de adenina, junto con nuestros estudios previos en los homodímeros de pirimidinas,^{30,76} apoyan la idea de que los estados excitados de larga vida media vistos en sistemas modelos de DNA son de tipo excímero (exciplejo), y constituyen el origen del desplazamiento al rojo de la fluorescencia observado en diferentes oligonucleótidos.^{1,6,7,8,9} La flexibilidad del DNA es crucial para la formación del excímero puesto que el grado de acoplamiento entre las dos unidades, y por tanto la estabilidad de la conformación del excímero dependerá de la orientación accesible en la cadena de DNA. Nosotros presentamos aquí dos casos extremos, la estructura del B-DNA donde el solapamiento de los dos monómeros de adenina es limitado, y el excímero $^1(A^*A)_{exc}$ donde la interacción es máxima. Existirán estructuras intermedias a estas dos que se traten de excímeros con transferencia de carga localizada. La importancia en su rendimiento de formación variará en la secuencia de nucleótidos dependiendo de la fuerza conductora que controle la separación de cargas entre los pares de bases. No es de esperar que la fuerza conductora aumente demasiado puesto que la nucleobase se encuentra en un entorno biológico, donde el nucleótido

está rodeado de contraiones.⁷⁹ La evolución del sistema se puede entender como una bifurcación inicial entre los pares de nucleobases apilados y no apilados, que pueden evolucionar de un modo ultrarrápido (en el régimen de los picosegundos) hacia la formación de estados excímero o al estado fundamental, respectivamente. En el último caso, el proceso será mediado por una intersección cónica entre los estados S_1 y S_0 del monómero, $(gs/\pi\pi^*)_{CI}$. Por otra parte, el estado excímero será origen de una débil fluorescencia y tendrá unos tiempos de decaimiento mucho más lentos (desde decenas a cientos de picosegundos) al estado fundamental, una vez se haya superado la barrera para alcanzar la CI del monómero. Como hemos visto en los trabajos comentados anteriormente, para el caso de los dímeros de piridimidina existen canales adicionales para la desactivación mediante la formación de aductos de nucleobases como el dimero ciclobutano pirimidina a través de la correspondiente intersección cónica o cruce singlete-triplete.^{30,76}

Según lo visto, queda claro que las dinámicas de DNA (ver referencia 80 para una revisión reciente), su fotofísica y su fotoquímica, estará controlada, en gran medida, por la formación de excímeros/exciplejos. El rendimiento en la formación de estos dímeros excitados, dependerá de las propiedades conformacionales de la cadena de DNA y de la posibilidad de generar orientaciones reactivas. Las interacciones por apilamiento dentro de una misma cadena parecen ser más relevantes para explicar las dinámicas de relajación del DNA, que las interacciones entre cadenas de tipo intercambio de hidrógeno/protón.

La importancia relativa de las diferentes conformaciones excímero/exciplejo, cara-a-cara o transferencia de carga, en la fotoquímica de la diferente secuencia de nucleobases tendrá que ser estudiada en el futuro desde un punto de vista teórico, en particular en la formación de exciplejos.

References

- ¹ Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1977-2019
- ² Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B. *Nature* **2005**, 436, 1141-1144.
- ³ Marguet, S.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5780-5781.
- ⁴ Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, 315, 625-629.
- ⁵ Holman, M. R.; Ito, T.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6-7.
- ⁶ Kwok, W.-M.; Ma, C.; Phillips, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11894-11905.
- ⁷ Eisinger, J.; Shulman, R. G. *Science* **1968**, 161, 1311-1319.
- ⁸ Eisinger, J.; Guéron, M.; Shulman, R. G.; Yamane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1966**, 55, 1015-1020.
- ⁹ Plessow, R.; Brockhinke, A.; Eimer, W.; Kohse-Höinghaus, K. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104, 3695.
- ¹⁰ Danilov, V. I.; Slyusarchuk, O. N.; Alderfer, J. L.; Stewart, J. J. P.; Callis, P. R. *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 125.
- ¹¹ Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 1218.
- ¹² Roos, B. O.; Fülcher, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.*, **1996**, 93, 219.
- ¹³ Merchán, M.; Serrano-Andrés L. In *Computational Photochemistry*, Olivucci M. Ed. Elsevier: Amsterdam, **2005**.
- ¹⁴ Andersson, K. *et al.* *MOLCAS, version 6.0*; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund, P.O.B. 124, S-221 00 Lund, Sweden, 2004.
- ¹⁵ Pierloot, K.; Dumez, B.; Widmark, P.-O.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta*, **1995**, 90, 87.

- ¹⁶ Forsberg N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 274, 196.
- ¹⁷ Merchán, M.; Pou-Amérigo, R.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 252, 405.
- ¹⁸ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8108.
- ¹⁹ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1820.
- ²⁰ Fülcher, M. P.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2089.
- ²¹ Callis, P. R. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, 34, 329.
- ²² Boys S.F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, 100, 65.
- ²³ Widmark, P.-O.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O.; *Theor. Chim. Acta*, **1990**, **77**, 291.
- ²⁴ Jurecka, P.; Sýponer, J.; Hobza, P. *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 5466.
- ²⁵ Widmark, P.-O.; Malmqvist, P.-A.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta.* **1990**, **77**, 291.
- ²⁶ Dunning, T. H. Jr. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 1007.
- ²⁷ Lu, X.-J.; Olson, W. K. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 5108-5121.
- ²⁸ Olasso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, 231102.
- ²⁹ Birks, J. B. *Rep. Prog. Phys.* **1975**, 38, 903-974.
- ³⁰ Roca-Sanjuán, D.; Olasso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10768-10779.
- ³¹ Roca-Sanjuán, D. In *“Bases moleculares de la Fotorreactividad y Transferencia de carga en el ADN”*. **2009**. Universitat de Valencia.
- ³² Word, P. D.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4256-4263.
- ³³ Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6318-6319.

- ³⁴ Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioorganic Photochemistry*; Morrison, H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, **1990**; Vol. 1, pp 1-272.
- ³⁵ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1820-1825.
- ³⁶ Climent, T.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, 441, 327-331.
- ³⁷ Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, 111, 11880-11883.
- ³⁸ Klöpffer, W. In: *Organic Molecular Photophysics*, Birks, J. B., Ed., Interscience, London, **1973**, pp 357-402.
- ³⁹ De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comp.* **2005**, 1, 1029-1037.
- ⁴⁰ Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, New York, **1995**.
- ⁴¹ Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, 103, 13765-13770.
- ⁴² Hare, P. M.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 18641-18650.
- ⁴³ Callis, P. R. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, 19, 551-554.
- ⁴⁴ Wilson, R. W.; Callis, P. R. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80, 2280-2288.
- ⁴⁵ Olaso-González, G.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 24734-24739.
- ⁴⁶ Crespo-Hernández, C. E.; De La Harpe, K.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 10844-10845.
- ⁴⁷ Takaya, T.; Su, C.; De La Harpe, K.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 10285-10290.
- ⁴⁸ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *Photostability and Photoreactivity in Biomolecules: Quantum Chemistry of Nucleic Acid Base Monomers and Dimers*. In: *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*, Shukla, M. K.; Leszczynski, J., Eds., Springer, The Netherlands, **2008**, pp. 435-472.

- ⁴⁹ Wang, Y.; Haze, O.; Dinnocenzo, J. P.; Farid, S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6970-6981.
- ⁵⁰ Santoro, F.; Barone, V.; Improta, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104, 9931-9936.
- ⁵¹ Tozer, D. J.; Amos, R. D.; Handy, N. C.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L. *Mol. Phys.* **1999**, 97, 859-868.
- ⁵² Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 12697.
- ⁵³ Drew, A.; Weisman, J. L.; Head-Gordon, M. *J. Chem. Phys.* **2003**, 119, 2943.
- ⁵⁴ Lange, A.; Herbert, J. M. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, 3, 1680-1690.
- ⁵⁵ Lange, A. W.; Rohrdanz, M. A.; Herbert, J. M. *J. Phys. Chem. B*, **2008**, 112, 6304-6308.
- ⁵⁶ Cossi, M.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 4708-4717.
- ⁵⁷ Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 2999-3094.
- ⁵⁸ Takaya, T.; Su, C.; De La Harpe, K.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 10285-10290.
- ⁵⁹ Malmqvist, P.-Å. *Int. J. Quantum Chem.* **1986**, 30, 479-494.
- ⁶⁰ Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 155, 189-194.
- ⁶¹ Serrano-Andrés, L.; Fülcher, M. P.; Karlström, G. *Int. J. Quantum Chem.*, **1997**, 65, 167-181.
- ⁶² Ritze, H. -H.; Hobza, P.; Nachtigallova, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2007**, 9, 1672-1675.
- ⁶³ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6559-6571.
- ⁶⁴ Fülcher, M. P.; Serrano-Andrés, L.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6168-6176.
- ⁶⁵ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 8691-8696.
- ⁶⁶ Lührs, D.C.; Viallon, J.; Fischer, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, 1827-1831.
- ⁶⁷ Fülcher, M. P.; Serrano-Andrés, L.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 6168-6176.

- ⁶⁸ Plützer, C.; Nir, E.; de Vries, M. S.; Kleinermanns, K. *Phys. Chem. Chem Phys.* **2001**, *3*, 5466-5469.
- ⁶⁹ Kim, N. J.; Jeong, G.; Kim, Y. S.; Park, Y. D. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 10051-10055.
- ⁷⁰ Nir, E.; Plützer, C.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *Eur. Phys. J. D.* **2002**, *20*, 317-329.
- ⁷¹ Kim, N. J.; Kang, H.; Park, Y. D.; Kim, S. K. *Phys. Chem. Chem Phys.* **2004**, *6*, 2802-2805.
- ⁷² González-Ramírez, I.; Climent, T.; Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Pure & App. Chem.* **2008**. In press.
- ⁷³ Roca-Sanjuán, D.; Rubio, M.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 084302.
- ⁷⁴ Roca-Sanjuán, D.; Rubio, M.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 095104.
- ⁷⁵ Olaso-González, G.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 24734-24739.
- ⁷⁶ Serrano-Pérez, J. J.; González-Ramírez, I.; Coto, P. B.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*, 14096-14098.
- ⁷⁷ Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495-2501.
- ⁷⁸ Crespo-Hernández, C. E.; De La Harpe, K.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10844-10845.
- ⁷⁹ Rubio, M.; Roca-Sanjuán, D.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 10234-10235.
- ⁸⁰ Middleton, C. T.; De La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernández, C.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217-239.



*“Lo que no te mata
te hace más fuerte”*

Friedrich Nietzsche

**6. TRANSFERENCIA DE
CARGA Y ENERGÍA EN
SISTEMAS BIOLÓGICOS:
BIO-EXCÍMEROS COMO
PRECURSORES DE LA CT**

6 TRANSFERENCIA DE CARGA Y ENERGÍA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS: BIO- EXCÍMEROS COMO PRECURSORES DE LA CT

La presencia de excímeros es más frecuente de lo que cabría esperar, y se pueden encontrar en varios complejos de relevancia biológica. En este capítulo, nos vamos a centrar en aquellos bioexcímeros que tienen un papel crucial en diferentes aspectos de la actividad biológica, como es la transferencia de carga. En el capítulo anterior ya se ha establecido la existencia y la naturaleza de los bioexcímeros a través del análisis de sus energías de enlace en diferentes estados de los homodímeros neutros de citosina y de adenina. Ahora, vamos a determinar como los bioexcímeros pueden mediar en el proceso de transferencia de carga de la fotosíntesis o del DNA y, para ello, se estudia la transferencia de carga entre la feofitina *a* y la parabenzoquinona, que como se explicó en el capítulo 1, es la primera reacción de transferencia de carga que tiene lugar en el fotosistema II tras el paso fotoquímico primario. En este estudio se hace especial hincapié en el papel que juega la orientación relativa entre ambas moléculas para que el sistema alcance más fácilmente el requisito indispensable de la degeneración entre las superficies de energía, y a través de la intersección cónica se produzca la transferencia de carga. Sin embargo, para que una transferencia de carga se produzca de un modo efectivo, no sólo es necesaria la existencia de una intersección cónica entre los estados implicados, sino que además es necesario que exista un acoplamiento entre los sistemas. Con la finalidad de validar un

modelo para la evaluación del acoplamiento entre sistemas, se lleva a cabo el estudio de la transferencia de energía triplete-triplete en varios sistemas de pequeño tamaño molecular.

El mecanismo a través del cual tiene lugar la transferencia de carga y la transferencia de energía, a distancias relativamente cortas y/o en los casos de transferencia de energía triplete-triplete, debe ser idéntico. En el fondo se tratan de procesos similares, la única diferencia entre ellos es que en el caso de la transferencia de carga, tras la reubicación electrónica, hay un cambio neto en la carga de los fragmentos de la supermolécula considerada y en la transferencia de energía no. (Ver más acerca de esta discusión en el capítulo 4).

Una vez analizado estos dos factores, se pasa a estudiar la transferencia de carga en el DNA, evaluando el papel que tanto la degeneración de las superficies de energía potencial como el acoplamiento desempeñan en una eficiente transferencia.

6.1. TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA ULTRARRÁPIDA EN LA FOTOSÍNTESIS: INTERACCIÓN ENTRE EL ANIÓN DE FEOFITINA A Y LA PLASTOQUINONA MEDIADA A TRAVÉS DE UNA INTERSECCIÓN CÓNICA

Actualmente está disponible una gran cantidad de información sobre la fotosíntesis, gracias a los esfuerzos de numerosos investigadores a lo largo de los dos últimos siglos.^{1,2,3,4,5,6,7,8} Sin embargo, conseguir un detallado conocimiento del proceso entero de transformación de energía

solar en energía química en los centros de reacción (RCs, *reaction centres*) de bacterias, algas y plantas superiores, todavía representa un verdadero desafío tanto desde el punto de vista experimental como del teórico. Está claro que aprender sobre la fotosíntesis significa una mayor comprensión de la vida en la Tierra tal y como la conocemos. La fotosíntesis se ha convertido en un tema de estudio interdisciplinar. A parte de su interés intrínseco, la investigación en este campo es esencial en la química orgánica sintética, en la nanotecnología, y en la ciencia de materiales, puesto que se han diseñado con éxito biodispositivos inspirados en la fotosíntesis, y su utilización se está incrementando.⁹ A causa del extraordinario desarrollo de los métodos y las herramientas computacionales, la disciplina de la química cuántica puede ayudar a desentrañar, y de hecho lo hace,^{10,11,12,13,14,15,16,17,18} ciertos aspectos de los extraordinariamente complejos mecanismos involucrados en los RCs que pueden a penas ser deducidos a partir de los experimentos directos. El centro de reacción de la bacteria violeta es, probablemente, el sistema fotosintético más y mejor estudiado.^{1,8,15} Tras la excitación del par especial (SP, *special pair*) del dímero de moléculas de Bacterioclorofila (BChl) *a* (más frecuentemente encontrada que la BChl *b*), la separación de cargas ocurre en unos pocos picosegundos, dando paso al par especial oxidado (SP⁺) y una Bacteriofeofitina reducida (BPheo⁻). El electrón capturado se transfiere a continuación (en unos 200 ps) a una ubiquinona.⁴ En la fotosíntesis oxigénica tiene lugar una excitación simultánea de los pares de moléculas de clorofila *a*, que se conoce con el nombre de P680 en el Fotosistema II (PSII) y P700 en el Fotosistema I (PSI), produciendo un P680 oxidado (P680⁺) y una Pheo reducida (Pheo⁻). La Pheo es una molécula de feofitina. Se puede visualizar como

una unidad de clorofila con el ión de magnesio central reemplazado por dos átomos de hidrógeno (ver Figura 6.1). La Pheo es, de hecho, el primer aceptor electrónico de PSII. El electrón extra de la Pheo⁻ se transfiere a continuación rápidamente a una molécula de plastoquinona, considerada como el primer aceptor electrónico estable de PSII. Por consiguiente, tanto bacterias como plantas siguen un mismo esquema. En primer lugar, una separación de cargas fotoinducida en el RCs. El electrón se localiza en una molécula de tipo feofitina, reduciéndola, en el régimen de picosegundos. Posteriormente, un sistema de tipo quinoideo es capaz de ganar ese electrón. ¿Cuál es el mecanismo que subyace en esta transferencia electrónica (ET, *Electronic Transfer*)? Contestar a esta cuestión ha sido la principal motivación para llevar a cabo el presente trabajo. Comprender el mecanismo involucrado en las reacciones de ET es tanto desafiante como fascinante.¹⁹ Hoy en día constituye una importante área de investigación en la química física. Se sabe que, frecuentemente, se dan procesos de ET en funciones biológicas en conexión con la transducción de energía que en última instancia conduce a señales bioquímicas. Dichos procesos normalmente se describen dentro del marco de los esquemas de *casi-equilibrium*, siendo la teoría de Marcus la más popular.²⁰ En fotosíntesis, las ETs tienen dos características específicas:

- Transcurren sin energía de activación, esto es, tienen lugar en conocida región invertida de la teoría de Marcus.
- Se producen muy rápidamente y en el mismo orden de magnitud en la escala de tiempo que en el que se da el movimiento vibracional (el régimen de los femto- o

picosegundos) y consecuentemente los aspectos del no equilibrio no pueden ser descartados.

En este sentido, las reacciones ultrarrápidas ET se pueden considerar transiciones no radiativas del supersistema, a causa de la ruptura de los modelos dinámicos de *cuasi-equilibrio*.^{17,19} La relación entre los diagramas de Marcus-Hush y la topología de las intersecciones cónicas para diferentes reorganizaciones de transferencias electrónicas intramoleculares ha sido discutida en detalle por Blancafort y colaboradores.²¹ Una gran cantidad de trabajo experimental y teórico en el que se han estudiado varios relevantes cromóforos, incluyendo los involucrados en las reacciones de transferencia electrónica, apoya que la alta eficiencia de las transiciones no radiativas se debe a que están mediadas por CIs.^{22,23,24,25,26} En el punto de intersección cónica existe una verdadera degeneración electrónica que se pierde en al menos dos direcciones que son función de las coordenadas nucleares. Como se comentó en el capítulo 4, la denominación intersección cónica proviene del hecho de que las hipersuperficies en el punto CI tienen la forma de un doble cono cuando la energía del estado superior e inferior se representa frente a esas coordenadas privilegiadas. Un infinito número de puntos CI forman un camino de cruce o hiperlínea entre dos estados de la misma multiplicidad. Para describir la dinámica de la reacción fotoquímica, es esencial la completa caracterización de la hiperlínea. No obstante, normalmente en la práctica, se espera que la transición de un estado a otro tenga lugar principalmente alrededor de la región del punto más bajo de la hiperlínea, esto es, en la CI más baja.²² Por tanto, la mayor parte del trabajo teórico está enfocado en la caracterización del punto de cruce de menor energía (MECP).²⁷ En realidad el cruce más

importante es aquél más accesible para el sistema. Sin embargo, para un sistema de tamaño molecular grande, como el aquí considerado, el objetivo realista es encontrar la región de coordenadas donde el MECP pudiera ser caracterizado. Otros ejemplos paradigmáticos de procesos controlados por la presencia de CIs, que involucran las respectivas hipersuperficies del estado fundamental y del primer estado excitado, los encontramos en la fotoestabilidad de las bases del DNA^{28,29,30,31} y en el paso principal de la transducción visual en la base de Schiff protonada de retinal.³² Existe también un estudio computacional que apoya la ET fotoiniciada ultrarrápida de largo-rango en complejos del ciclofanopuente zincporfirinaquinona, que es facilitada vía una CI.^{16,17} El presente trabajo representa, sin embargo, la primera investigación a alto nivel *ab initio* de la ET intermolecular que involucra especies neutras/reducidas sobre modelos realistas relacionados con los RCs fotosintéticos. Con este propósito, y para hacer computacionalmente asequible, el estudio ha sido centrado en la siguiente reacción:



Donde FBC/FBC⁻ representa la forma neutra/reducida de la base libre de clorina y Q/Q⁻ la molécula de benzoquinona y el anión radical de *p*-benzosemiquinona, respectivamente. La clara relación entre el FBC con Pheo (o BPheo) y Q con la quinona fotosintética queda patente en la Figura 6.1. Por tanto, no es sorprendente que el FBC y la Pheo tengan un espectro óptico similar.¹⁰ Los sustituyentes en la Pheo son probablemente usados como ancla del cromóforo y se espera que jueguen un papel secundario en la eficiencia del proceso ET. El sistema

FBC se prefiere respecto a la Pheo debido a que así el cromóforo tiene mayor simetría molecular, lo cual representa ventajas computacionales sin detrimento de las conclusiones alcanzadas.

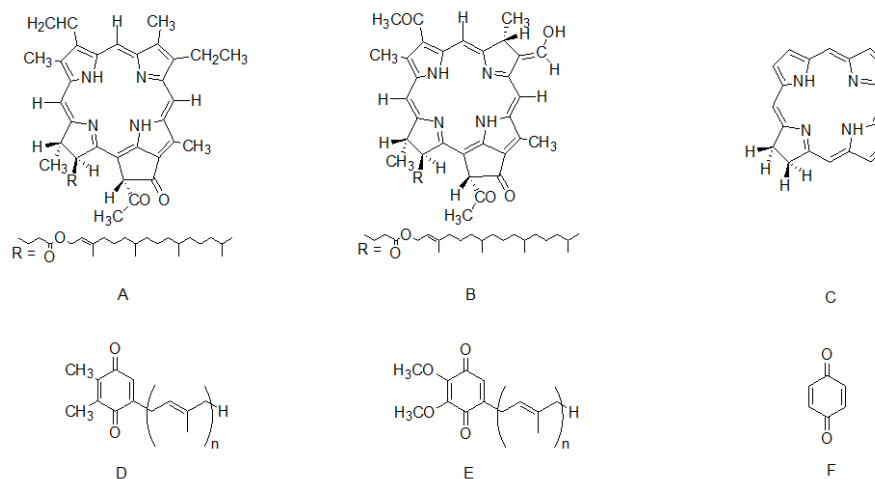


Figura 6.1. Estructuras de la A) Feofitina *a*, B) Bacteriofeofitina *a*, C) Clorina, D) Plastoquinona, E) Ubiquinona, F) *p*-benzoquinona.

Para describir correctamente el acoplamiento electrónico entre FBC y Q, se debe incluir de forma extensa la correlación electrónica.^{33,34,35} Los sistemas aniónicos son más difíciles de tratar teóricamente que las moléculas neutras.³⁶ Como se ha demostrado anteriormente para diferentes moléculas, el protocolo CASPT2//CASSCF es capaz de recuperar la correlación electrónica dinámica, conduciendo a electroafinidades precisas.^{35,37,38} El cálculo del sistema [FBC/Q]⁻ a nivel CASPT2 empleando un conjunto de base extenso es obligatorio para alcanzar resultados concluyentes. Sin duda, cada cálculo ha constituido una formidable tarea, requiriendo un considerable poder humano y recursos de software/hardware. Los resultados que se recogen en este

estudio sirven para analizar las condiciones globales y las orientaciones relativas del donador-aceptor con objeto de posibilitar una eficiente ET. Además, es de esperar que los mismos principios controlarán la ET en materiales análogos, lo cual serviría de guía para su futuro desarrollo en ciencia de materiales.

Los estados excitados de menor energía del sistema $[FBC/Q]^-$, así como los de las correspondientes unidades aisladas, han sido estudiados usando el método CASPT2.³⁹ El éxito de la aplicación de la aproximación CASPT2 en espectroscopia computacional está bien establecido.^{40,41,42} Se utilizan las funciones de onda CASSCF como funciones de orden cero, incluyendo en el procedimiento promedio (*state-average*) las raíces de interés. Para minimizar la influencia de los estados intrusos débilmente interaccionantes a nivel de segundo orden, se empleó de nuevo la llamada técnica del *level shift* imaginario,⁴³ para la que se seleccionó un valor de 0.2 au. Para poder calcular la fuerza de oscilador se utilizó el método de interacción de estados CASSCF (CASSI),^{44,45} donde la diferencia de energía que se usó es la obtenida de los cálculos CASPT2. La geometría del estado fundamental de la FBC se optimizó a nivel B3PW91/6-31G*, ya que había sido anteriormente empleada para moléculas de estructura similar.⁴⁶ La optimización de geometría se realizó restringiendo la geometría a la de los grupos puntuales C_{2v} y C_s . Los resultados obtenidos están en sintonía con resultados previos obtenidos con igual nivel de teoría y con la correspondiente estructura optimizada a nivel MP2.⁴⁷ En base a la experiencia previa en la *p*-benzoquinona,³⁴ la geometría del estado fundamental del sistema (de simetría D_{2h}) se optimizó a nivel π -CASSCF incluyendo en el espacio activo los orbitales de valencia π , esto es, un total de ocho electrones

distribuidos sobre ocho orbitales moleculares. El conjunto de base utilizado fue de tipo ANO-S con el esquema de contracción: C,O[3s2p1d]/H[2s].⁴⁸ Para mayor información sobre los parámetros geométricos ver la información complementaria de la referencia 49. Los cálculos se llevaron a cabo con las herramientas disponibles en los paquetes de programas MOLCAS-6⁵⁰ y Gaussian98.⁵¹

- Cálculos de calibrado: Electroafinidades

La electroafinidad vertical (VEA) de la FBC se calcula usando los métodos CASSCF y CASPT2. Se analiza cuidadosamente la influencia en los resultados del aumento de la flexibilidad de los conjuntos de base. El espacio activo comprende cuatro orbitales moleculares, los cuales corresponden al modelo de Gouterman.^{52,53,54} De acuerdo con esto se usan cuatro y cinco electrones como espacio activo para la especie neutra y el anión respectivamente. Como se puede ver en la Tabla 6.1, la VEA calculada depende tanto del nivel de cálculo como del tipo de base empleada. Sólo con grandes conjuntos de base de tipo ANO, las VEA se convierten en positivas a nivel CASSCF. En otras palabras, como reflejan los valores negativos (resultados 6-31G y 6-31G*), el anión FBC no quedaría estabilizado a nivel CASSCF respecto al sistema neutro. Cuando la correlación electrónica dinámica se incluye utilizando el método CASPT2, se obtienen VEA positivos con los tres conjuntos de base empleados, aumentando desde 0.13 a 1.05 eV según el tamaño de la base. Por otra parte, la diferencia entre los resultados CASPT2 y CASSCF calculados con el conjunto de base ANO-S es de 0.8 eV, lo cual es completamente debido a la inclusión de la correlación dinámica a

través de la metodología CASPT2. Así pues, nuestra mejor estimación para la VEA del FBC es 1.05 eV. Debido a la naturaleza monoconfiguracional de las funciones de onda CASSCF tanto del sistema neutro como del anión radical, y teniendo en consideración la flexibilidad inherente de la contracción de tipo ANO empleada, el resultado puede ser considerado, en la práctica, como convergido (± 0.1 eV) con respecto a mejoras en el aumento del espacio activo o del conjunto de base. Era de esperar que la VEA del FBC tuviese un valor positivo bien definido en vista del importante papel que esta molécula tiene en procesos biológicos y su conocido potencial redox.¹⁰ No obstante, hasta donde sabemos, no hay datos experimentales para comparar. En cualquier caso, la VEA calculada para FBC (1.05 eV) es comparable con el valor obtenido a nivel IP-EOM-CC para la base libre de porfirina (1.07 eV)⁵⁵ empleando un conjunto de base de calidad similar. También se puede comentar la relevante contribución que la correlación electrónica dinámica (resultados CASSCF vs CASPT2) tiene en las EA calculadas para la *p*-benzoquinona.³⁵ Empleando el conjunto de base ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s], la VEA para la *p*-benzoquinona se calcula como 1.63 eV a nivel π -CASPT2, lo cual coincide con resultados anteriores.^{34,35} Cálculos previos realizados al mismo nivel, pero usando un conjunto de base más grande (concretamente el ANO-L C,O[4s3p1d]/H[2s1p] + 1s1p1d) dan un valor para la energía de 1.64 eV. Por tanto, al menos para los estados más bajos en energía, la base ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s] es suficientemente flexible para tratar la *p*-benzoquinona en [FBC/Q]⁻. Así pues, de acuerdo con la naturaleza monoconfiguracional de los estados fundamentales de la molécula neutra y del anión radical de la *p*-semibenzoquinona, la VEA calculada a

nivel capa abierta MP2 utilizando el conjunto de base ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s] es también de calidad equivalente, sólo 0.14 eV por encima del resultado π -CASPT2, dando respaldo al mínimo espacio activo requerido para el tratamiento del sistema [FBC/Q]⁻. Por tanto, se espera que el conjunto de base ANO-S con la contracción C,N[3s2p1d]/H[2s] y el espacio activo de cinco orbitales moleculares será capaz de describir con precisión la ET involucrada en [FBC/Q]⁻.

Tabla 6.1. Electroafinidades verticales (VEA) calculadas para la base libre de Clorina (Free Base Chlorin, FBC) empleando distintos conjuntos de base monoeléctricos^a

Conjunto de base	CASSCF (eV)	CASPT2 (eV)
6-31G	-0.13	0.13
6-31G*	-0.17	0.42
ANO-S ^b C,N[3s2p1d]/H[2s]	0.25	1.05

^aEl espacio activo comprende cuatro orbitales moleculares (modelo de Gouterman) con cuatro (cinco) electrones activos para la molécula neutra (anión). ^bConjunto de primitivas C,N (10s6p3d)/H(7s).⁴⁸

- **Transferencia Electrónica entre el radical aniónico FBC y la quinona**

Las energías de las curvas de potencial (PECs) para los dos diferentes estados de oxidación del sistema [FBC/Q]⁻ a lo largo de la distancia intermolecular R, han sido construidas para tres distintas disposiciones paralelas manteniendo los subsistemas en sus respectivas geometrías de equilibrio en el estado fundamental de equilibrio. Como se muestra en la Figura 6.2, las orientaciones consideradas están

definidas por el ángulo θ formado entre los ejes de simetría binarios C_2 de la FBC (perpendicular al eje que contiene los átomos de hidrógeno internos pirrólicos) y el eje que pasa a través de los átomos de oxígeno de la molécula de Q. Los resultados obtenidos a nivel CASPT2 aparecen en la Figura 6.2. En todos los casos se emplea el conjunto de base ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s]. En el [FBC/Q]⁻, tal y como se había derivado de los cálculos de calibrado de la FBC y Q, el espacio activo para la función de onda de referencia CASSCF comprende cinco MOs (cuatro para la FBC y uno para la Q). Para cada distancia intermolecular que aparece en las figuras, el cálculo CASSCF de las tres raíces más bajas se lleva a cabo para el sistema global a $\theta = 0^\circ$ (simetría C_s) y $\theta = 45^\circ$ (simetría C_1), mientras que el cálculo de dos raíces para cada simetría se calculan para la orientación C_s del $\theta = 90^\circ$. Puesto que la tercera raíz no es relevante para el proceso ET aquí considerado no será discutida. Los resultados CASSCF aparecen en la Información Complementaria de la referencia 49. Nuestro estudio comienza una vez que la separación de cargas fotoinducida ha ocurrido en los centros fotosintéticos RCs y las especies Pheo⁻ (o BPheo⁻) ya se han producido. Por tanto, uno debería situarse a la parte derecha de las PECs de la Figura 6.2. Por supuesto, a una separación infinita (aquí calculada como dos fragmentos independientes) los tres límites asintóticos correspondientes a las tres distintas orientaciones, se convierte en equivalente e igual a (FBC⁻ + Q), la cual está sobre 0.7 eV sobre el límite más bajo (FBC + Q]. La diferencia de energía es precisamente la diferencia de las VEAs calculadas para Q y FBC. Es importante mencionar que los reactantes de interés (FBC⁻ + Q),

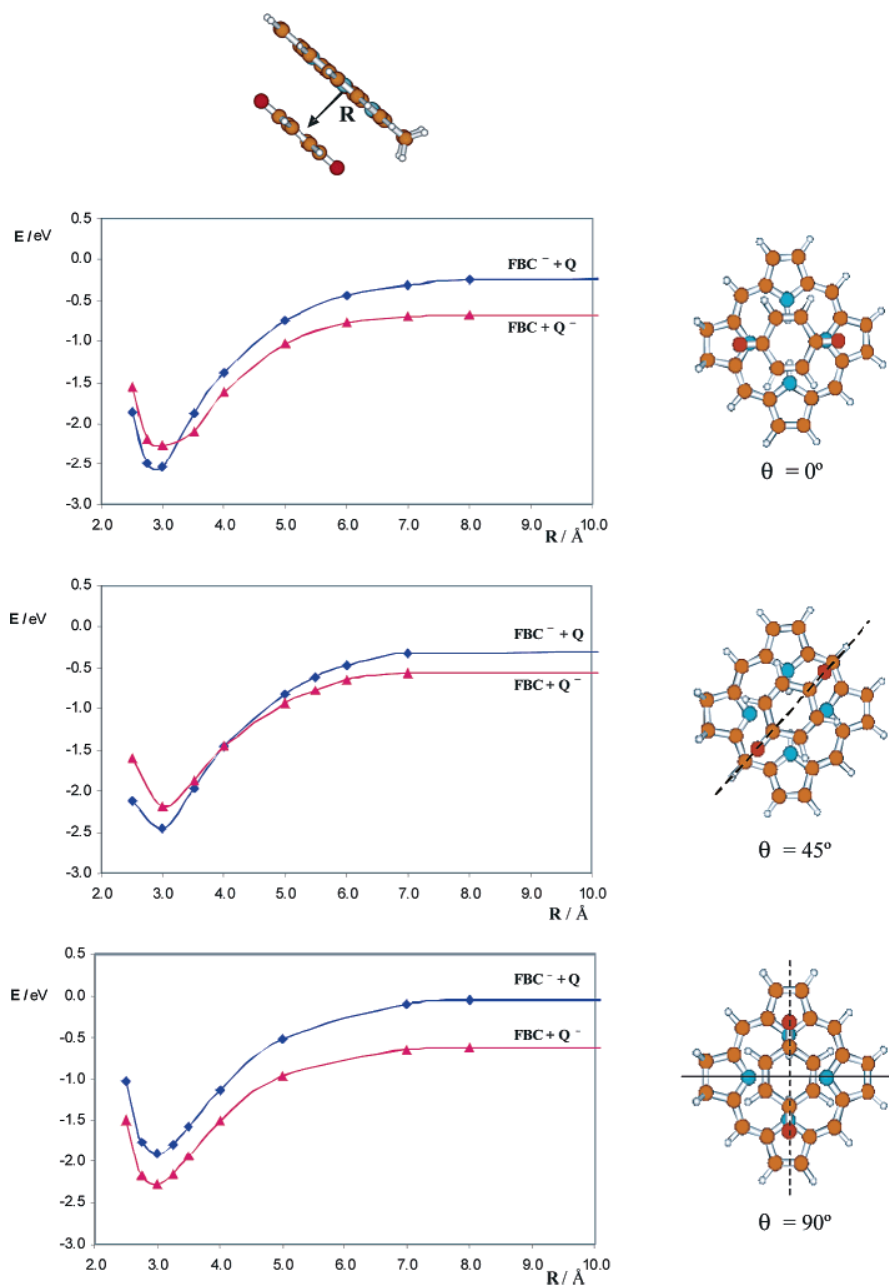


Figura 6.2. Curvas de energía potencial para el sistema $[FBC/Q]^-$ construido respecto a la distancia intermolecular R . Las tres diferentes orientaciones quedan definidas por el ángulo θ .

corresponden a largas distancias el estado más bajo excitado del sistema $[FBC/Q]^-$. Mientras que la molécula de Q tiene una VEA mayor que la del FBC, el sistema no interaccionante FBC mas Q^- se convierte en el estado fundamental a distancias R grandes. Como se puede observar en la Figura 6.2, la separación de energía entre los dos estados a $R = 10 \text{ \AA}$ es más grande para la orientación $\theta = 90^\circ$ y más pequeña a $\theta = 45^\circ$, estando entre ellos la situación de $\theta = 0^\circ$. En otras palabras, a $R = 10 \text{ \AA}$ y $\theta = 90^\circ$, la diferencia de energía entre los dos estados se acerca asintóticamente a su límite en el infinito, lo que revela que la interacción entre FBC^- y Q no es tan fuerte como si se compara con otras disposiciones. Puesto que las funciones de onda CASSCF se describen básicamente con una única configuración con un electrón extra localizado en un orbital natural de tipo LUMO, las estructuras que faciliten el solapamiento entre los dos LUMOs conduce a interacciones más pronunciadas y la aparición de un cruce entre sistemas. De acuerdo con la topología de los LUMOs de la FBC y la Q (ver Figura 6.3), el solapamiento entre éstos disminuye a $\theta = 90^\circ$ (ver Figura 6.2, inferior) Una situación similar puede ser esperadas para otros intermediarios perpendiculares o de cualquier otro tipo, por tanto no serán tenidas en consideración. Por el contrario, las PECs intersectan en las otras dos orientaciones. La interacción más efectiva ocurre a $\theta = 45^\circ$, lo cual insinúa un mayor solapamiento de los respectivos LUMOs. Por esta razón, cuando las dos moléculas de aproximan al cruce entre las dos curvas aparece antes a $\theta = 45^\circ$, sobre 4 \AA , con respecto a $\theta = 0^\circ$, que lo hace entorno a 3.3 \AA , reflejando que en la última el proceso ET es menos eficiente que para $\theta = 45^\circ$, asociado éste con una relativamente mayor constante de velocidad.¹⁹

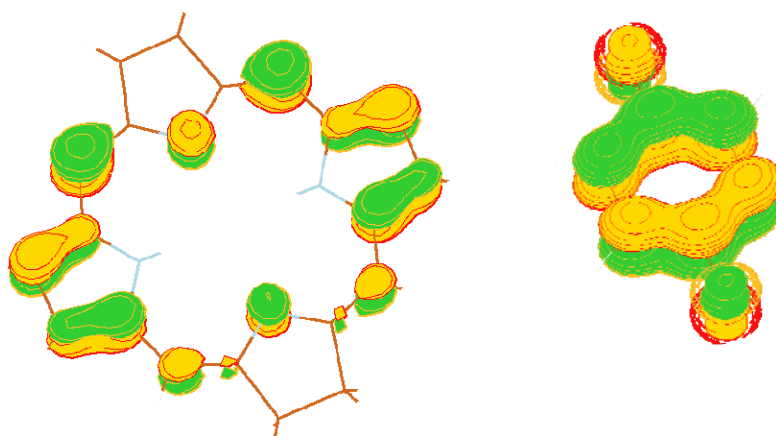


Figura 6.3. LUMOs de la FBC (izquierda) y Q (derecha)

El punto real de cruce podría corresponder a una CI en la que su geometría, probablemente, sufrirá en el esqueleto de FBC una distorsión fuera del plano molecular. Esta sugerencia está inspirada en el documentado hecho de que los estados excitados singlete planos están asociados a tiempos de vida media más altos en de las porfirinas derivadas⁸ y en las nucleobases del DNA.^{28,29,30,31} Estos tiempos de vida son más cortos (desde nanosegundos hasta picosegundos) en cromóforos distorsionados fuera del plano molecular, siendo dichas estructuras encontradas en varios caminos diferentes de decaimiento y embudos, conectando los estados excitados con el fundamental.^{30,31,56} La corroboración de esta hipótesis representa en sí misma un formidable objeto de estudio que debería llevarse a cabo en el futuro.

Las curvas en la Figura 6.2 no deben ser consideradas como representaciones del mecanismo de la ET ultrarrápida en el RC, pero sí demuestra que las CI están involucradas en el proceso de ET, haciéndolo

posible para ciertas orientaciones donador-aceptor. A $\theta = 45^\circ$ los mínimos $(\text{FBC}^- + \text{Q})_{\text{min}}$ y $(\text{FBC} + \text{Q}^-)_{\text{min}}$ se encuentran sobre $R = 3 \text{ \AA}$. El último está localizado verticalmente unos 0.3 eV sobre el primero, con una fuerza de oscilador relativa calculada de 0.03. Es importante mencionar que el error de superposición de base (BSSE) calculado usando el procedimiento counterpoise⁵⁷ mostró no afectar a las energías relativas verticales, debido a que la magnitud era la misma para los dos estados. A distancias moleculares cortas, el sistema $\text{FBC}^- + \text{Q}$ se convierte en el estado fundamental, y conecta adiabáticamente con $\text{FBC} + \text{Q}^-$ en el infinito. Dependiendo de la topología real de la CI, se podrían poblar ambos mínimos. Idealmente cada topología debería favorecer la población del estado de transferencia de carga ($\text{FBC} + \text{Q}^-$). Probablemente ocurrirán un número de cruces y recruces en la región de la CI, que conducirán a una completa ET. Con el consiguiente incremento de la distancia, se obtienen finalmente los productos de la reacción de ET, la FBC neutra y la quinona reducida Q^- . Ésta transferirá rápidamente el electrón a una quinona secundaria y la Pheo (FBC en nuestro caso) estará en condiciones de participar en un nuevo proceso de carga fotoinducida en el RCs.

- **El proceso de Transferencia Electrónica Intermolecular: un baile de tres movimientos**

Gracias a esta investigación, se pudo delinear el mecanismo de transferencia electrónica desde una molécula de tipo feofitina *a* a una molécula quinoidea, haciendo especial énfasis en el relevante papel que tiene el tipo de acercamiento de ambas. A causa de las inherentes

dificultades en la determinación teórica de las electroafinidades, fue necesaria la aplicación de metodologías a alto nivel *ab initio*, CASSCF y CASPT2. Era la primera vez que una investigación de esta envergadura se emprendía. Por tanto, los resultados obtenidos se pueden tomar como referencia para comparar con aproximaciones teóricas menos precisas que podrían aplicarse en modelos de mayor tamaño molecular. La principal conclusión que se puede extraer del trabajo es que la ET intermolecular entre un donador reducido (cargado) y un aceptor se puede formular como una danza de tres pasos:

- Primero, ambos sistemas se acercan lo suficiente, y en la orientación correcta, para permitir el solapamiento entre el LUMO (ocupado por un electrón) del donador y el LUMO del aceptor.
- Segundo, se dan una serie de cruces entre sistemas a través de múltiples intersecciones cónicas que permiten la transferencia de carga entre ambas moléculas.
- Tercero, las dos unidades se separan conduciendo a los productos, el donador neutro y el aceptor reducido.

Existe una gran cantidad de trabajo que involucra la síntesis de materiales biomiméticos para la fotosíntesis artificial. En estos trabajos se suelen emplear sistemas unidos covalentemente. De acuerdo con los presentes resultados los materiales apilados de forma no covalente podrían ser una opción alternativa que operaría eficientemente. No es sorprendente, puesto que la naturaleza así lo hace en numerosos procesos.

6.2. MODELIZANDO LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA TRIPLETE-TRIPLETE A TRAVÉS DE SU ESTUDIO EN DÍMEROS DE MOLÉCULAS DE PEQUEÑO TAMAÑO

Se cree que la interacción entre el oxígeno molecular y las moléculas orgánicas tiene lugar a través del llamado mecanismo de transferencia de energía de excitación (EET, *excitation energy transfer*) entre la molécula orgánica (furocumarinas, clorinas, etc...) en un excitado estado triplete de larga vida media, comportándose como un fotosensibilizador, y el oxígeno molecular, inicialmente en su estado fundamental triplete, $^3\Sigma_g^-$. El oxígeno, presente en el entorno celular, está preparado para transformarse en el singlete 1O_2 ($^1\Delta_g$), que es una fuerte especie electrofílica que reacciona con diferentes compuestos,⁵⁸ incluyendo algunos componentes de la membrana celular, con lo que causa la muerte de la célula por apoptosis.⁵⁹ El proceso EET está provocado por el acoplamiento electrónico entre una molécula en un estado excitado, el donador (D^*), y una segunda especie, que actúa como aceptor (A) o amortiguador en un complejo de colisión.^{60,61,62,63,64,65,66,67,68} Este mecanismo depende fuertemente de la distancia entre los fragmentos. Si existe una gran separación entre las partes (20 o 30 Å o incluso más) el acoplamiento electrónico se produce a través de la interacción de Coulomb entre las transiciones electrónicas que, dentro de la aproximación de dipolo, se reduce al conocido acoplamiento dipolo-dipolo de Förster.⁶⁹ El proceso es, de hecho, una transferencia no radiativa de excitación que ocurre cuando el espectro de emisión del dador solapa con el espectro de absorción del espectro de A (aunque no tome parte en ella el intermediario fotón). El campo eléctrico alrededor

de D^* , se comporta como un campo generado por el oscilador clásico de dipolo, que causa la excitación de A.^{70,71,72,73,74} Cuando existen separaciones más grandes que la de Förster, la transferencia de energía por fluorescencia (*Fluorescence Resonance ET*), también llamada Mecanismo Trivial de EET (con la emisión de un fotón desde D^* y la seguida absorción del mismo por A) se convierte en el mecanismo más eficiente de ET.⁷⁵ A distancias más cortas, sin embargo, el llamado mecanismo de acoplamiento electrónico de Dexter es el que predomina, surgiendo de las integrales de intercambio que tienen en cuenta la indistinguibilidad de los electrones en las funciones de onda polieletrónicas. Este factor decrece considerablemente con la separación.⁷⁶ Suponemos la interacción como débil y se produce solapamiento entre las funciones de onda de D^* y A, se puede aplicar la Regla de Oro de Fermi para transiciones acopladas. Estos procesos han sido estudiados en profundidad en los últimos años, particularmente, el proceso de SS-EET,^{77,78,79,80,81} que implica un intercambio electrónico de electrones con el mismo espín pero distinta energía, esto es, el estado de espín de cada fragmento se conserva. Este estudio, sin embargo, se va a centrar en la transferencia de energía intermolecular triplete-triplete (TT-EET), que es un proceso en el que se intercambia tanto la energía como el espín entre un par de moléculas o fotosensibilizadores triplete-triplete. Este tipo de reacciones se suelen usar para poblar de modo eficiente el estado triplete de muchas moléculas orgánicas.^{82,83,84}

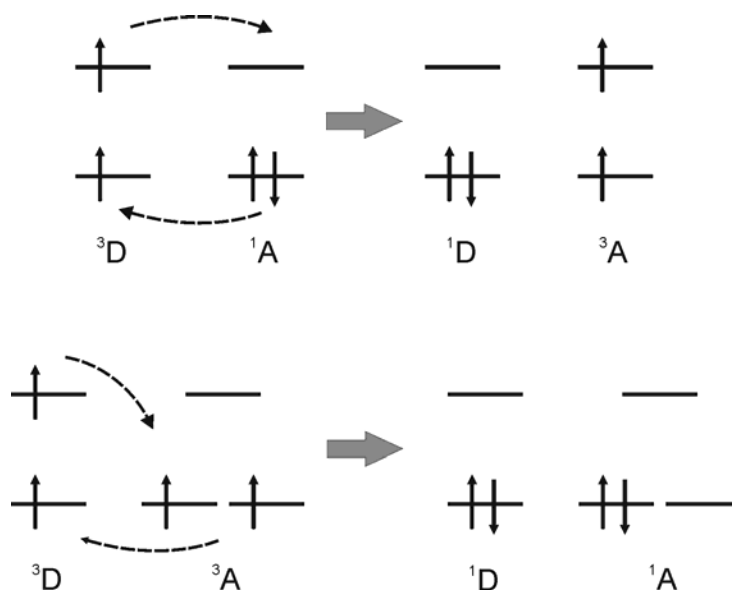


Figura 6.4. Ejemplos de TT-EET, que pueden ser visualizados como dos transferencias electrónicas simultáneas entre el donador (D) y el aceptor (A) con intercambio de espín y energía en cada fragmento.

El proceso TT-EET puede ser por tanto visualizado como dos transferencias electrónicas simultáneas con intercambio de espín entre los fragmentos interaccionantes⁸⁵ (ver Figura 6.4). Puesto que depende exclusivamente del mecanismo de intercambio electrónico, sólo tiene lugar para distancias cortas entre el donador y el aceptor ($< 10 \text{ \AA}$)^{69,75}. El mecanismo de Förster no contribuirá por dos motivos, primero porque a distancias cortas la aproximación de dipolo falla y segundo porque en la TT-EET se dan transiciones prohibidas de espín.⁸⁵ El acoplamiento electrónico no es el único factor que determina la eficiencia del proceso ET, también la condición de resonancia, esto es, la energía disponible en el donador debe ser al menos igual o superior que la requerida para poblar

el estado excitado del aceptor. Si este es el caso, el proceso estará controlado por difusión y será exotérmico. En una situación opuesta, esto es, si la energía del aceptor es menor que la del donador, el proceso necesita ser activado térmicamente y será endotérmico. Esto significa que existirá una barrera de energía cuya altura dependerá de la naturaleza del aceptor, o bien clásica (para sistemas rígidos) o no clásica (para sistemas flexibles, los cuales puedan encontrar una conformación eficiente, una TT-EET no vertical) con un correspondiente mayor o menor decaimiento en la velocidad del proceso.⁸⁶

Para analizar las velocidades de reacción para la transferencia electrónica en el fotosistema oxígeno molecular-molécula orgánica (M-O₂) se debe estimar de algún modo el acoplamiento electrónico para determinadas disposiciones de las moléculas. Encontrar la geometría que proporciona el mayor rendimiento y el proceso TT-EET más efectivo, no es algo trivial. En los sistemas controlados por difusión, en los que se forman complejos a distancias cortas no siempre es relevante este factor. Sin embargo, es importante estimar las velocidades de reacción y tiempos de vida media a diferentes distancias intermoleculares. Además, los potenciales de interacción M-O₂ son muy débiles y las superficies de potencial están generalmente caracterizadas por múltiples mínimos poco profundos. Por tanto, es necesario considerar diferentes orientaciones cuando se aproximan M y O₂ a través de una coordenada interfragmento, (en este caso la distancia R).⁸⁷ Con objeto de encontrar la orientación más favorable para una efectiva TT-EET se ha llevado a cabo un estudio en el que se han considerado tres sistemas moleculares como modelos, analizando como la orientación relativa de ambos fragmentos (donador y aceptor) puede

afectar el proceso ET. En particular, hemos estudiado el sistema formado por dos moléculas de etileno (Et-Et), por el catión metaniminio y el etileno (MetN⁺-Et), y finalmente, el etileno y el oxígeno molecular (Et-O₂). Se ha calculado el acoplamiento entre los estados involucrados en la TT-EET para las conformaciones que aparecen en la Figura 6.5, nombradas *cara a cara* (*face-to-face*, *FF*), usada en los tres casos, *lado a lado* (*side-by-side*, *SS*) usada para el Et-Et y el Et-O₂, y *perpendicular* (*PP*) usada sólo para el Et-O₂.

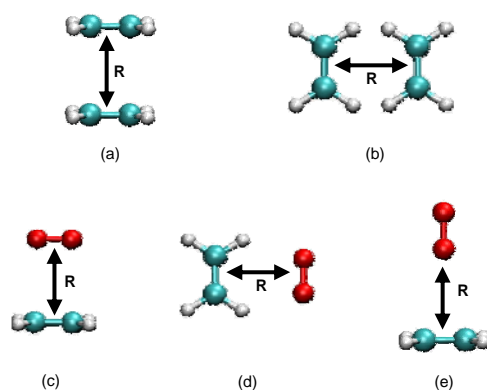


Figura 6.5. Disposiciones de las supermoléculas empleadas para la transferencia de energía triplete-triplete entre el Etileno-Etileno (Et-Et), Cation Metaniminio-Etileno (MetN⁺-Et), y Etileno-Oxígeno (Et-O₂): (a) Et-Et y MeN⁺-Et *cara a cara* (*face-to-face*, *FF*), (b) Et-Et *lado a lado* (*side-by-side*, *SS*), (c) Et-O₂ *FF*, (d) Et-O₂ *SS* y (e) Et-O₂ *perpendicular* (*PP*).

Se obtienen las energías a nivel CASPT2 para los cuatro estados singlete y los tres triplete más bajos en energía para el Et-Et, MetN⁺-Et, y Et-O₂, para cada conformación y a cada distancia intermolecular considerada. El espacio activo considerado para las supermoléculas Et-Et y el MetN⁺-Et comprende los orbitales y los electrones π , esto es, 4 electrones/4 orbitales. Respecto a la supermolécula Et-O₂, 14 electrones y 10 orbitales han sido empleados en el espacio activo (8 de ellos

corresponden a los orbitales de valencia de cada oxígeno y 2 son los orbitales π de cada etileno). La geometría para el oxígeno molecular en su estado fundamental triplete se toma del valor experimental⁸⁸ mientras que las moléculas de etileno y del catión metaniminio se optimizan a nivel CASSCF usando los orbitales y electrones π como espacio activo. Ambas estructuras moleculares se utilizan manteniéndolas inalteradas en las diferentes disposiciones (considerando el carácter rígido general de estos sistemas en los procesos de EET).⁸⁶ El conjunto de base monoeléctrico ANO-L contraído como C,O,N[4s3p2d1f]/H[2s1p] se emplea en los cálculos de los sistemas modelos Et-Et, MetN⁺-Et, Et-O₂.

En el régimen de acoplamiento débil, donde la interacción electrónica es más pequeña que la energía de reorganización vibracional, se puede estimar la velocidad para la transferencia de energía triplete-triplete (k_{TET}), y el correspondiente tiempo de vida media (τ_{TET}), entre el donador y el aceptor usando la regla de oro de Fermi:^{75,85}

$$k_{TET} = \frac{1}{\tau_{TET}} = \frac{4\pi^2}{h} \left| \langle \psi_i | \hat{H} | \psi_j \rangle \right|^2 \rho_E = \frac{4\pi^2}{h} (H')^2 \rho_E \quad (6.1)$$

La matriz de elementos del Hamiltoniano, H' , es la parte electrónica de la energía de transferencia (esto es, del acoplamiento electrónico) y ρ_E es la densidad de estados vibracionales en los estados inicial y final de su solapamiento espectral. La inversa de la velocidad es el tiempo de vida media de la transferencia energética. Para obtener las velocidades TT-EET para los sistemas Et-Et, Met-N⁺-Et y Et-O₂ se han tomado los siguientes valores para $\rho_E = 0.1 \text{ eV}^{-1}$ y $(4\pi^2/h) = 9.55 \cdot 10^{15} \text{ eV}^{-1}\text{s}^{-1}$. Este orden de magnitud para el valor de la densidad de estados se

ha usado previamente como buena estimación en sistemas de este tamaño.⁸⁵

El cálculo de los elementos de la matriz de acoplamiento electrónico H' constituye la parte crucial de la determinación de las velocidades de EET y de los tiempos de vida media. La extensión del acoplamiento controla el proceso de transferencia de energía, especialmente el paso desde un estado a otro, y se puede tomar como una medida de la eficiencia del proceso EET. Se han desarrollado diferentes procedimientos para estimar el acoplamiento EET^{89,90,91} basados en cálculos diabáticos localizados en el dímero, densidades de transición monoméricas o momentos de transición de dipolo, y la consideración del dímero como una supermolécula⁷⁵, mientras que la generalización de cada aproximación para determinar acoplamientos TET está también disponible.⁸⁵ A partir de todos estos procedimientos, se ha mostrado conveniente utilizar un método basado en la diferencia energética, aproximando el dímero como una supermolécula, en la que el valor del acoplamiento se obtiene como la mitad de la separación o la perturbación entre estados interaccionantes. Este método demostrado ser adecuado,^{75,85} aunque está claro que su precisión dependerá del método químico cuántico utilizado para representar los cálculos de la estructura electrónica. Considerando que nuestros resultados para la energía electrónica están realizados a nivel CASPT2, con una alta fiabilidad y precisión, este último procedimiento será el que se utilice. Se darán detalles más específicos cuando se describan los cálculos en los diferentes sistemas. Todos los cálculos se han llevado a cabo con el paquete de programas Molcas 6.0.

6.2.1. Transferencia de energía Triplete-Triplete Etileno-Etileno

Las curvas de energía potencial del estado fundamental y de los tres estados triplete de menor energía del sistema Et-Et, en dos disposiciones diferentes (ver Figura 6.4): *SS* y *FF*, a lo largo de la distancia intermolecular, están representados en la Figura 6.5. El acoplamiento electrónico que permite la transferencia de energía triplete-triplete entre los dos estados tripletes más bajos, se calcula como la mitad de la separación entre los estados protagonistas del proceso TT-EET (${}^3\text{Et} + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{Et} + {}^3\text{Et}$), que corresponden con los dos estados triplete de menor energía de la supermolécula, de acuerdo con el modelo de dos estados.⁸⁵ Para ambas orientaciones, a distancias intermoleculares largas estos estados están degenerados puesto que ambas moléculas de etileno no interactúan. Una vez la distancia intermolecular decrece, el comportamiento de la molécula es diferente para cada disposición. Mientras que en la orientación *FF*, en la que las dos moléculas están completamente apiladas, T_1 y T_2 no están degenerados para distancias mayores de 4.5 Å, apuntando hacia un acoplamiento entre estados, en la orientación *SS* ambos tripletes permanecen prácticamente degenerados hasta distancias próximas a 3 Å.

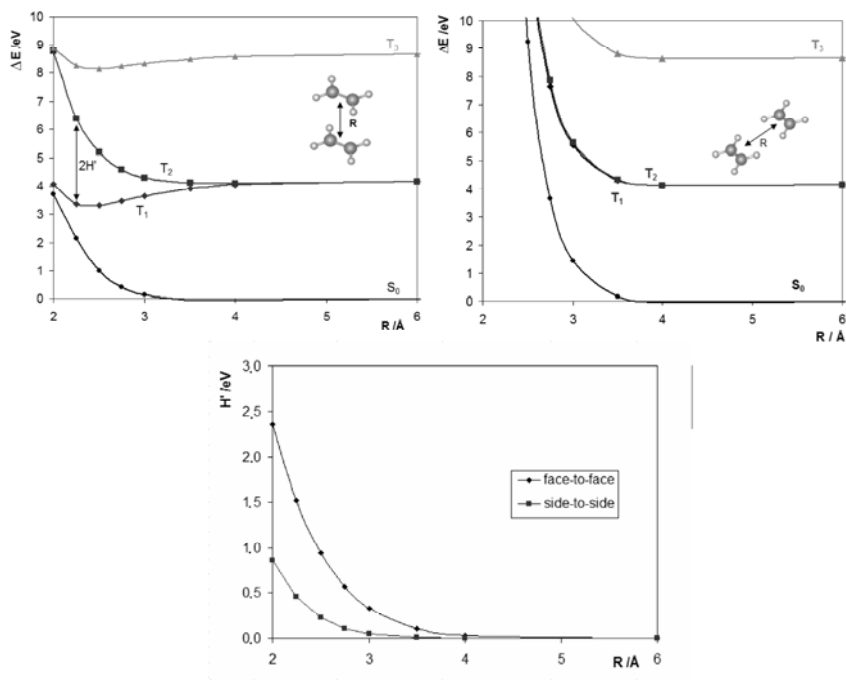


Figura 6.5. Curvas de energía potencial CASPT2 del estado fundamental y los tres estados triplete más bajos en energía de la supermolécula Et-Et en las orientaciones cara a cara (arriba a la izquierda) y lado a lado (arriba a la derecha). También se incluye la dependencia del acoplamiento de la TT-EET para el sistema Et-Et con la distancia entre los fragmentos (R) y la conformación.

Los valores para el acoplamiento (H'), calculados como la mitad del gap de energía entre los estados triplete más bajos a cada distancia intermolecular, las constantes de velocidad (k_{TET}), y los tiempos de vida media (τ_{TET}) para los procesos TT-EET están recogidos en la Tabla 6.2. Estos resultados comparten el mismo orden de magnitud con los encontrados en otros trabajos.⁸⁵ En estudios previos, se estableció que el acoplamiento TT-EET y la atenuación de las velocidades estaban principalmente determinados por el área relativa de contacto con

respecto al tamaño de los orbitales moleculares, con independencia del tamaño molecular, y que dependía fuertemente de la orientación.⁸⁵ En la conformación SS, con mucho menor solapamiento orbital entre los fragmentos, el acoplamiento TT-EET es aproximadamente un orden de magnitud menor que en la orientación complemente apilada FF, la cual puede ser considerada como la del solapamiento óptimo, y por lo tanto da paso a una mayor efectividad del acoplamiento TET para moléculas conjugadas.

Tabla 6.2. Acoplamientos (H'), constantes de velocidad (k_{TET}), y tiempos de vida media (τ_{TET}) de los procesos de transferencia de energía triplete-triplete (TT-EET) entre dos moléculas de etileno en las disposiciones cara a cara (FF) y lado a lado (SS).

$R / \text{Å}$	<i>cara a cara (FF)</i>			<i>lado a lado (SS)</i>		
	H' / eV	k_{TET} / s^{-1}	τ_{TET} / s	H' / eV	k_{TET} / s^{-1}	τ_{TET} / s
10.00	0	–	–	0	–	–
8.00	5.79×10^{-6}	3.20×10^4	3.12×10^{-5}	5.07×10^{-7}	2.46×10^2	4.07×10^{-3}
6.00	1.47×10^{-4}	2.06×10^7	4.84×10^{-8}	3.57×10^{-6}	1.22×10^4	8.21×10^{-5}
4.00	2.89×10^{-2}	8.00×10^{11}	1.25×10^{-12}	2.01×10^{-3}	3.85×10^9	2.60×10^{-10}
3.50	1.01×10^{-1}	9.67×10^{12}	1.03×10^{-13}	9.48×10^{-3}	8.58×10^{10}	1.17×10^{-11}
3.00	3.28×10^{-1}	1.02×10^{14}	9.76×10^{-15}	4.62×10^{-2}	2.04×10^{12}	4.90×10^{-13}
2.75	5.66×10^{-1}	3.06×10^{14}	3.27×10^{-15}	1.03×10^{-1}	1.01×10^{13}	9.88×10^{-14}
2.50	9.43×10^{-1}	8.49×10^{14}	1.18×10^{-15}	2.25×10^{-1}	4.82×10^{13}	2.07×10^{-14}
2.25	1.516	2.19×10^{15}	4.56×10^{-16}	4.61×10^{-1}	2.03×10^{14}	4.92×10^{-15}
2.00	2.357	5.31×10^{15}	1.88×10^{-16}	8.59×10^{-1}	7.04×10^{14}	1.42×10^{-15}

6.2.2. Transferencia de energía Triplete-Triplete entre el Cation Metaniminio-Etileno y el Etileno-O₂

Para analizar de modo completo la TT-EET del O₂ con moléculas orgánicas, tenemos que utilizar también modelos en los que estén involucrando unidades no simétricas. Los ejemplos seleccionados son transferencias de energía triplete-triplete relacionadas con:

- 1) Los procesos de desexcitación del estado triplete del cation de metaniminio (dador) cuando interactúa con un etileno (aceptor): ${}^3\text{MetN}^+ + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{MetN}^+ + {}^3\text{Et}$
- 2) El etileno en su estado triplete (actuando como donador) con el oxígeno molecular en su estado fundamental triplete (aceptor): ${}^3\text{Et} + {}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{Et} + {}^1\text{O}_2$

En el primer caso los fragmentos son isoelectrónicos con el sistema Et-Et y los dos estados triplete más bajos en energía están involucrados en la TT-EET. Sin embargo, la interacción es no simétrica y el estado triplete se calcula a 4.35 (Et) y 4.82 (MetN⁺) eV a una separación infinita, donde están localizados en cada una de las unidades. Respecto al segundo modelo, el análisis de la función de onda CASSCF indica que los estados participantes en el proceso TT-EET son los S₁ y S₃ de la supermolécula Et-O₂, que corresponden a la separación infinita a Et (T₁) + O₂ (³Σ_g⁻) y Et (S₀) + O₂ (¹Δ_g), respectivamente.

Al contrario de lo que ocurría en el caso previo (Et+Et), para sistemas asimétricos la condición de resonancia de orden cero no se satisface. Se pueden considerar dos posibilidades. La primera es suponer la validez de la aproximación de Condon, la cual desprecia la variación del

acoplamiento con respecto a las coordenadas moleculares excepto aquellas en las cuales se ve afectada la distancia de separación donor-aceptor.⁹² Una segunda alternativa es la de conseguir la condición de resonancia y estimar los acoplamientos EET a través de la inclusión de un campo eléctrico externo. En la práctica la fuerza del campo se varía para diferentes distancias intermoleculares variando la geometría del sistema con una coordenada seleccionada que conduzca a un decrecimiento del gap de energía entre los estados interaccionantes.^{85,93} Para procesos controlados por difusión en la región exotérmica, cuando se forma un complejo de colisión, y para aceptores rígidos como el oxígeno molecular,⁸⁶ no es de esperar que se produzcan distorsiones en las geometrías (a las distintas distancias inter-fragmento). En estos casos, como hemos visto en procesos similares,⁹⁴ la aproximación de Condon se comporta razonablemente bien sobre un largo rango de variaciones estructurales. Hemos decidido entonces, determinar el valor del acoplamiento obtenido (usando estructuras fijas donor-aceptor a diferentes distancias intermoleculares) como la perturbación de la energía de un estado electrónico causada por la dimerización.⁷⁵ Según esto, la aproximación al cálculo del acoplamiento electrónico usada para fragmentos simétricos (como en el caso del Et-Et), obtenida como la mitad de la separación entre los correspondientes estados, puede extenderse a sistemas no simétricos del mismo modo. La perturbación de los estados por la dimerización puede ser calculada con el esquema adiabático como la mitad de la diferencia de energía de separación entre los estados de los monómeros y la separación de los estados en la supermolécula a diferentes distancias entre fragmentos. El procedimiento puede ser considerado válido en el régimen de los

acoplamientos débiles, puesto que los estados interactuantes permanecen casi-diabáticos, esto es, la función de onda está claramente localizada en cada uno de los monómeros, como ocurre en todos los sistemas considerados aquí, al menos hasta que la distancia intermonomérica se hace extremadamente corta ($< 2.5 \text{ \AA}$). Esta aproximación se relaciona con aquella basada en esquemas diabáticos para el estudio de los procesos de transferencia electrónica.

Para comparar esta aproximación con estudios previos, calculamos la TT-EET entre los estados triplete de menor energía en el dímero catión metaniminio-etileno. La comparación de nuestros valores para el acoplamiento electrónico con aquellos obtenidos por You y colaboradores⁸⁵ usando la mitad de la separación entre los estados en una conformación con un mínimo de diferencia de energía (estimadas de la Figura 6 de la referencia 85) están recogidos en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Términos del acoplamiento (H') de la transferencia de energía triplete-triplete calculados para el proceso ${}^3\text{MetN}^{+1}\text{Et} \rightarrow {}^1\text{MetN}^{+3}\text{Et}$ a diferentes distancias intermonómero en la disposición cara a cara (FF).^a

$R / \text{\AA}$	H' / eV ^b	H' / eV ^c
5.0	6.0×10^{-4}	$\sim 5.0 \times 10^{-3}$
4.5	4.1×10^{-2}	$\sim 2.0 \times 10^{-2}$
4.0	1.6×10^{-1}	$\sim 8.0 \times 10^{-2}$
3.5	4.1×10^{-1}	$\sim 2.0 \times 10^{-1}$

^a MetN⁺ (catión metaniminio); Et (etileno).

^b Trabajo presente. Leer texto.

^c Estimado a partir de la Figura 6 de la Ref. 85. CIS/6-311+G(d).

Ambos procedimientos conducen a acoplamientos TT-EET que tienen, básicamente, el mismo orden de magnitud, aunque nuestra aproximación conduce a valores algo más grande o más pequeños a distancias más largas y más cortas respectivamente. Sin embargo, el acoplamiento obtenido previamente usaba como método cuántico el CIS, que tiende a mejorar considerablemente con la calidad del conjunto de base, y puede esperarse que sea mayor con un conjunto de base monoeléctrico superior como la de tipo ANO-L empleada aquí.

La aproximación de Condon puede, por tanto, ser considerada como razonablemente buena en estos sistemas y el modelo del gap de energía descrito, apropiado y usado en otros sistemas.

El siguiente proceso estudiado es la TT-EET entre el triplete excitado del etileno y el triplete del estado fundamental del oxígeno en las tres disposiciones descritas en las Figuras 6.4 y 6.6. En todos los casos, las energías de ambos estados (S_1 y S_2 como se ha comentado anteriormente) permanecen constantes para cualquier distancia intermolecular R mayor de 4 Å. Como era de esperar, es la orientación fuertemente solapada FF la que da una interacción más fuerte, como muestran los valores del acoplamiento de la Tabla 6.4. En general, la disposición apilada FF es la más favorable para que se produzca el proceso TT-EET, lo que concuerda con nuestro análisis previo, debido a que conduce a valores para la constante de velocidad desde uno a cuatro órdenes de magnitud mayores que para otras conformaciones. Estos resultados sugieren que esta orientación será siempre la más favorable para la TT-EET en los numerosos casos de este tipo de interacción que se dan en la naturaleza entre moléculas orgánicas con un doble enlace reactivo en su estado triplete y el oxígeno molecular.

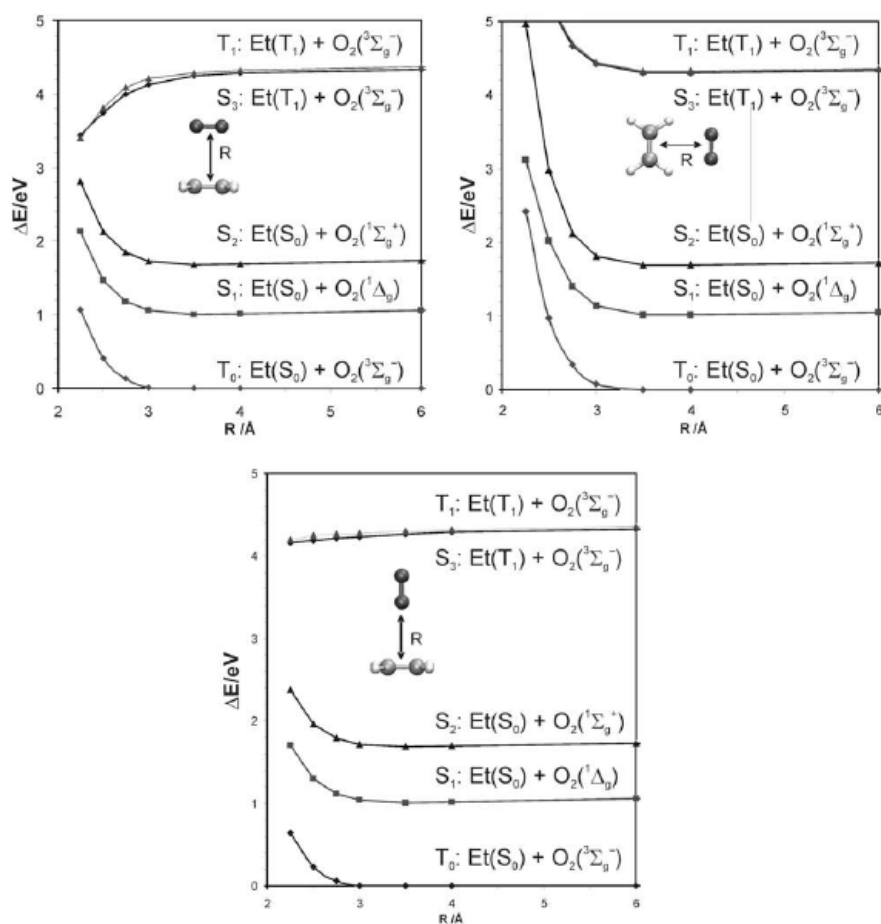


Figura 6.7. Curvas de energía potencial CASPT2 del estado fundamental y los estados excitados más bajos en energía de la supermolécula Et- O_2 en las disposiciones cara a cara (arriba a la izquierda), lado a lado (arriba a la derecha) y perpendicular (abajo).

Tabla 6.4. Acoplamientos (H'), constantes de velocidad (k_{TEI}) y tiempos de vida media (τ_{TEI}) del proceso de transferencia de energía triplete-triplete (TT-EET) entre el etileno y el oxígeno (Et-O₂) en la disposición molecular cara a cara (FF), lado a lado (SS) y perpendicular (PP)

R/ Å	FF			SS			PP		
	H'/eV	k_{TEI}/s^{-1}	τ_{TEI}/s	H'/eV	k_{TEI}/s^{-1}	τ_{TEI}/s	H'/eV	k_{TEI}/s^{-1}	τ_{TEI}/s
10.00	0	-	-	0	-	-	0	-	-
8.00	1.21×10^{-4}	1.40×10^7	7.15×10^{-8}	6.56×10^{-3}	4.11×10^6	2.43×10^{-7}	7.39×10^{-5}	5.22×10^6	1.92×10^{-7}
6.00	3.69×10^{-4}	1.30×10^8	7.69×10^{-9}	1.11×10^{-4}	1.18×10^7	8.49×10^{-8}	5.30×10^{-4}	2.69×10^8	3.72×10^{-9}
4.00	3.71×10^{-3}	1.31×10^{10}	7.62×10^{-11}	1.11×10^{-3}	1.18×10^9	8.45×10^{-10}	1.33×10^{-4}	1.68×10^7	5.96×10^{-8}
3.50	2.12×10^{-2}	4.29×10^{11}	2.33×10^{-12}	2.16×10^{-3}	4.45×10^8	2.24×10^{-10}	7.13×10^{-3}	4.85×10^{10}	2.06×10^{-11}
3.00	1.05×10^{-1}	1.06×10^{13}	9.46×10^{-14}	1.95×10^{-2}	3.61×10^{11}	2.77×10^{-12}	3.89×10^{-2}	1.44×10^{12}	6.93×10^{-13}
2.75	2.32×10^{-1}	5.16×10^{13}	1.94×10^{-14}	3.05×10^{-2}	8.87×10^{11}	1.13×10^{-12}	8.54×10^{-2}	6.96×10^{12}	1.44×10^{-13}
2.50	4.99×10^{-1}	2.38×10^{14}	4.20×10^{-15}	1.71×10^{-1}	2.80×10^{13}	3.57×10^{-14}	1.86×10^{-1}	3.32×10^{13}	3.02×10^{-14}
2.25	9.85×10^{-1}	9.26×10^{14}	1.08×10^{-15}	5.53×10^{-1}	2.92×10^{14}	3.43×10^{-15}	4.06×10^{-1}	1.57×10^{14}	6.36×10^{-15}

Dado que estamos usando la misma estimación para la densidad de estados vibrónicos, es posible comparar sólo los efectos electrónicos para la disposición FF. El Et-Et (representando el máximo solapamiento orbital) conduce a acoplamientos y constantes de velocidad casi un orden de magnitud mayor que el Et-O₂ (menor solapamiento) a cada distancia. Por ejemplo para 3.5 Å la vida media de los procesos es de aproximadamente 0.1 y 2 ps para el Et-Et y el Et-O₂, respectivamente. MetN⁺-Et da, por otra parte, acoplamientos casi tres veces mayores que los de su sistema isoelectrónico Et-Et (como se había observado previamente.⁸⁵ En este caso el solapamiento orbital es prácticamente igual en ambos casos, y las interacciones núcleo-electrones determinarán la diferencia (la cual debe compensarse por una menor densidad de estados en sistemas más pesados). En resumen, el solapamiento orbital entre un donador que interacciona con un aceptor parece ser la clave que controla la eficiencia del acoplamiento electrónico y por tanto los procesos TT-EET.

References

-
- ¹ Allen, J. P.; Williams, J. C. *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 5.
 - ² Govindjee; Foyer, C. H. *Photosynth. Res.* **2005**, *85*, 251.
 - ³ Whitmarsh, J.; Govindjee. In *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*; Singhal, G. S., Renger, G., Irrgang, K. D., Sopory, S., Govindjee, Eds.; Kluwer: Pittsburgh, **1999**.
 - ⁴ Dekker, J. P.; van Grondelle, R. *Photosynth. Res.* **2000**, *63*, 195.
 - ⁵ Zouni, A.; Witt, H. T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W.; Orth, P. *Nature*, **2001**, *409*, 739.
 - ⁶ McDonald, M. S. *Photobiology of higher plants*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, **2003**.
 - ⁷ Ferreira, K. N.; Iverson, T. M.; Maghlaoui, K.; Barber, J.; Iwata, S. *Science* **2004**, *303*, 1831.
 - ⁸ Fajer, J. *Photosynth. Res.* **2004**, *80*, 165.
 - ⁹ Levanon, H.; Möbius, K. *Annu. ReV. Biophys. Biomol. Strut.* **1997**, *26*, 495.
 - ¹⁰ Hasegawa, J.; Ozeki, Y.; Ohkawa, K.; Hada, M.; Nakatsuji, H. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1320.
 - ¹¹ Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8812.
 - ¹² Siegbahn, P. E. M.; Crabtree, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 117.
 - ¹³ Sundholm, D. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *302*, 480.
 - ¹⁴ Parusel, A. B. J.; Grimme, S. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5395.
 - ¹⁵ Sundström, V. *Prog. Quantum Electron.* **2000**, *24*, 187.
 - ¹⁶ Worth, G. A.; Cederbaum, L. S. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *338*, 219.

- ¹⁷ Dreuw, A.; Worth, G. A.; Cederbaum, L. S.; Head-Gordon, M. J. *Phys. Chem. B* **2004**, 108, 19049.
- ¹⁸ Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 45, 1655.
- ¹⁹ Barbara, P. F.; Meyer T. J.; Ratner A. M. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 13148.
- ²⁰ Marcus, R. A. *Annu. ReV. Phys. Chem.* **1964**, 15, 155.
- ²¹ Blancafort, L.; Jolibois, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 722.
- ²² "Conical Intersections: Electronic Structure, Dynamics and Spectroscopy"; Domcke, W., Yarkony, D. R., Köppel, H., Eds.; World Scientific: Singapore, **2004**.
- ²³ "Computational Photochemistry". In "Theoretical and Computational Chemistry"; Olivucci, M., Ed.; Elsevier Publishing: Amsterdam, **2005**; Vol.16.
- ²⁴ Fernández, E.; Blancafort, L.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7528.
- ²⁵ Jolibois, F.; Bearpark, M. J.; Klein, S.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5801.
- ²⁶ Sinicropi, A.; Pischel, U.; Basosi, R.; Nau, W. M.; Olivucci, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 4582.
- ²⁷ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, 122, 104107.
- ²⁸ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8108.
- ²⁹ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1820.
- ³⁰ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 8691.
- ³¹ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chems. Eur. J.* **2006**, 12, 6559.
- ³² González-Luque, R.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Merchán, M.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 9379.

- ³³ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Rubio, M.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 295, 195.
- ³⁴ Pou-Américo, R.; Merchán, M.; Ortí, E. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 9536.
- ³⁵ Pou-Américo, R.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Ortí, E.; Forsberg, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 6067.
- ³⁶ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; Schleyer, P. (v) R., et al., Eds.; Wiley: Chichester, UK, 2004.
- ³⁷ Frutos, L. M.; Castaño, O.; Merchán, M. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 5472.
- ³⁸ Rubio, M.; Merchán, M.; Ortí, E.; Roos, B. O. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 14980.
- ³⁹ Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 1218.
- ⁴⁰ Roos, B. O.; Fülcher, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, 93, 219.
- ⁴¹ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Fülcher, M. P.; Roos, B. O. In *Recent Advances in Multireference Methods*; Hirao, K., Ed.; World Scientific Publishing: Singapore, **1999**.
- ⁴² Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Mol. Struct. THEOCHEM*, **2005**, 729, 99.
- ⁴³ Forsberg, J.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, 274, 196.
- ⁴⁴ Malmqvist, P.-Å. *Int. J. Quantum Chem.* **1986**, 30, 479.
- ⁴⁵ Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 155, 189.
- ⁴⁶ Rubio, M.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, 110, 7202.
- ⁴⁷ Almöf, J.; Fischer, T. H.; Gassman, P. G.; Ghosh, A.; Häser, M. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10964.
- ⁴⁸ Pierloot, K.; Dumez, B.; Widmark, P.-O.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta* **1995**, 90, 87.

- ⁴⁹ Olaso-González, G.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 24734-24739.
- ⁵⁰ Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülcher, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrady, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmelpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Stålring, J.; Thorsteinsson, T.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.0; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, **2004**.
- ⁵¹ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andrés, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.6; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, **1998**.
- ⁵² Gouterman, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139.
- ⁵³ Gouterman, M.; Wagnière, G.; Snyder, L. C.; *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, *11*, 108.
- ⁵⁴ Weiss, C.; Kobayashi, H.; Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1965**, *16*, 415.
- ⁵⁵ Gwaltney, S. R.; Bartlett, R. J. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 6790.
- ⁵⁶ Truhlar, D. G.; Mead, C. A. *Phys. Rev. A* **2003**, *68*, 032501.
- ⁵⁷ Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65.
- ⁵⁸ Hotokka, M.; Roos, B.O.; Siegbahn, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5263.
- ⁵⁹ Elliott, W.H.; Elliott, D.C. *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, **2005**.
- ⁶⁰ Wilkinson, F. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 2569.

- ⁶¹ Robinson, G.W.; Frosch, R.P. *J. Chem. Phys.*, **1963**, 38, 1187.
- ⁶² Gorman, A.A.; Hamblett, I.; Lambert, C.; Spencer, B.; Standen, M.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8053.
- ⁶³ Gijzeman, O. L. J.; Kaufman, F.; Porter, G. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1973, 69, 708.
- ⁶⁴ Gijzeman, O. L. J.; Kaufman, F.; Porter, G. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, **1973**, 69, 721.
- ⁶⁵ Gijzeman, O. L. J.; Kaufman, F.; Porter, G.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1974, 70, 1143.
- ⁶⁶ Wilkinson, F.; McGarvey, D.J.; Olea, A.F. *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 3762.
- ⁶⁷ Olea, A. F.; Wilkinson, F. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 4518.
- ⁶⁸ Wang, S.; Gao, R.; Zhou, F.; Selke, M. *J. Mater. Chem.* 2004, 14, 487.
- ⁶⁹ Förster, Th.; *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55.
- ⁷⁰ Klessinger, M.; Michl, J. "Excited States and Photochemistry of Organic Molecules". VCH Publishers, **1995**.
- ⁷¹ Barber, J. *Rep. Prog. Phys.* 1978, 41, 1159.
- ⁷² Singh, H.; Bagchi, B. *Current Science*. **2005**, 89, 1710.
- ⁷³ Stryer, L.; Haugland, R.P. *Biochem.* **1967**, 58, 719.
- ⁷⁴ Lakowicz, J.R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 2nd edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**.
- ⁷⁵ Fink, R.F.; Pfister, J.; Schneider, A.; Zhao, H.; Engels, B. *Chem. Phys.* 2008, 343, 353.
- ⁷⁶ Dexter, D.L.; *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836.
- ⁷⁷ Liao, D.W.; Cheng, W.D.; Bigman, J.; Karni, Y.; Speiser, S.; Lin, S.H. *J. Chin. Chem. Soc.* **1995**, 42, 177.
- ⁷⁸ Scholes, G.D.; Ghiggino, K.P. *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 1251.
- ⁷⁹ Harcourt, R.D.; Scholes, G.D.; Ghiggino, K.P. *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 10521.
- ⁸⁰ Scholes, G.D.; Harcourt, R.D. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, 5054.
- ⁸¹ Scholes, G.D. *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 18731.

- ⁸² Klessinger, M.; Michl, J. *“Excited states and photochemistry of organic molecules”*, VCH Publishers, New York, **1995**.
- ⁸³ Terenin, A.; Ermolaev, V. *Trans. Faraday Soc.* **1956**, 52, 1042.
- ⁸⁴ Turro, N. J. *“Modern molecular photochemistry”*, University Science Books, Sausalito, 1991.
- ⁸⁵ You Z.-Q.; Hsu, G C.-P.; Fleming, R. *J. Chem. Phys.* **2006**, 124, 44506.
- ⁸⁶ Frutos, L. M.; Castaño, O. *J. Chem. Phys.* **2005**, 123, 104108.
- ⁸⁷ Paterson, M. J.; Christiansen, O.; Jensen, F.; Ogilby, P. R. *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 1136.
- ⁸⁸ Harris, D. C.; Bertolucci, M. D. *“Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy”*, Dover Publications, Inc., New York, **1989**.
- ⁸⁹ Scholes, G. D.; Ghiggino, K. P. *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 1251.
- ⁹⁰ Scholes, G. D.; Harcourt, R. D.; Ghiggino, K. P. *J. Chem. Phys.* **1995**, 102, 9574.
- ⁹¹ Scholes, G.D.; Harcourt, R.D. *J. Chem. Phys.* **1996**, 104, 5054
- ⁹² Newton, M. D. *Chem. Rev.* **1991**, 91, 767.
- ⁹³ Curtiss, L. A.; Naleway, C. A.; Miller, J. R. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 1182.
- ⁹⁴ Cave, R. J.; Newton, M. D. *J. Chem. Phys.* **1997**, 106, 9213.



*"Qual pare a riguardar la Carisenda
sotto 'l chinato, quando un nuvol vada
sov' essa sì, ched ella incontro penda"*

Divina Comedia
Inferno XXI, 136-140

Dante Alighieri

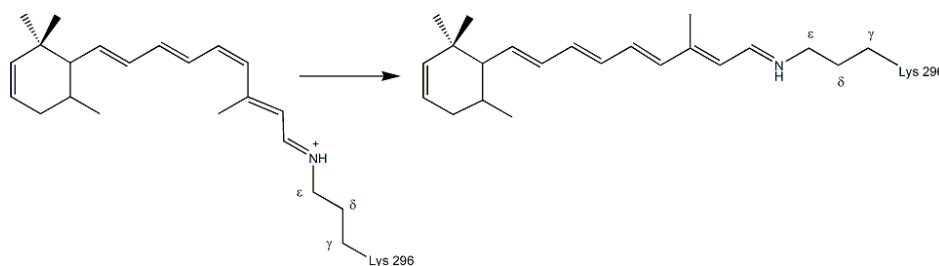
7. INFLUENCIA DEL ENTORNO PROTEICO EN EL PROCESO DE FOTOISOMERIZACIÓN DEL PBS11

7 INFLUENCIA DEL ENTORNO PROTEICO EN EL PROCESO DE FOTOISOMERIZACIÓN DEL PBS11

7.1 Conocimientos previos

La base de Schiff protonada del 11-*cis* retinal (PSB11) es el cromóforo de los pigmentos visuales,^{1,2,3,4,5,6} responsable tanto de la visión escotópica (la Rodopsina, Rh), como de la visión en color (ver más detalladamente en el Capítulo 1).

La actividad biológica de las Rodopsinas es consecuencia de la fotoisomerización *cis-trans* ultrarrápida (200 fs en la Rodopsina, ver ecuación 7.1) de su correspondiente cromóforo de retinal. Este paso ultracorto se conoce con el nombre de paso primario del fotociclo de la Rhodopsina. Tras él, y a un tiempo de mayor escala, tiene lugar un cambio conformacional en la proteína.^{1,5}



[Ec 7.1]

El gran interés que suscita esta fotoisomerización ha hecho que se lleven a cabo muchos estudios sobre ella. Se han publicado los resultados del MEP realizado con el método *ab initio* CASPT2//CASSCF para varios modelos reducidos del PBS11 en vacío^{7,8,9,10,11,12} y recientemente, se han obtenido también los resultados para la estructura del cromóforo completo.¹³ A través de los resultados obtenidos, se ha podido deducir que la fotoisomerización se caracteriza por un mecanismo en el que intervienen dos modos: el primero de estiramiento (*stretching*) y el segundo de una torsión (*one-bond-flip*, OBF)^{14,15} del enlace carbono-carbono activo. Este mecanismo se desarrolla enteramente en el estado *espectroscópico* S_1 (el de transferencia de carga). Este camino, esencialmente sin barrera energética, conduce al sistema hacia el giro del enlace carbono-carbono que corresponde precisamente a un canal de intersección cónica S_1/S_0 . La geometría de la CI y su estructura electrónica, coinciden con el giro intramolecular del estado de transferencia de carga (TICT).^{8,12,13} A partir de este punto, se produce el decaimiento ultrarrápido al estado fundamental y la formación del fotoproducto. Estos resultados que se acaban de comentar, describen la funcionalidad intrínseca del cromóforo de retinal. Sin embargo, existen otros factores “ambientales” como el solvente en el que esté inmerso el cromóforo o su entorno proteico, que afectan tanto a su espectroscopia como a su fotoquímica.¹⁶ Por ejemplo, el máximo de absorción de la Rh, 498 nm, aparece desplazado hacia el rojo con respecto al que se observa en disolución (440 nm). La estructura de la misma proteína juega un papel muy relevante en la modulación espectral de los pigmentos, haciendo posible que la longitud de onda a la que se produce el máximo de absorción sea distinta para cada uno de los pigmentos visuales (S, M

y L). En este contexto, los efectos que pueden causar en el espectro, la sustitución de uno o más aminoácidos, se ha investigado extensamente de forma experimental.^{17,18,19} Por otra parte, en la proteína la fotorreacción tiene lugar en 200 fs con un alto rendimiento cuántico (67%)^{20,21} y con control estereoselectivo (es decir, sólo se produce el fotoproducto *all-trans* PSBT). Sin embargo, cuando se estudia la dinámica del cromóforo aislado en disolución (por ejemplo, de metanol o hexano), se observa un decaimiento biexponencial de un estado excitado con una componente dominante de 2 ps,^{20,22,23} la estereoselectividad se pierde y el rendimiento cuántico disminuye a sólo un 25%.^{20,24} De acuerdo con estos resultados, se ha hallado una barrera de energía en el estado excitado del PSBT en solvente,²² mientras que para el caso de la Rh no se esperan barreras debido a que la naturaleza del proceso es del orden de los sub-picosegundos.^{7,9} Todo esto sugiere que la proteína ejerce un efecto catalítico que hace posible que este evento sea una de las reacciones más rápidas observadas en la Naturaleza.

Parece obvio que tanto las interacciones estéricas como las electrostáticas entre el cromóforo y el entorno proteico que lo empaqueta deben jugar un papel clave en la modulación del máximo de absorción y en el control de la fotoquímica y fotofísica del sistema. El efecto catalítico de la opsina y su influencia en las propiedades ópticas del cromóforo han sido extensamente estudiados en el pasado tanto de forma experimental como computacional. Estos trabajos indican que diferentes efectos actuando de un modo cooperativo son los responsables del incremento de eficiencia en la velocidad de isomerización observada en los pigmentos visuales. Por ejemplo, trabajos experimentales previos

realizados por Mathies y colaboradores²⁵ han mostrado que la interacción estérica intramolecular entre el hidrógeno del C₁₀ del retinal y el metilo del C₁₃ afectan significativamente a la eficiencia (esto es al rendimiento cuántico y a la velocidad) del proceso de fotoisomerización. Por otra parte, Buss y sus colaboradores²⁶ han mostrado recientemente que la conformación en la que se encuentra el cromóforo en su estado fundamental (debido principalmente al empaquetamiento proteico), en la que los enlaces C₁₁=C₁₂ y el C₁₂-C₁₃ están girados, ayuda en la efectividad y rapidez de la transferencia de la “energía del alargamiento” en “energía de torsión” y por tanto, a poblar eficientemente la coordenada de isomerización. Además determinaciones recientes de la estructura cristalina del Rh^{27,28} señalan la proximidad de la Cys-187 al hidrógeno del C₁₂ del retinal, y sugieren que esta interacción podría conducir a un aumento de la isomerización a través de la fotoexcitación. Más allá de la interacción estérica, también se espera que los efectos electrostáticos del entorno proteico jueguen un papel importante en la catálisis de la fotoisomerización. Puesto que el estado fotoactivo S₁ tiene una naturaleza de transferencia de carga, es de esperar que su energía dependa de las interacciones con los grupos polares y residuos cargados del entorno en el que se encuentre. Del mismo modo, la proteína influirá en la intersección cónica (TICT) S₁/S₀ y, en general, en la hiperlínea de cruce S₁/S₀. De hecho, su posición viene determinada por las cargas externas, que pueden desplazar el camino de cruce S₁/S₀ del ideal para la fotoisomerización o incluso eliminarlo.^{16,29} De cualquier modo, mientras los efectos estéricos en la fotoisomerización se han analizado profundamente, el estudio de los efectos electrostáticos se ha centrado, hasta ahora, principalmente en

las propiedades espectrales estáticas (esto es, en las excitaciones verticales) más que en la eficiencia de la reacción fotoquímica, y no se ha realizado, hasta la elaboración de este estudio, un análisis sistemático de estos efectos en la capacidad de fotoisomerización del cromóforo en los pigmentos visuales. Por ejemplo, recientemente se ha llevado a cabo una descripción estática y a nivel de dinámica molecular del proceso de fotoisomerización en la Rh^{30,31,32} por parte del equipo de Olivucci. En dicho trabajo, se usaba metodología híbrida QM/MM³³ con resolución CASSCF/CASPT2. Este trabajo es, hoy en día, una referencia en el estudio teórico de la fotorreacción de la Rh. En cualquier caso, no se centra en el análisis de las razones de la eficiencia de la fotoisomerización de la Rh a causa de los efectos del entorno electroestático. Además de esto, la interacción con el contraión formal E113 y los residuos cercanos cargados/polares se debe analizar cuidadosamente, puesto que son los principales responsables de estos efectos. Curiosamente, el estado de protonación del E181 (que está localizado justo sobre el doble enlace central del cromóforo, que es fotoactivo)^{34,35,30} se ha cuestionado recientemente: mientras que experimentos previos de absorción bi-fotónica³⁶ y de mutación^{37,38} parecían sugerir que era un residuo neutro, protonado, trabajos experimentales^{39,40,41} y computacionales⁴² recientes sugieren que el residuo 181 está desprotonado (cargado negativamente). Esta carga negativa podría influir en la eficiencia de la fotoisomerización y en la estereoselectividad de la reacción.^{16,29,41} Este asunto, todavía sin resolver, representa un estímulo para la presente investigación QM/MM, en la que se investiga sistemáticamente los residuos que juegan un papel importante en el proceso de fotoisomerización.

Como se ha mencionado anteriormente, la Rh muestra un pico de absorción a 498 nm.⁴ Este es un resultado bien establecido, mientras que para los valores de absorción de estados electrónicos de mayor energía, existen varias interpretaciones y asignaciones. En el espectro de absorción de la Rh, registrado por Ebrey y Honing⁴³ aparece, además de la componente dominante a 498 nm, un segundo pequeño máximo a longitudes de onda más cortas con un pico alrededor de los 340 nm. Este pico debería asociarse a la absorción de un estado energético más alto, con una fuerza de oscilador que es prácticamente la tercera parte de la correspondiente a la transición a S_1 . Los experimentos de absorción bifotónica de Birge³⁶ y colaboradores en la Rh (que contenía un 11-*cis-locked* retinal análogo para prevenir el proceso de blanqueamiento) sugieren que el estado S_2 (covalente y oscuro de tipo A_g) está sólo a 2000 cm^{-1} sobre S_1 (por tanto, con un valor vertical de energía de este estado de 63 kcal/mol, 453 nm). Si esta asignación de energía para S_2 fuera correcta, la observada por Ebrey y Honig sería originada por un estado superior a S_2 . En cualquier caso, basándose en los valores de la absorción recogidos para los cromóforos de retinal en fase gas (que sitúa el estado S_2 a energías mucho más altas), Andersen y colaboradores⁴⁴ han reasignado recientemente la banda de absorción bifotónica observada a 2000 cm^{-1} como un estado vibracional del estado S_1 , lo que sugiere que la banda a 340 nm corresponde a S_2 .

En recientes investigaciones computacionales, tanto Buss⁴⁵ como Olivucci³⁰ reproducen con éxito la absorción de la Rh aplicando la misma aproximación: con cálculos a nivel CASPT2/CASSCF(12,12) en el cromóforo colocado en un baño proteico de cargas puntuales. En cualquier caso las razones que conducen al correcto valor de la

absorción son sorprendentemente diferentes en los dos casos. Según el primer estudio, el entorno electroestático sólo tendría un pequeño efecto en las propiedades del par cromóforo/contraión (E113) (la sola presencia del E113 sería suficiente para reproducir la energía encontrada en la proteína). En el segundo estudio, sin embargo, el efecto de E113 sobre la energía de absorción se ve principalmente amortiguado por el resto del entorno proteico, por lo que se recupera el valor de la energía calculada para el cromóforo aislado distorsionado (esto es optimizado con la proteína).

Por otra parte, el trabajo de Buss reproduce bien (66.7 kcal/mol)⁴⁵ el valor de la energía recogido por Birge para S_2 (63 kcal/mol),³⁶ mientras que para el mismo estado S_2 (esto es el covalente de tipo A_g), Olivucci obtiene de forma satisfactoria (87.5 kcal/mol)³⁰ los 340 nm (84 kcal/mol) de absorción observados por Ebrey y Honig.⁴³ Todos estos resultados fueron obtenidos considerando un residuo de Glu-181 neutro. Recientemente Bravaya y su grupo de investigación (aplicando otra aproximación perturbativa QM/MM) reprodujeron con éxito la absorción de Rh usando un E181 cargado. En este caso, también se predecía un efecto pantalla sobre el contraión por parte del campo electroestático de la proteína.⁴⁶ Otros cálculos recientes SAC-CI QM/MM⁴⁷ también predijeron correctamente la excitación de S_1 , pero no se observó ningún efecto apantallante. Finalmente, Altun et al⁴⁸ también han reproducido la absorción de la Rh (y de sus mutantes) empleando un procedimiento DFT/TD-DFT QM/MM. En este estudio, el E181 se considera también neutro, y se responsabiliza al contraión de producir un pequeño desplazamiento hacia el azul (de entre 4 y 6 kcal/mol). De lo expuesto, queda patente que existe mucha información contradictoria

sobre las propiedades espectroscópicas de la Rh. La finalidad de emprender este trabajo fue revelar el papel que los efectos electroestáticos de la proteína, tienen en la modulación espectral.

En este trabajo, el paso fotoquímico primario de la Rh y el cruce entre S_1/S_0 característico del proceso se exploran utilizando la metodología *ab initio* CASPT2//CASSCF y un novedoso procedimiento híbrido, recientemente desarrollado por el grupo de investigación del estado excitado de Bologna, que tiene en cuenta el entorno electrostático a nivel MM.⁴⁹ Se emplea la estructura cristalográfica más reciente, y con mejor resolución disponible para la Rh²⁸ y se determina el camino de isomerización del cromóforo embebido en la proteína.

Es de señalar, no obstante, que no es el objetivo de este trabajo, el estudio de la variación de la estructura de la Rh a lo largo de la coordenada de fotoisomerización (que ya se ha discutido en investigaciones anteriores)^{30,31,32} El objetivo fundamental de esta investigación se ciñe a la evaluación de los efectos que la electroestática del entorno ejercen en las propiedades ópticas del pigmento y en la fotorreactividad de las rodopsinas.

Por este motivo, se tiene en cuenta y se analiza explícitamente el efecto de los residuos, tanto cercanos como lejanos al cromóforo. Por supuesto, no pretendemos rechazar o cuestionar otros efectos que han sido previamente reconocidos en la catálisis de la fotoisomerización. Sin embargo, en este estudio se muestran evidencias computacionales del control electrostático de la fotorreactividad de los pigmentos visuales, los cuales no se han reconocido anteriormente. Es más, las conclusiones obtenidas nos permiten ofrecer un modelo unificado que racionaliza las propiedades espectrales de la Rh y los pigmentos de la visión en color

(azul, verde y rojo), lo cual conduce a formular un sólido mecanismo para la modulación espectral de los pigmentos responsables de dicho tipo de visión. Cabría esperar que estas averiguaciones ayudasen a abrir nuevos escenarios hacia la comprensión más profunda de las deficiencias en la visión producidas por mutaciones en la opsina.

7.2 Especificaciones del método de cálculo

Todos los cálculos han sido llevados a cabo utilizando el nuevo potencial híbrido QM/MM, desarrollado por el grupo del profesor Garavelli.⁴⁹ El método se basa en el esquema del átomo de unión de hidrógeno.⁵⁰ Los subsistemas QM y la MM interactúan del siguiente modo:

- a) todos los átomos QM sienten el potencial electrostático de todas las cargas puntuales MM (esto es un esquema de incrustación)
- b) el potencial estándar MM describe los enlaces de Van der Waals, los estiramientos, las flexiones y las torsiones
- c) todas las interacciones que involucran los átomos MM se tienen en cuenta de un modo clásico
- d) la frontera QM-MM se localiza entre los átomos C_{δ} - C_{ϵ} de la Lys-296 (ver ecuación 7.1)
- e) La región QM (los átomos del cromóforo) se tratan con el método *ab initio* CASSCF/6-31G* a través del conjunto de programas Gaussian03.⁵¹ Se utiliza un espacio activo completo de 12 electrones distribuidos en 12 orbitales π para describir la función de onda CASSCF
- f) el software AMBER8⁵² y el campo de fuerzas ff99⁵² se utilizan para describir la región MM (para la opsina) y sus cargas.

- g) los cálculos QM/MM CASSCF/AMBER se obtienen usando la interfaz COBRAMM,⁴⁹ implementada por el grupo de Garavelli y que reúne al Gaussian03⁵¹ y a los programas AMBER8.⁵²

Para describir el entorno se escoge la cadena proteica del monómero A de la recientemente cristalizada estructura de rayos X de la Rh bovina (código PDB: 1U19, resolución = 2.2 Å).²⁸ A parte de poseer la mejor resolución disponible, esta estructura tiene la ventaja de que recopila todos los aminoácidos. Los hidrógenos atómicos se añaden a través del software H++.⁵³ En general, los grupos susceptibles de estar protonados, son reconsiderados cuidadosamente y a través de un análisis preciso se adopta el siguiente criterio: el Glu-113 se toma cargado, el Glu-122 neutro, el Glu-181 se considera, tanto cargado como neutro, en dos configuraciones proteicas diferentes (Rh₁₈₁₍₋₎ y Rh_{181H}, respectivamente), el resto de residuos de glutamato se mantienen cargados, los de lysina protonados, Asp-83 también protonado, así como tres de los seis residuos de histidina (Hip-65, Hip-100, Hip-278).

El entorno proteico se mantiene congelado durante toda la optimización de geometría QM/MM (se supone que no hay tiempo para que cambie, ya que el paso fotoinducido primario se produce en una escala de tiempo ultrarrápida), mientras que a los átomos del cromóforo QM, los átomos MM de la cadena de la Lys-296 (C_δH₂, C_γ H₂, C_βH₂) y las dos moléculas de agua (W1 y W2) se les permite relajarse.

Para la optimización de geometría del estado S_n se utiliza siempre la función de onda CASSCF incluyendo las n raíces, en el procedimiento promedio. Para la optimización del estado fundamental sólo se utiliza una raíz. Se hace un barrido del relajamiento (con el ángulo diedro bloqueado a específicos valores) para trazar el canal de isomerización en

la proteína. Optimizaciones totalmente libres de restricciones se utilizan para localizar todos los puntos críticos.

Con objeto de tener en cuenta la energía de correlación, tanto los cálculos a nivel CASPT2⁵⁴ como a nivel MS-CASPT2^{55,56} de puntos singulares tienen lugar considerando la presencia del baño de cargas puntuales (AMBER) de la proteína, usando el paquete MOLCAS-6.0.⁵⁷ Salvo que se indique lo contrario, se emplea la función de onda obtenida a través del procedimiento *state average* de tres raíces. Para minimizar la influencia de los estados intrusos débilmente interaccionantes a segundo nivel, se usa la llamada técnica del *level shift* imaginario (con un valor de *imaginary shift* de 0.2).⁸ Las energías QM(CASPT2)/MM se toman como valores de referencia a lo largo de todo el trabajo. Las correcciones MS-CASPT2 sólo se consideran cuando aparece un problema multi-estado (esto ocurre sólo en una situación específica, como será expuesto más adelante). El método de interacción entre estados CASSCF (el CASSI⁵⁸) se utiliza para calcular los momentos de transición dipolar. Las fuerzas de oscilador (f) se obtienen usando los momentos de transición y las energías corregidas a nivel CASPT2.

La distribución de cargas a lo largo de la cadena del cromóforo se evalúa de acuerdo con las funciones de onda CASSCF *state-average* a través del análisis de las cargas de Mulliken, el cual se usa para caracterizar la naturaleza electrónica (esto es iónica frente a covalente) de los estados investigados.

Un análisis de tipo huella digital reversa (RFP, *Reverse Fingerprint*) se emplea para poner de relieve los efectos electrostáticos de los residuos considerados en la energía de excitación: esto es, eliminando las cargas específicas de los residuos investigados (mientras que se dejan

todo el resto de cargas del entorno proteico) y registrando el desplazamiento (hacia el azul o el rojo) de la energía de excitación de S_1 del cromóforo respecto al valor de referencia para la Rh (que está representado por la línea del cero en la figura correspondiente que se discutirá posteriormente).

7.3 Evaluación del estado de protonación del Glu-181

Como se ha comentado en el apartado 7.1.1, existen recientes trabajos ^{39,40,41,42} que sugieren que el Glu-181 de la Rh está cargado (en contra de la creencia clásica, que considera este residuo neutro). Con la finalidad de validar una u otra teoría, se optimizan dos estructuras del cromóforo en diferentes entornos proteicos. En uno de ellos el Glu-181 se mantiene neutro, esto es protonado, (Rh_{181H}), mientras que en el otro se considera negativamente cargado, esto es desprotonado ($Rh_{181(-)}$). En la Tabla 7.1 se recogen las energías verticales CASPT2 calculadas para el estado S_1 (iónico/transferencia de carga tipo B_u) y S_2 (covalente de tipo A_g) del cromóforo optimizado en el estado fundamental de las dos Rh. También aparecen sus fuerzas de oscilador y la caracterización de sus funciones de onda. Curiosamente, mientras que el Rh_{181H} conduce a una energía para S_1 (53.6 kcal/mol) que está ligeramente infraestimada con respecto al valor de absorción observado (57.4 kcal/mol, 498 nm), el $Rh_{181(-)}$ reproduce notablemente bien esta energía (57.6 kcal/mol). Por otra parte, S_2 parece no estar afectado por el entorno electrostático, conduciendo a un valor en la energía de unos 82 kcal/mol en los dos casos.

Tabla 7.1. Energías relativas CASPT2 (ΔE , kcal/mol) de las tres raíces singlete de menor energía para dos diferentes estructuras proteicas ($Rh_{181(-)}$ y Rh_{181H}). Se incluyen también las fuerzas de oscilador ($f_{S_0 \rightarrow S_n}$) y la caracterización de la función de onda.

Estructura Proteica	Estado del cromóforo. (naturaleza electrónica)	ΔE	$f_{S_0 \rightarrow S_n}$	Función de onda* (coeficiente)
Rh₁₈₁₍₋₎	S ₀ (tipo A _g)	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)
	S ₁ (tipo B _u)	57.6	0.74	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.63)
	S ₂ (tipo A _g)	82.0	0.27	(6a) ⁰ (7a) ² (0.11) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.19)
Rh_{181H}	S ₀ (tipo A _g)	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)
	S ₁ (tipo B _u)	53.6	0.75	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.64)
	S ₂ (tipo A _g)	81.6	0.28	(6a) ⁰ (7a) ² (0.10) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.18)

* 6^a y 7^a representan los orbitales HOMO y LUMO π , respectivamente

Esto es lógico, puesto que S₂ posee la misma naturaleza electrónica que S₀ (covalente de tipo A_g), por tanto, ambos tienen la misma distribución de la densidad electrónica, lo que hace que la diferencia de energía S₀-S₂ se vea a penas afectada por causas electroestáticas externas. Este valor y su fuerza de oscilador (0.3) están de acuerdo con la banda de energía de menor intensidad observada en la Rh a 340 nm (84 kcal/mol) por Ebrey y Honig.⁴² De cualquier modo, se debe decir que el valor difiere enormemente del otro dato experimental disponible recogido por la técnica de absorción bifotónica y el valor observado por Birge y colaboradores³⁶ que es mucho más cercano al valor calculado por el grupo de Buss.⁴⁵ No obstante, la asignación del estado covalente S₂ a

partir de los experimentos bifotónicos, ha sido puesta en tela de juicio recientemente.⁴⁴

Los resultados obtenidos por el grupo de Olivucci³⁰ coinciden de forma cualitativa con los experimentos de Ebrey y Honig. Sin embargo, de forma cuantitativa, los obtenidos en nuestro estudio suponen una mejora significativa. Además, introducimos la novedad de un nuevo entorno electrostático, con el Glu-181 cargado, como también se ha hecho en el reciente trabajo de Bravaya.⁴⁶

Las energías absolutas calculadas para las dos estructuras revelan que el Rh₁₈₁₍₋₎ corresponde a una estructura proteica más estable, lo que conlleva una red de puentes de hidrógeno y contribuciones electrostáticas más favorables.

Existen hipótesis contradictorias sobre el estado de protonación del Glu-181 basados en estudios de mutación. Por una parte, que el Glu-181 esté, efectivamente, cargado, explicaría los cambios observados en el espectro de la Rh en las que el residuo 181 ha sufrido una mutación (por ejemplo E181Q y E181D).³⁹ Sin embargo, otras mutaciones^{37,38} adjudican un efecto mucho menor en la absorción de S₁ debido a la sustitución del Glu-181, y apoyan su neutralidad. Al parecer, las medidas de la absorción en mutantes de Rh no dan una respuesta clara y concisa sobre si el E181 está ionizado en la oscuridad. Esto hecho no es sorprendente puesto que este residuo está justamente situado sobre el doble enlace central C₁₁=C₁₂ del retinal (es decir, en una posición simétrica con respecto a la cabeza del PSB y la cola de β-ionona del cromóforo, ver Figura 7.1), lo cual hace que S₁ sea casi insensible a su estado de protonación, como han revelado recientes investigaciones computacionales^{16,29,46} y ha sido señalado también por Kliger y

colaboradores.³⁹ Se debe recalcar también, que el efecto calculado de la ionización del Glu-181 en la absorción de S_1 , aunque no es despreciable (unas 3 kcal/mol), dista mucho de ser menor que la esperada para un residuo tan cercano al cromóforo (por ejemplo el efecto del residuo que actúa como contraión (el Glu-113) es de 0.6 eV, como se comentará posteriormente.

De todas formas, otras evidencias experimentales/computacionales recientemente recogidas, sugieren que el Glu-181 esté cargado:

- i) El Glu-181 actúa como contraión en la rodopsina de invertebrados.^{40,59}

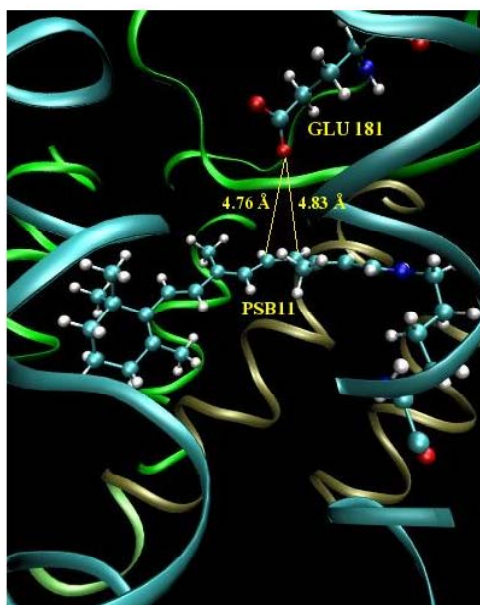


Figura 7.1. Esquema de la Cavidad proteica del retinal en la Rh obtenida a partir de su estructura cristalográfica.²⁸ El Glu-181 está localizado sobre el doble enlace central $C_{11}=C_{12}$ del cromóforo, en una posición simétrica respecto a la cola de β -ionona y la cabeza de base de Schiff protonada.

- ii) El Glu-181 debe estar ionizado para estabilizar el último fotointermediado y hacer eficiente el ciclo de fotoactivación de los pigmentos visuales (según el conocido modelo de interruptor del contraión Glu-113/Glu-181)^{37,38,60,61}
- iii) En los pigmentos visuales de longitud de onda corta en el ratón (MUV), el Glu-181 está desprotonado (junto con el contraión primario).^{60,61}
- iv) El Glu-181 es el contraión en la parapinopsina que comparte con la Rh una gran identidad de la secuencia.⁵⁹
- v) Los estudios espectroscópicos FTIR⁴¹ y simulaciones MD⁴² de la Rh coinciden con tener el Glu-181 cargado negativamente en el estado fundamental.

Teniendo en cuenta los aspectos que se acaban de comentar, y los resultados obtenidos, se sugiere que el residuo 181 está desprotonado en la Rh.

Para revelar los posibles efectos que el estado de protonación del Glu-181 puede tener en la habilidad de fotoisomerización del cromóforo, se calcula el canal de fotoisomerización tanto para Rh_{181H} como para Rh₁₈₁₍₋₎. Los dos caminos aparecen en la Figura 7.2. Puesto que el Glu-181 está posicionado cerca del centro del cromóforo, no se producen efectos significativos en la fotoisomerización. Consecuentemente, en la Figura 7.2 se puede observar que la eficiencia en la fotorreacción es la misma independientemente del estado de protonación del residuo 181: no se ven afectados ni la pendiente ni la posición de la CI.

Los resultados parecen poner en duda que el residuo Glu-181 esté involucrado en el paso fotoquímico primario, y más bien parece ser que

su único papel se centra en la estabilización de posteriores intermediarios del fotociclo y en promover la fotoactivación de la Rh (de acuerdo con el modelo del interruptor del contraíón).^{37,38,60,61} A este respecto, y de acuerdo con los resultados presentados, las estructuras Rh_{181H} y Rh₁₈₁₍₋₎ pueden ser usadas con seguridad para estudiar el paso primario de fotoisomerización y su mecanismo. Nuestros resultados no se pueden considerar pruebas concluyentes del estado de protonación

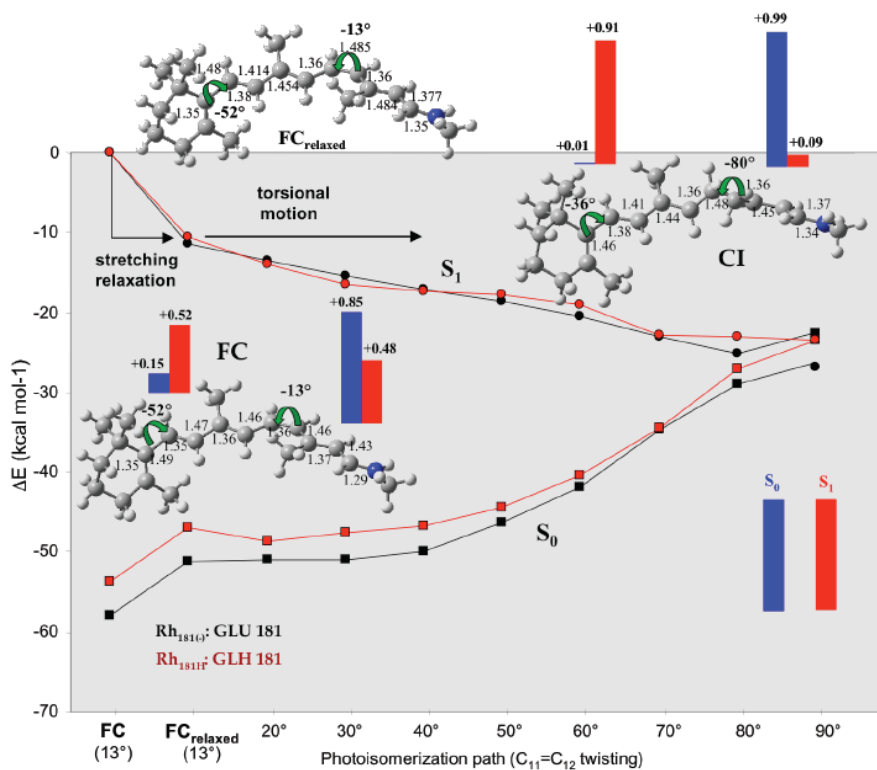


Figura 7.2. Perfil de energías CASPT2 de los estados S₀ and S₁ a lo largo de la exploración QM(CASSCF)/MM de la relajación hacia el proceso de fotoisomerización en las dos distintas proteínas, desde el punto Franck-Condon (FC) hasta el punto de intersección cónica (CI), a través de un punto (FC_{relaxed}) donde solamente han sido relajados los estiramientos de los enlaces del esqueleto (es decir, los ángulos diedros se han congelado). Los diagramas de barras indican la fracción de carga positiva en cada mitad del cromóforo respecto a la rotación del enlace central. Los parámetros moleculares se dan en Å y grados.

del Glu-181 puesto que la precisión de la metodología no es suficiente como para hacer afirmaciones de este calibre. La precisión intrínseca del método CASPT2 es del orden de los 0.1 eV. La aproximación que se asume, al considerar el campo de fuerzas electroestático como un conjunto de cargas puntuales, es una fuente más de imprecisión. En cualquier caso, la Rh₁₈₁₍₋₎ reproduce notablemente bien las propiedades espectroscópicas observadas en la Rh y está de acuerdo con los descubrimientos experimentales más recientes, y puesto que el estado de protonación no afecta a los resultados presentados en la investigación, de aquí en adelante se utilizara esta estructura para la Rh.

Es notable remarcar que estudios previos QM/MM^{30,32} en la fotoisomerización de la Rh, mostraban sorprendentemente, la existencia de un intermediario (un mínimo) en S₁ que contrastaría con el hecho de que este proceso es ultrarrápido. Aparentemente, este hecho no desfavorece la dinámica de sub- picosegundos de la fotoisomerización (aunque hay que puntualizar que este resultado se basa sólo en una única simulación MD a 0 K).³² Nuestros resultados muestran en la Figura 7.2 un camino totalmente libre de barreras, sin que exista ningún intermediario en el estado excitado y da una descripción estática del mecanismo cuyas energías son más coherentes con las observaciones experimentales. Dicho mecanismo de fotoisomerización es el mismo que ya se documentó en trabajos anteriores,^{7,9} esto es, se ve involucrada una coordenada de reacción compleja,²⁸ en la que se da un movimiento de giro cooperativo /concurrente de enlaces C-C adyacentes. Este proceso se asemeja en algo al propuesto por Warshel hace unas cuantas décadas en sus pioneros estudios computacionales,^{62,63} que ya predijeron con éxito, a través de simulaciones de dinámica molecular semi-empíricas, la

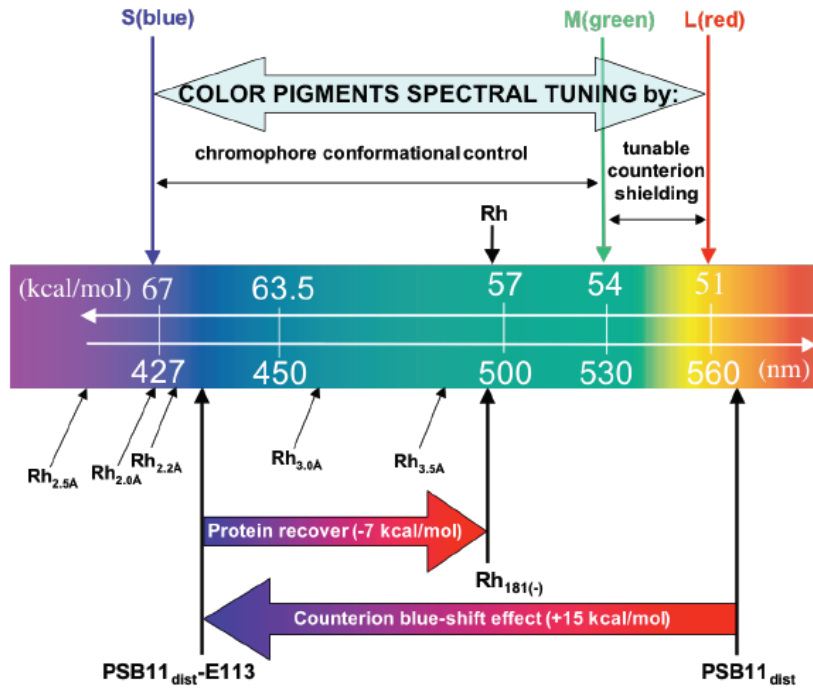
correcta escala de 200 fs para el proceso de fotoisomerización en la Rh. Destacablemente, la dirección calculada para el giro coincide con la señal del giro inicial $C_{11}=C_{12}$ el cual ha sido previamente^{26,30,64} derivado en la Rh.

7.4 Amortiguación del contraión por el entorno proteico

En este apartado, se van a diseccionar los efectos electrostáticos de la proteína sobre la energía de absorción de la Rh. Este análisis es relevante tanto para comprender la sintonización espectral, como su influencia en la eficiencia de la fotoisomerización.

- Propiedades ópticas

La Tabla 7.2 muestra como las propiedades de absorción de S_1 y S_2 cambian según aumenta la complejidad del sistema, esto es, desde el cromóforo aislado ($PSB11_{dist}$) hasta la proteína completa ($Rh_{181(-)}$), pasando por el par iónico ($PSB11_{dist}-E113$) y por los aminoácidos comprendidos en esferas, centradas en el cromóforo, que van aumentando de radio ($Rh_{r=2.0\text{\AA}}$, $Rh_{r=2.2\text{\AA}}$, $Rh_{r=2.5\text{\AA}}$, $Rh_{r=3.0\text{\AA}}$, $Rh_{r=3.5\text{\AA}}$). En todos los casos, la estructura del cromóforo es siempre la distorsionada ($PSB11_{dist}$, optimizada en la proteína). Este análisis nos permite progresivamente identificar los residuos de la proteína que tienen una mayor influencia en la absorción de la Rh. El esquema 7.1 resume estos resultados gráficamente.



Esquema 7.1. Influencia del entorno proteico en la modulación de la energía de absorción en S₁.

Como se esperaba (ver la explicación en la sección previa), S₂ está mucho menos afectado por las cargas externas y su energía se mantiene prácticamente invariable, mientras que S₁ es mucho más sensible al entorno electrostático. El mayor efecto sobre S₁, lo causa el contraión (E113): se predice para el par PSB11_{dist}-E113 una energía de absorción vertical de 74.7 (CASPT2) y 65.7 (MS-CASPT2) kcal/mol, es decir, unos valores significativamente desplazados hacia el azul (25(CASPT2)/15(MS-CASPT2) kcal/mol) con respecto al valor calculado en el cromóforo aislado, PSB11_{dist}, (50.3 kcal/mol). Las 15 kcal/mol (MS-CASPT2) de desplazamiento hacia el azul coinciden cuantitativamente

con lo calculado por Buss,⁴⁵ Olivucci,³⁰ Bravaya⁴⁶ y Nakatsuji⁴⁷ predicen un valor mayor en el desplazamiento al azul de la energía (> 1 eV), causado por el contraíón, (lo que se ajusta a nuestro valor CASPT2). Sorprendentemente, otros cálculos basados en metodología DFT/TD-DFT ONIOM QM/MM aplicada a la Rh⁴⁸ predicen un valor mucho menor para el efecto que el contraíón tiene en el desplazamiento hacia el azul (< 0.5 eV). Este resultado va en contra del resto de valores obtenidos de forma teórica.

Tabla 7.2-I Energías relativas CASPT2 (ΔE , kcal/mol) para los tres estados singlete de menor energía, fuerzas de oscilador ($f_{S_0 \rightarrow S_n}$) y caracterización de la estructura proteica (listado de residuos) del sistema que aumenta en tamaño y complejidad: el cromóforo aislado (PSB11_{dist}), el par iónico (PSB11_{dist}-E113), esferas proteicas de tamaño creciente (esto es, que comprenden todos los residuos dentro de un radio específico r centrado en el cromóforo: Rh _{$r=2.0\text{\AA}$} , Rh _{$r=2.2\text{\AA}$} , Rh _{$r=2.5\text{\AA}$} , Rh _{$r=3.0\text{\AA}$} , Rh _{$r=3.5\text{\AA}$}), la proteína completa (Rh). La estructura del cromóforo es siempre la optimizada en la proteína completa (PSB11_{dist})

Estructura	S _n	ΔE	$f_{S_0 \rightarrow S_n}$	Función de onda ^a	Residuos
PSB11 _{dist}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.78)	
	S ₁	50.3	0.78	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.65)	
	S ₂	79.3	0.23	(6a) ⁰ (7a) ² (0.15) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.13)	
PSB11 _{dist} -E113	S ₀	0.0 ^b (0.0)	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Glu-113
	S ₁	65.7 ^b (75.7)	0.86	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.54)	
	S ₂	95.2 ^b (74.7)	0.11	(6a) ⁰ (7a) ² (0.23) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.18)	
Rh _{$r=2.0\text{\AA}$}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Glu-113, Ala-295. Lys-296, Thr-297
	S ₁	67.2	0.62	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.47)	
	S ₂	77.4	0.35	(6a) ⁰ (7a) ² (0.19) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.40)	

Tabla 7.2-II Energías relativas CASPT2 (ΔE , kcal/mol) para los tres estados singlete de menor energía, fuerzas de oscilador ($f_{S_0 \rightarrow S_n}$) y caracterización de la estructura proteica (listado de residuos) del sistema que aumenta en tamaño y complejidad: el cromóforo aislado (PSB11_{dist}), el par iónico (PSB11_{dist}-E113), esferas proteicas de tamaño creciente (esto es, que comprenden todos los residuos dentro de un radio específico r centrado en el cromóforo: $Rh_{r=2.0\text{\AA}}$, $Rh_{r=2.2\text{\AA}}$, $Rh_{r=2.5\text{\AA}}$, $Rh_{r=3.0\text{\AA}}$, $Rh_{r=3.5\text{\AA}}$), la proteína completa (Rh). La estructura del cromóforo es siempre la optimizada en la proteína completa (PSB11_{dist}).

Estructura	S _n	ΔE	$f_{S_0 \rightarrow S_n}$	Función de onda ^a	Residuos
Rh_{r=2.2Å}	S ₀	0.0	0.0	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Rh _{r=2.0Å} + Trp-265, Tyr-268, Met-207, Phe-212, Gly-121, Gln-122, Phe-293
	S ₁	66.4	0.60	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.49)	
	S ₂	77.6	0.37	(6a) ⁰ (7a) ² (0.20) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.39)	
Rh_{r=2.5Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Rh _{r=2.2Å} +Phe-91, Gly-114, Cys-187, Ile-189, Phe-261, Ala-292, Ser-298
	S ₁	69.0	0.66	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.49)	
	S ₂	77.0	0.31	(6a) ⁰ (7a) ² (0.20) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.39)	
Rh_{r=3.0Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.76)	Rh _{r=2.5Å} +Ala-299, Met-44, Leu-47, Thr-94, Ala-117, Thr-118, Leu-125, Gly-188, Tyr-191, Phe-208, His-211, Phe-294
	S ₁	62.2	0.43	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.57)	
	S ₂	79.6	0.46	(6a) ⁰ (7a) ² (0.18) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.32)	
Rh_{r=3.5Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.76)	Rh _{r=3.0Å} +Wat-358, Tyr-43, Tyr-178, Ser-186, Wat-354
	S ₁	58.7	0.49	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.61)	
	S ₂	80.9	0.48	(6a) ⁰ (7a) ² (0.17) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.27)	
Rh	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)	Proteína entera
	S ₁	57.6	0.74	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.63)	(todos los residuos)
	S ₂	82.0	0.27	(6a) ⁰ (7a) ² (0.11) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.19)	

Curiosamente, las energías CASPT2 y MS-CASPT2 son muy diferentes en nuestro caso. De hecho, mientras que la degeneración entre S_1 y S_2 aparece a nivel CASPT2 para el par iónico, desaparece tras las correcciones MS-CASPT2 (ver Tabla 7.2). En principio, los resultados MS-CASPT2 parecen más razonables, puesto que:

- i) Estos resultados concuerdan más con los resultados de la literatura que los obtenidos con otros métodos correlacionados,^{46,47} así como los resultados para el par iónico recogidos por Buss y colaboradores.⁴⁵
- ii) La energía de absorción MS-CASPT2 para S_1 en el par iónico (430 nm) se ajusta muy bien con las energías experimentales encontradas en el PSB11, en un solvente apolar, (440-460 nm) donde podrían existir sistemas análogos al par iónico.

Para evitar posibles dudas acerca de la validez de los resultados MS-CASPT2, se realiza un test de validación para el par iónico, que consiste en el cálculo de energías CASPT2 con un conjunto de base de tipo ANO que es mejor, aunque más caro computacionalmente, que el 6-31G*. Estos resultados permiten, por tanto, tener una mayor precisión en la estimación de la energía de correlación. Notablemente, las nuevas energías CASPT2/ANO-S[3s2p1d/2s] y CASPT2/ANO-S[4s3p1d/2s] coinciden con las presentes MS-CASPT2/6-31G*, ver Tabla 7.3. S_1 y S_2 no están degenerados, la energía del estado iónico S_1 en el par iónico, 69 kcal/mol, valida el resultado previo MS-CASPT2/6-31G* de 65.7 kcal/mol. Además, la naturaleza electrónica de S_1 (iónica, excitaciones simples $H \rightarrow L$) y S_2 (covalente, doble excitación $H \rightarrow L$) aparecen claramente definidas. Finalmente comentar, que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por los dos conjuntos de

Tabla 7.3. Energías relativas (kcal/mol) CASPT2/ANO-S[3s2p1d/2s] y CASPT2/ANO-S[4s3p1d/2s] para los tres estados singletes más bajos en energía para la estructura FC del par iónico.

Nivel de cálculo	Estado	ΔE	Función de onda (coeficiente)
CASPT2/ANO-S [3s2p1d/2s]	S ₀	0.00	222222000000 (0.69)
	S ₁	69.40	2222u2d00000 (0.58)
	S ₂	75.76	222202200000 (0.28)
CASPT2/ANO-S [3s2p1d/2s]	S ₀	0.00	222222000000 (0.69)
	S ₁	69.11	2222u2d00000 (0.60)
	S ₂	75.75	222202200000 (0.30)

base ANO con los que se realiza el test de validación. Este hecho hace que tomemos los valores MS-CASPT2 para el par iónico. En general, exceptuando ese caso puntual, los cálculos MS-CASPT2 reproducen los CASPT2 en el resto de estructuras investigadas en este trabajo.

En cualquier caso, tanto el valor CASPT2 (74.7 kcal/mol) como el calculado a nivel MS-CASPT2 (65.7 kcal/mol) para el S₁ en PSB11_{dist}-E113 (ver Tabla 7.2) son mayores que los encontrados en la Rh (57.6/57.4 kcal/mol). Parece ser que se da un amortiguamiento del efecto electrostático del contraión por parte del resto de la proteína. No obstante, el efecto que el dieléctrico de la proteína ejerce sobre el E113 no debe ser completo, puesto que sólo se debe recuperar el 50% (esto unas 7 kcal/mol) del desplazamiento al azul que había causado el contraión, ver Esquema 7.1. La Tabla 7.2 muestra que la mayor parte de los residuos responsables de este efecto son aquellos cercanos al del

cromóforo de retinal, especialmente aquellos comprendidos entre las esferas de radios 2.5 y 3.5 Å. Estos son los aminoácidos responsables del amortiguamiento del contraíón y de que la absorción de la Rh no esté tan desplazada hacia el azul. Estos resultados revelan que sólo un limitado número de residuos (14 aminoácidos, ver Tabla 7.2) están potencialmente involucrados en el amortiguamiento del contraíón. Para desentrañar el efecto de estos residuos, el análisis RFP (ver detalles computacionales) se lleva a cabo para cada uno de ellos, así como el del Glu-113. El desplazamiento hacia el azul o el rojo de las energías de excitación del estado S_1 en el cromóforo respecto al valor de referencia en la Rh (que es representado por la línea del cero), se dibuja en la Figura 7.3 para cada residuo investigado.*

Se puede extraer como conclusión de la Figura 7.3, que no hay un residuo específico que se pueda identificar como el único responsable del amortiguamiento del E113. Parece ser un efecto colectivo de un limitado número de residuos polares que rodean al cromóforo: Ser-186 (2.6), Thr-118 (1.6), Ala-117 (1.3), Hie-211 (1.0), Tyr-191 (0.7), Tyr-43 (0.6) (entre paréntesis se recoge el efecto pantalla en kcal/mol). Estos residuos, comprendidos entre las esferas de radio 2.5 y 3.5 Å, producen un significativo desplazamiento al rojo del máximo de absorción y proporcionan prácticamente todo el poder apantallante de la proteína.

* Curiosamente, el análisis reverso (RFP, *Reverse Finger Print*) y el directo (ver Tabla 7.2) no coinciden en el efecto del E113. La diferencia en los dos resultados es debida al distinto entorno de polarización que experimenta la parte QM en las dos aproximaciones. En la proteína se considera completamente el entorno electrostático de la proteína excepto las cargas del residuo bajo investigación, mientras que en el segundo sólo se consideran los efectos electrostáticos del residuo investigado.

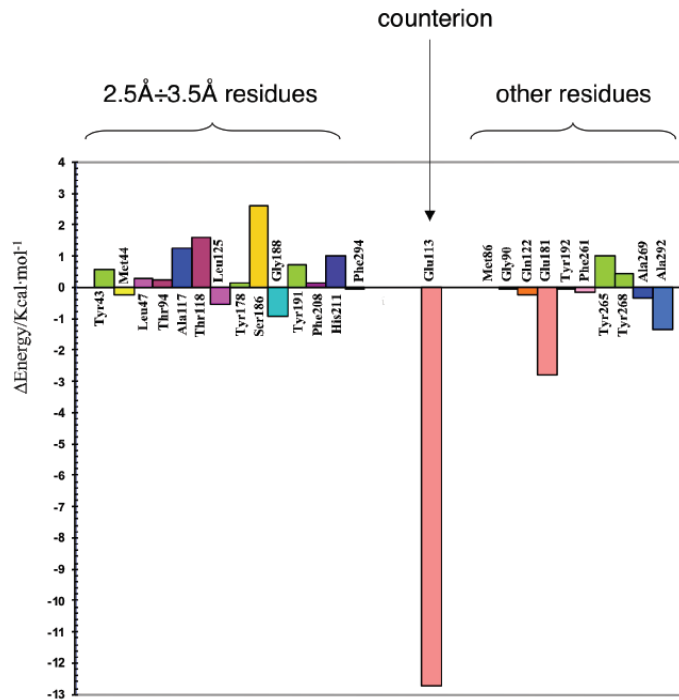


Figura 7.3. Análisis *Reverse Finger Print* (RFP) de los 14 residuos comprendidos entre 2.5 y 3.5 Å de radio desde el cromóforo, el contraión, y otros aminoácidos cuya importancia para la modulación espectral, ha sido reconocida en pigmentos visuales. Todos los valores hacen referencias a energías corregidas CASPT2.

La Figura 7.4 muestra la disposición de estos residuos alrededor del cromóforo y sus cargas asociadas (siguiendo el siguiente código de colores: desde azul/negativo a rojo/positivo). Aparentemente todos estos residuos tienen una carga positiva o negativa cerca de la cabeza de N (o de la cola de C) del cromóforo, respectivamente. Este hecho produce el desplazamiento al rojo en la absorción por desestabilización del estado fundamental y estabilización del estado excitado, (el razonamiento inverso serviría para aquellos residuos que desplazan el máximo de absorción hacia el rojo). Por tanto, parece ser que la proteína está diseñada aquí para producir un efecto neto que amortigüe

parcialmente al contraíón Glu-113. Otros grupos polares que rodean al cromóforo (y que no están entre los mencionados anteriormente) también afectan a sus propiedades espectrales, y conducen a desplazamientos significativos en el máximo de la absorción hacia el azul o el rojo. Por ejemplo, el Glu-181, Glu-122, Tyr-192, Tyr-268, Ala-292, Gly-90, Phe-261, Tyr-265, Ala-269 también tienen un papel reconocido en la modulación espectral y en las propiedades ópticas. Concretamente, el Glu-181 y Glu-122, altamente polares y muy próximos

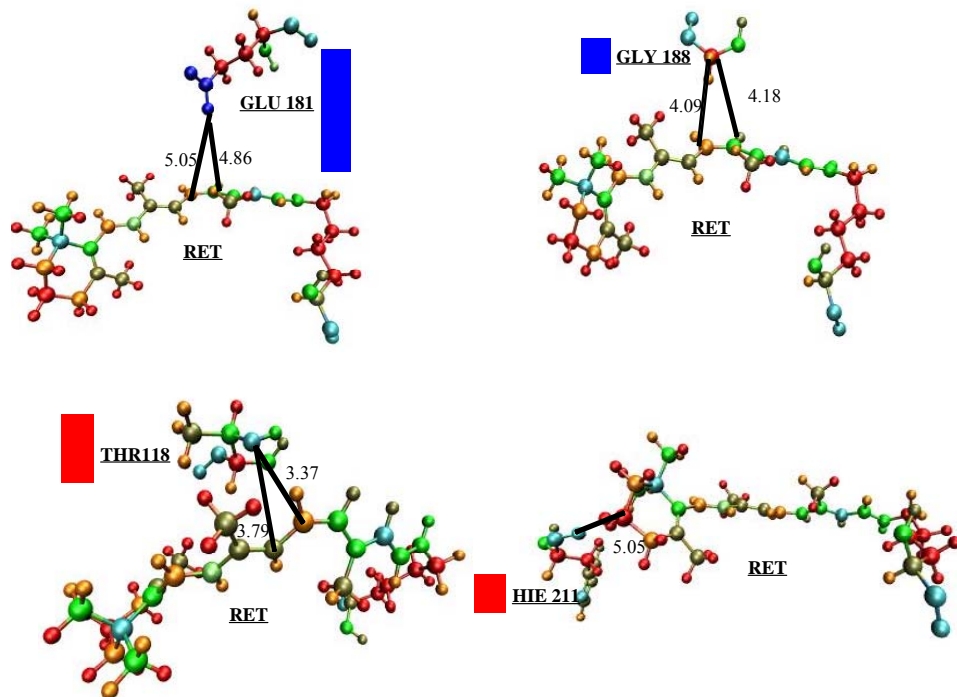
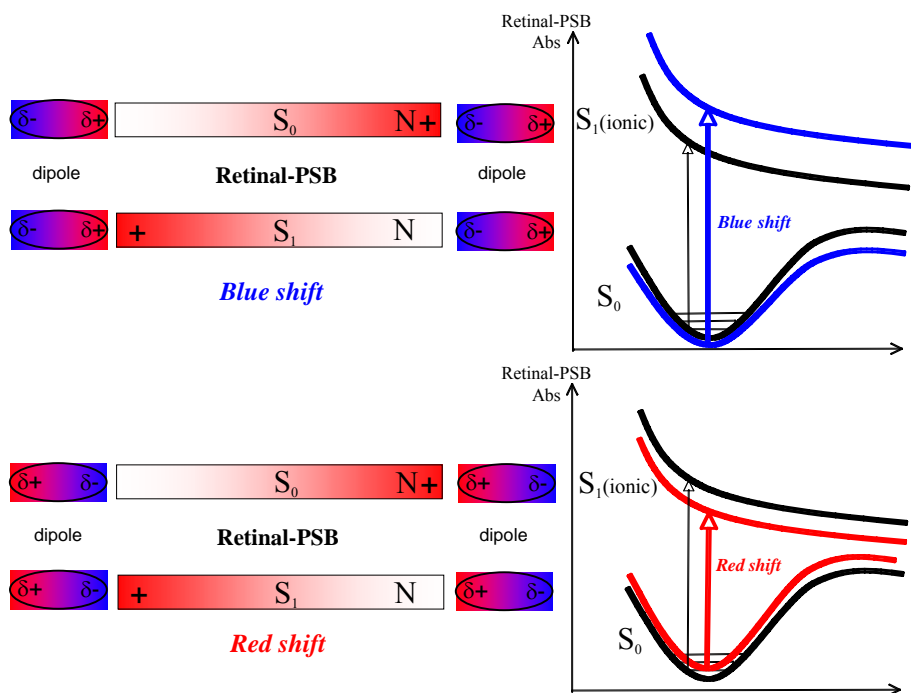


Figura 7.4. Localización de los residuos más importantes para el apantallamiento del contraíón y análisis de sus cargas. El espectro de colores desde el azul al rojo representan cargas parciales desde negativos a positivos en los átomos, respectivamente. Los diagramas de barras representan el efecto en el desplazamiento hacia el azul o el rojo de cada residuo, como se muestra también en el Esquema 7.2.

al cromóforo, las Tyr-192 y 268 que también están muy cercanas²⁸ e intervienen en la cadena de enlace del H,⁶⁵ el aminoácido de la posición 292 de la cadena terminal C, de la transmembrana VII, también causa un valor variable en el desplazamiento de la λ_{\max} - de absorción en diferentes pigmentos visuales.⁶⁶ Recientemente, se ha encontrado que aminoácidos bastante distantes del cromóforo también son capaces de modular el máximo de absorción de la rodopsina,⁶⁷ por ejemplo los residuos de las posiciones 90, 261, 265 y 269 son clave para la sintonización espectral en la visión de color (es decir, en los pigmentos de los conos).^{68,69}



Esquema 7.2. Efectos del desplazamiento hacia el azul o el rojo en el máximo de la absorción del cromóforo, debido a la cercanía de residuos dipolares. Las cargas positivas/negativas están representadas en rojo/azul, mientras que la cadena poliénica del cromóforo se representa como una barra horizontal.

Aunque algunos de estos residuos producen un cambio significativo en la energía de absorción (ver la Figura 7.3 para un análisis de la RFP de estos grupos), su efecto electroestático neto es despreciable. Sólo los efectos electroestáticos de los residuos comprendidos entre la capa de 2.5-3.5Å, suman en total de una forma constructiva. Esta es la primera vez que este efecto ha sido reconocido y ahora se anima a los investigadores experimentales a centrarse en estos residuos en sus estudios (por ejemplo a través de experimentos de mutación) para probar y cuantificar sus efectos.

Las mutaciones que involucren a estos residuos, cruciales para la modulación espectral, podrían ser responsables de ciertas patologías en la visión relacionadas con malfunciones en la Rh. El asunto será discutido y estudiado en profundidad más adelante.

Como conclusión, nosotros predecimos que en la Rh se da una situación de amortiguamiento parcial (un 50% aproximadamente) del contraíón E113. Esta conclusión estaría situada a mitad camino entre los escenarios presentados por Morokuma/Nakatsuji^{45,47,48} (no amortiguamiento, la Rh absorbe como el sistema par iónico) y Olivucci³⁰ (completo apantallamiento, esto es, la Rh absorbe como el retinal distorsionado en vacío).

- **Efectos en la Fotorreactividad: Modificación de la pendiente del canal de fotoisomerización**

Cuando solamente se tiene en cuenta el efecto electroestático del contraíón, S_1 sufre una desestabilización en todos los puntos de su camino de reacción. En la Figura 7.5, se puede comparar este MEP con el obtenido cuando se considera todo el entorno proteico. El efecto

desestabilizador del contraión no es constante, sino que va aumentando con la rotación del doble enlace tal y como ocurre con la transferencia de carga del estado S_1 (de tipo B_u) aumenta con la rotación.¹³ Esta transferencia alcanza un máximo en el punto donde la molécula ha girado y se encuentra la CI, (ver diagramas de barras en la Figura 7.2): este es el punto donde los efectos electrostáticos externos a la energía de S_1 son más importantes. Por tanto, en principio los efectos electrostáticos pueden también jugar un papel importante en el proceso de fotoisomerización, afectando a la pendiente del camino, cambiando la localización de la CI, o incluso eliminando el cruce. Para cuantificar estos efectos, el MEP del S_1 de la Rh se reevalúa bajo distintas condiciones electrostáticas, esto es, en un entorno proteico donde todas las cargas externas han sido eliminadas ($Rh_{no-charges}$) y donde sólo la carga del contraión ha sido explícitamente considerada (Rh_{113}). De este modo, todas las restricciones estéricas se preservan, aunque los efectos electrostáticos se anulan en $Rh_{no-charges}$ o son limitados sólo al Glu-113 en (Rh_{113}). Por tanto, mientras que el primero reproduce el escenario para el cual el contraión está totalmente amortiguado, el último representa la situación límite en la que el contraión está completamente no amortiguado.

La Figura 7.5 resume estos resultados. En ella se recopila el camino y los puntos clave calculados para $Rh_{no-charges}$ (ver Figura 7.5a), Rh (ver Figura 7.5b) y Rh113 (ver Figura 7.5c).

El efecto amortiguador que el dieléctrico proteico ejerce en el contraión (que produce un desplazamiento al rojo en la energía de S_1 con respecto al par iónico) es de unas 7 kcal/mol en el punto FC que, como se ha comentado previamente, es reducido a casi el 50% respecto al efecto to-

tal de desplazamiento hacia el azul producido por el contraíón (el rango va de 14.4 a 15.4 kcal/mol dependiendo del nivel de cálculo adoptado, ver Esquema 7.1 y Figura 7.5c). Esto supone aproximadamente el doble del valor calculado en el punto FC puesto que en la CI se está produciendo una transferencia de carga neta, mientras que en punto FC sólo una transferencia parcial. Esta tendencia es la esperada para S_1 : la estabilización de la energía de S_1 aumenta su carácter de transferencia de carga según se produce la rotación. Los cálculos muestran (ver Tabla 7.3 y Figuras 7.5b y 7.5c) que el apantallamiento del contraíón en la Rh recupera unas 23 kcal/mol en el CI_{Rh} .

Otra consecuencia de estos efectos es que la pendiente del canal de fotoisomerización disminuye dramáticamente (puesto que aumenta la desestabilización del contraíón a lo largo del camino, ver Figura 7.5c). Incluso emerge una barrera a lo largo del camino y aparece un estado excitado intermediario ($M^{ion_{113}}$) impidiendo una rotación eficiente. El canal CI desaparece y se ve reemplazada por un punto sobre S_1 , donde el enlace ya ha sido girado (TP_{113}). Los estados S_1/S_0 están separados en este punto por 21 kcal/mol (ver Figura 7.5c). Por tanto, aparentemente el camino de cruce ha sido eliminado (o desplazado hacia energías mucho más altas, que no son de relevancia fotoquímica). Para investigar a fondo este asunto y poder definir este modelo mecanístico de forma no ambigua, hemos optimizado el intermediario estado excitado ($M^{ion_{113}}$) y el (TP_{113}), tanto dentro de la proteína como sólo considerando el campo de las cargas del contraíón, esto es en Rh_{113} . Estos resultados confirman el mecanismo mostrado en la Figura 7.5c. Las 21 kcal/mol de diferencia energética entre S_1/S_0 que se dan en TP_{113} evitan un eficiente y ultrarrá-

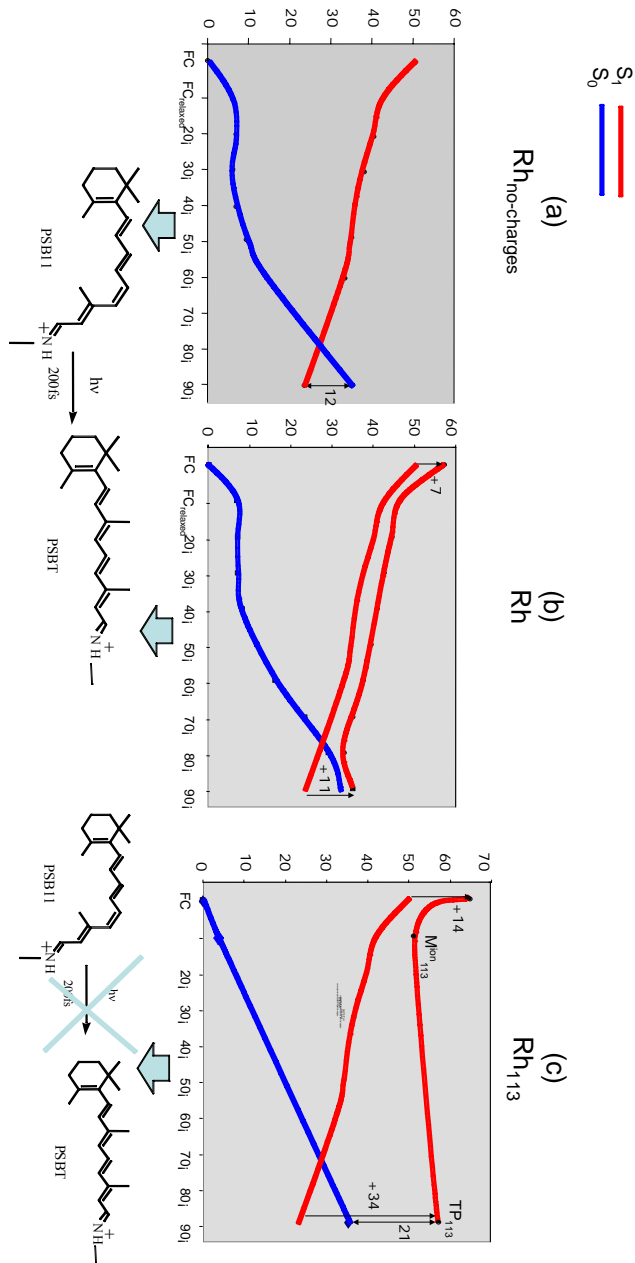


Figura 7.5. Los perfiles de energía de S_0 y S_1 (kcal/mol) a lo largo del MEP de la fotoisomerización de S_1 en la Rh (b) han sido reevaluados en la proteína sin cargas (a) o sólo con las cargas del contraión (c). El perfil (a) está también representado en (b) y en (c). Las energías de los perfiles (a) y (b) corresponden a energías CASPT2, mientras que las (c) son MS-CASPT2.

rido) proceso de conversión interna en Rh₁₁₃. Esta diferencia energética será el mínimo de energía que el dieléctrico de la proteína debe recuperar (por apantallamiento del contraíón) para generar un canal de intersección cónica y provocar un proceso de fotoisomerización eficiente (esto es ultrarrápido). Aunque esta amortiguación no es total, de cualquier forma es significativa y se corrige sobre un 60% (precisamente esas 21 kcal/mol) del efecto total del desplazamiento al azul causado por el contraíón en la estructura TP₁₁₃ (esto es 34 kcal/mol). Por tanto, ese es el mínimo efecto pantalla que tiene que ejercer la proteína para tener pigmentos visuales fotoactivos.

Se puede concluir que la amortiguación del contraíón por la proteína (de al menos el 60% factor de apantallamiento en la estructura girada) es un prerrequisito para tener una fotoisomerización ultrarrápida en pigmentos visuales: recupera un camino sin barreras y un canal de CI. Por tanto, además de proporcionar una herramienta para la modulación espectral que regula la absorción de energía, la amortiguación del contraíón es también mecanísticamente fundamental puesto que promueve la catálisis de la fotoisomerización que sería imposible si el contraíón no fuera apantallado.

Consecuentemente, mediante este razonamiento cabe pensar que, si se construyese una Rh mutada, con poder de amortiguación del efecto electroestático del contraíón alterado, la fotorreactividad del pigmento se vería dañada, y la fluorescencia (por ejemplo desde el intermedio M^{ion}₁₁₃) se convertiría en un proceso competitivo. En este sentido, sería interesante que se iniciasen estudios experimentales en esta dirección, es decir, por mutación puntual directa de los residuos que se han señalado

como responsables de la eficiencia de la amortiguación del contraión: Ser-186, Thr-118, Ala-117, Hie-211, Tyr-191, Tyr-43, Tyr-265.

7.5 Mecanismo de Modulación Espectral en la visión en color.

Se han reconocido varios factores, que solos o de forma conjunta, son responsables de la modulación del color en los pigmentos visuales: el giro de un doble enlace en el retinal, el campo electroestático generado por la opsina, la interacción con el contraión (puente de hidrógeno y transferencia de carga) y polarización proteica (diferente número de residuos aromáticos cerca del cromóforo).

Las longitudes de onda de excitación de S_1 abarcan un intervalo de longitudes de onda de 435 a 570 nm, desde los sistemas en vacío PSB11_{dist} hasta el par iónico PSB11_{dist}-E113. Estos valores cubren el rango adecuado para la absorción de los pigmentos de colores S (425 nm), M (530 nm), y L (560 nm), responsables de la visión en color, ver Esquema 7.1. Este hecho sugiere la siguiente hipótesis de trabajo: se podría lograr la modulación espectral a través de variaciones en la amortiguación del contraión 113. En un sistema donde el Glu-113 esté totalmente amortiguado, como ocurre en *vacuo*, se reproducirá la absorción en la zona del rojo del pigmento del cono L. En el caso totalmente opuesto, el del par iónico, en el que no existe ninguna amortiguación en el efecto del contraión, el sistema absorberá en el azul, como lo hace el pigmento del cono S. La absorción en el pigmento verde (el del cono M), se conseguirá en situaciones intermedias a los otros dos casos, cuando el efecto del contraión sea solo parcialmente amortiguado. Parece ser que la modulación de un efecto pantalla sobre el contraión es una herramienta útil para regular las absorciones de color. Sin embargo, no hay que

olvidar que, según los mecanismos de reacción planteados en el punto anterior, la absorción del pigmento azul (cono S) no puede ser alcanzada aunque la amortiguación nula del residuo 113 sea nula. Si bien es cierto que, de este modo, se reproduce la correcta absorción del color azul, el mecanismo de reacción es ineficiente. De hecho, hemos probado que el contraíón debe estar significativamente amortiguado (en al menos un 60%) para que el pigmento sea fotoactivo. Esto significa que deben cooperar otros mecanismos para alcanzar las 10 kcal/mol necesarias para llegar a la energía de absorción del pigmento azul (desde 57 kcal/mol en la Rh a 67 kcal/mol en S). Se ha sugerido en trabajos previos,⁷⁰ que el anillo de β -ionona constituye una manivela que también puede ser una herramienta reguladora de las energías de absorción. De hecho, un anillo de la β -ionona totalmente girado, produce un desplazamiento de la absorción del retinal hacia el azul, debido a que se reduce la conjugación del cromóforo.

Recientes investigaciones experimentales en una Rh con un retinal análogo acíclico (es decir, al que le falta el anillo de β -ionona) muestra que ésta absorbe a 460 nm.⁷¹ Esto corresponde a un desplazamiento hacia el azul de unas 5 kcal/mol en la absorción respecto a la de la Rh clásica. El mismo efecto se espera que ocurra cuando el anillo de β -ionona haya perdido completamente la conjugación. En cualquier caso, este desplazamiento representa sólo la mitad de la energía es necesaria para conseguir la absorción del pigmento S. Por tanto, parece ser que este único efecto no es suficiente, y que más allá de la pérdida de conjugación del cromóforo (provocado por interacciones estéricas con la envoltura proteica) es necesaria la cooperación de otros efectos. Uno de ellos, por ejemplo, podría ser el

giro de uno (o más) de sus dobles enlaces internos (como el enlace simple C₈-C₉), que también conduce a una absorción más alta de energía. Recientes trabajos experimentales en la Rh que contienen un análogo del retinal con sólo 4 dobles enlaces conjugados (esto es, se usa un 7,8-dihidro retinal)⁷² muestra que este cromóforo ya absorbe a energías del azul (435 nm), como se encuentra en el pigmento cono-S. Por tanto, si el entorno proteico del pigmento se diseña para forzar la geometría del cromóforo en una conformación con una estructura altamente distorsionada (por ejemplo totalmente girado sobre el enlace simple C₈-C₉), sin la necesidad de más efectos, se debería conseguir la absorción en el azul.

Por otra parte, una completa (o en su caso, parcial) amortiguación del contraión por el dieléctrico proteico, parece ser el camino más viable para reproducir la energía de absorción de los pigmentos L y M. En estos casos, la fotorreactividad del pigmento no peligra, ya que el efecto pantalla que se ejerce sobre el contraión será superior al 60%. En el esquema 7.1 se resumen estos resultados.

Es interesantemente comprobar que este razonamiento está de acuerdo con la similitud en la estructura de las opsinas L y M (que comparten el 96% de sus secuencias de aminoácidos), diferente a la observada en el pigmento S (sólo el 43% idéntica con L y M).^{73,74} En el cono azul, la estructura proteica debe estar diseñada de modo que el cromóforo presente giros en los dobles.

Además, este mecanismo de modulación espectral, valida la tentativa de reconstruir las estructuras para los pigmentos L, M y S, recientemente generadas, gracias al uso modelos de homología.⁷⁵ En estos, la estructura de los pigmentos L y M es muy similar y en el pigmento S presenta un

giro conformacional que hace que el retinal esté más distorsionado en ese entorno. Por otra parte, las cadenas dipolares de los residuos juegan un papel importante en el desplazamiento de la absorción de la opsina desde el rojo al verde.

El grupo de investigación de Fujimoto ha realizado también un detallado análisis del mecanismo de sintonización del color.⁷⁶

```

CONO ROJO HUMANO

1  maqqwslqrl agrhpqdsye dstqssifty tnsnstrgpf egpnyhiapr wvyhltsvwm
61  ifvvtasvft nglvlaatmk fklrlhplnw ilvnlavadl aetviastis ivnvqvsgyfv
121 lghpmcvleg ytvslcgigt lwslaiiswe rwlvvckpfg nvrfdaklai vgiafswis
181 awwtappifg wsrywphglk tscgpdvfgs ssypgvqsym ivlmtcci plaiimlcyl
241 qwllairava kqqkesestq kaekevtrmv vvmifaycvc wgyptffacf aanpgyafh
301 plmaalpayf aksatiynpv iyvfmrqfr nciqlfgkk vddgsselssa sktevsvss
361 vspa

CONO VERDE HUMANO

1  maqqwslqrl agrhpqdsye dstqssifty tnsnstrgpf egpnyhiapr wvyhltsvwm
61  ifvviasvft nglvlaatmk fklrlhplnw ilvnlavadl aetviastis vnnvqvygyfv
121 lghpmcvleg ytvslcgigt lwslaiiswe rwmvvckpfg nvrfdaklai vgiafswiva
181 awwtappifg wsrywphglk tscgpdvfgs ssypgvqsym ivlmtccit plsiivlcyl
241 qwllairava kqqkesestq kaekevtrmv vvmvlafcfc wgyptffacf aanpgypfh
301 plmaalpaff aksatiynpv iyvfmrqfr nciqlfgkk vddgsselssa sktevsvss
361 vspa

CONO AZUL HUMANO

1  mrmseeefy lfknissvvgp wdgpyhiap vwafylqaaf mgtvfligfp lnamvlvatl
61  rykklrqpln yilvnvsfgg fllcifsvfp vfvascngyf vfgrhvcale gflgtvaglv
121 tgwslaflaf eryivickpf gnfrfsskha ltvlatwti givsippff gwsrfipegl
181 qcscgpdwyt vgtkyrsesy twflfifcfi vplslicfsy tqllralkav aaqqesatt
241 qkaerevsrm vvmvgsfcv cyvpyaafam ymvnnrnhgl dlrlvtipsf fksaciynp
301 iiycfmnkqf qacimkmvcg kamtdesdtc ssqktevstv sstqvgpn
    
```

Esquema 7.3. Secuencia de aminoácidos de los tres conos humanos, rojo (NCBI Ref. Seq: NP_064445.1),⁷⁷ verde (NCBI Ref. Seq: NP_000504.1)⁷⁸ y azul (NCBI Ref. Seq: NP_001699.1).⁷⁹ Como se puede apreciar, las secuencia de los conos rojo y verde difieren sólo en unos pocos residuos (los marcados en color rojo y verde), mientras que la secuencia del cono azul varía considerablemente respecto a las otras.

7.7 Mutaciones y Deficiencias en la Visión

- Deficiencias en la visión relacionadas con la Rh

Se ha mostrado con anterioridad, que existen varios residuos de la Rh que juegan un papel importante en la modulación espectral (por el efecto pantalla que ejercen sobre la influencia del contraión), véase la Tabla 7.2 y la Figura 7.3. Es probable que las mutaciones naturales que involucran estos grupos, puedan comprometer las propiedades ópticas y la actividad del fotorreceptor, pudiendo ser el origen de patologías de la visión relacionadas con las malas funciones de la Rh. Más específicamente, sugerimos en este trabajo, que muchas de las mutaciones que perjudican la fotoactividad de la Rh, lo hacen por reducción de la eficiencia en el efecto pantalla sobre el contraión. De hecho, hemos visto que al menos un 60% del poder amortiguador debe estar operativo en la estructura de la CI, para preservar la fotoeficiencia del pigmento. Si se reduce el efecto pantalla por debajo de ese umbral, se produce una fotoisomerización ineficiente y se daña la fotoactividad del pigmento.

Se han reconocido cientos de mutaciones naturales, responsables de causar retinitis pigmentosa 4 (en la clasificación genética de la retinitis pigmentosa, cuando ésta se produce por una mutación en el gen de la rodopsina se le asigna el número 4).^{80,81} Si excluimos aquellas mutaciones que inactivan a la Rh, por perturbar su estructura y/o su estabilidad (o la de los intermediarios del fotociclo), o su habilidad para unirse a la proteína G, el resto de las mismas pueden ser responsables del daño por entorpecer el poder del efecto pantalla sobre el contraión. Aunque el análisis sistemático computacional de aquellos cambios

genéticos está fuera del presente ámbito de trabajo, los datos aquí recogidos nos permiten plantear esta hipótesis. Hasta donde sabemos, esta sugerencia representaría un nuevo paradigma en las patologías de la visión relacionadas con la Rh, y animamos a que se investigue experimentalmente, por ejemplo a través de nuevos experimentos de mutación. Los resultados podrían proporcionar la validación de la hipótesis que sugerimos, y abrir una nueva área de estudio dentro del contexto de las enfermedades oculares.

- **Patologías relacionadas con los pigmentos de la visión en Color.**

Curiosamente, las mutaciones relacionadas con la ceguera al color en humanos está principalmente localizada en los pigmentos de los conos rojos (L) y verdes (M), mientras que los pigmentos azules están mucho menos afectados por este defecto.⁷⁴ A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, el efecto pantalla del entorno proteico sobre el contraíón es clave en la sintonización espectral de los pigmentos L y M, mientras que en los S, influye cuando existe también un control en la conformación del cromóforo. Según esto, los conos rojo y verde son más sensibles a los cambios en el ambiente electroestático (por ejemplo, cuando se da una mutación) que podrían alterar la respuesta óptica del pigmento. Muchos residuos que juegan un papel importante en la modulación de la absorción de la Rh, son buenos candidatos para que su mutación produzca deficiencias en la visión. No olvidemos que son menos de 3 kcal/mol las que separan la energía de absorción de los pigmentos L y M, y los residuos de los que estamos hablando producen desplazamientos en la absorción de entre 1-3 kcal/mol.

Por otra parte, existe una diferencia de energía mucho mayor (de a 13 kcal/mol) entre la absorción de los pigmentos verde (M) y azul (S) y, una vez el retinal está acomodado en la estructura proteica, será mucho más difícil que para una única mutación pueda alterar sus propiedades ópticas y la eficiencia de su fotoactividad, ya que éstas están regulados por una fuerte dependencia estérica de los enlaces del cromóforo.

7.3.4 Efectos electrostáticos en las propiedades y fotorreactividad de pigmentos visuales

En este estudio se ofrecen evidencia computacional de que los efectos electrostáticos controlan fuertemente tanto las propiedades, como la fotorreactividad de los pigmentos visuales, y que los dos conceptos están estrictamente relacionados. En vista de los resultados obtenidos, se construye un modelo unificado que revela el papel clave que el ejerce el amortiguamiento sobre el efecto desestabilizador del contraíón en la absorción y fotoisomerización del retinal. Basado en este modelo se propone un mecanismo para la modulación espectral en los pigmentos de la visión en color, que explica las diferentes estructuras encontradas en los conos M/L comparados con el cono S. Además, los resultados permiten el planteamiento de las siguientes hipótesis en relación a las deficiencias de la visión relacionadas con las mutaciones en la Rh:

- La ceguera nocturna puede estar causada por pérdidas en la eficiencia del efecto pantalla sobre el contraíón en el pigmento mutado.

- El diferente mecanismo propuesto para la modulación de la absorción en los conos M/L y en el cono S, explica que los primeros sean más susceptibles a sufrir daños funcionales por mutaciones simples.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a la comprensión de los factores que controlan la modulación espectral y catalizan la fotoisomerización en las rodopsinas, y sugieren que algunas patologías de la visión pueden ser producidas por mutaciones en la opsina, que dañan su efecto amortiguador sobre el contraíón del pigmento visual.

References

- ¹ Kandori, H.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. *Biochemistry-Moscow* **2001**, *66*, 1197.
- ² Needleman, R. Bacteriorhodopsin and Rhodopsin. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; ed.; Horspool, W. M., Song, P.-S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1995; pp 1508-1515.
- ³ Ottolenghi, M.; Sheves, M. *Isr. J. Chem.* **1995**, *35*, U3.
- ⁴ Wald, G. *Science* **1968**, *162*, 230.
- ⁵ Mathies, R.; Lugtenburg, J. The Primary Photoreaction of Rhodopsin. In *Molecular Mechanism of Vision*; ed.; Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., Pugh, E. N. J., Eds.; Elsevier Science Press: New York, 2000; Vol. 3, pp 55-90.
- ⁶ Yoshizawa, T.; Kuwata, O. Vision: Photochemistry. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; ed.; Horspool, W. M., Song, P.-S., Eds.; Boca Raton, FL, 1995; pp 1493-1499.
- ⁷ Garavelli, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Vreven, T.; Klein, S.; Celani, P.; Robb, M. A. *Faraday Discuss.* **1998**, *110*, 51.
- ⁸ González-Luque, R.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Merchán, M.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9379.
- ⁹ Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12509.
- ¹⁰ De Vico, L.; Page, C. S.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Basosi, R.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4124.
- ¹¹ Garavelli, M.; Vreven, T.; Celani, P.; Bernardi, F.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1285.
- ¹² Garavelli, M.; Celani, P.; Bernardi, F.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6891.

- ¹³ Cembran, A.; González-Luque, R.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Garavelli, M. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 173.
- ¹⁴ Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; ed.; Benjamin-Cummings: Menlo Park, CA, 1991.
- ¹⁵ Gilbert, A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*; ed.; Blackwell Science: Oxford, 1991.
- ¹⁶ Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16018.
- ¹⁷ McBee, J. K.; Palczewski, K.; Baehr, W.; Pepperberg, D. R. Confronting Complexity: The Interlink of Phototransduction and Retinoid Metabolism in Vertebrate Retina. In *Progress in Retinal and Eye Research*; ed.; Osborn, N. N., Chader, G. J., Eds.; Elsevier: Great Britain, 2001; Vol. 20, pp 469.
- ¹⁸ Nathans, J.; Piantanida, T. P.; Eddy, R. L.; Shows, T. B.; Hogness, D. S. *Science* **1986**, *232*, 203.
- ¹⁹ Kochendoerfer, G. G.; Lin, S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 300.
- ²⁰ Hamm, P.; Zurek, M.; Roschinger, T.; Patzelt, H.; Oesterhelt, D.; Zinth, W. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *263*, 613.
- ²¹ Kandori, H.; Sasabe, H.; Nakanishi, K.; Yoshizawa, T.; Mizukami, T.; Shichida, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1002.
- ²² Logunov, S. L.; Song, L.; ElSayed, M. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18586.
- ²³ Kandori, H.; Katsuta, Y.; Ito, M.; Sasabe, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2669.
- ²⁴ Freedman, K. A.; Becker, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1245.
- ²⁵ Kochendoerfer, G. G.; Verdegem, P. J. E.; vanderHoef, I.; Lugtenburg, J.; Mathies, R. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 16230.
- ²⁶ Sugihara, M.; Hufen, J.; Buss, V. *Biochemistry* **2006**, *45*, 801.
- ²⁷ Teller, D. C.; Okada, T.; Behnke, C. A.; Palczewski, K.; Stenkamp, R. E. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7761.

- ²⁸ Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Buss, V. J. *Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571.
- ²⁹ Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 6255.
- ³⁰ Andruniów, T.; Ferré, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 17908.
- ³¹ Migani, A.; Sinicropi, A.; Ferre, N.; Cembran, A.; Garavelli, M.; Olivucci, M. *Faraday Discuss.* **2004**, *127*, 179.
- ³² Frutos, L. M.; Andruniow, T.; Santoro, F.; Ferre, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7764.
- ³³ Lin, H.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *117*, 185.
- ³⁴ Teller, D. C.; Okada, T.; Behnke, C. A.; Palczewski, K.; Stenkamp, R. E. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7761.
- ³⁵ Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Buss, V. J. *Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571.
- ³⁶ Birge, R. R.; Murray, P. P.; Pierce, B. M.; Akita, H.; Balogh-Nair, V.; Findsen, L. A.; Nakanishi, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 4117.
- ³⁷ Yan, E. C. Y.; Kazmi, M. A.; De, S.; Chang, B. S. W.; Seibert, C.; Marin, E. P.; Mathies, R. A.; Sakmar, T. P. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3620.
- ³⁸ Yan, E. C. Y.; Kazmi, M. A.; Ganim, Z.; Hou, J. M.; Pan, D. H.; Chang, B. S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 9262.
- ³⁹ Lewis, J. W.; Szundi, I.; Kazmi, M. A.; Sakmar, T. P.; Kliger, D. S. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12614.
- ⁴⁰ Terakita, A.; Yamashita, T.; Shichida, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 14263.
- ⁴¹ Ludeke, S.; Beck, R.; Yan, E. C. Y.; Sakmar, T. P.; Siebert, F.; Vogel, R. J. *Mol. Biol.* **2005**, *353*, 345.
- ⁴² Rohrig, U. F.; Guidoni, L.; Rothlisberger, U. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 223A.

- ⁴³ Ebrey, T. G.; Honig, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 1897.
- ⁴⁴ Nielsen, I. B.; Lammich, L.; Andersen, L. H. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 018304. Although this work refers to bR 2-photon spectra, a parallel reasoning holds for Rh too, due to the similarity of the two spectra: Rh and bR give very similar outcomes in 2-photon experiments, namely a very low energy S_2 signature (very close to S_1) has been assigned both in Rh and bR in the 2-photon experiments, that has been questioned by Andersen and coworkers. In conclusion, the assignment of the S_2 feature in Rh is still far from being unbiased and fully solved.
- ⁴⁵ Sekharan, S.; Sugihara, M.; Buss, V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 269.
- ⁴⁶ Bravaya, K.; Bochenkova, A.; Granovsky, A.; Nemulkin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13035.
- ⁴⁷ Fujimoto, K.; Hayashi, S.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2007**, *3*, 605.
- ⁴⁸ Altun, A.; Yokoyama, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6814.
- ⁴⁹ Altoè, P.; Stenta, M.; Bottoni, A.; Garavelli, M. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 219.
- ⁵⁰ Singh, U. C.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 718.
- ⁵¹ Frisch, M. J. et al. *Gaussian 03, Revision C.02; Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2004.
- ⁵² Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668.
- ⁵³ Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Folta, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 368.
- ⁵⁴ Andersson, K.; Malmqvist, P. A.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
- ⁵⁵ Malmqvist, P. A.; Roos, B. O.; Serrano-Andres, L. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 299.
- ⁵⁶ Serrano-Andres, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104107.
- ⁵⁷ Andersson, K. et al. *MOLCAS, 6.0; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund*, 2004.

- ⁵⁸ Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 189.
- ⁵⁹ Terakita, A.; Koyanagi, M.; Tsukamoto, H.; Yamashita, T.; Miyata, T.; Shichida, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 284.
- ⁶⁰ Kusnetzow, A. K.; Dukkipati, A.; Babu, K. R.; Ramos, L.; Knox, B. E.; Birge, R. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 941.
- ⁶¹ Ramos, L. S.; Chen, M. H.; Knox, B. E.; Birge, R. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5330.
- ⁶² Warshel, A. *Nature* **1976**, *260*, 679.
- ⁶³ Warshel, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 5250.
- ⁶⁴ Buss, V.; Kolster, K.; Terstegen, F.; Vahrenhorst, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1893.
- ⁶⁵ Yan, E. C. Y.; Ganim, Z.; Kazmi, M. A.; Chang, B. S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10867.
- ⁶⁶ Fasick, J. I.; Lee, N.; Oprian, D. D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11593.
- ⁶⁷ Yoshitsugu, M.; Shibata, M.; Ikeda, D.; Furutani, Y.; Kandori, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3923.
- ⁶⁸ Lin, S. W.; Kochendoerfer, G. G.; Carroll, H. S.; Wang, D.; Mathies, R. A.; Sakmar, T. P. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 24583.
- ⁶⁹ Coto, P. B.; Strambi, A.; Ferre, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 17154.
- ⁷⁰ Cembran, A.; González-Luque, R.; Altoè, P.; Merchán, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6597.
- ⁷¹ Bartl, F. J.; Fritze, O.; Ritter, E.; Herrmann, R.; Kuksa, V.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34259.
- ⁷² DeGrip, W. J.; Bovee-Geurts, P. H. M.; van der Hoef, I.; Lugtenburg, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13265.
- ⁷³ Nathans, J.; Thomas, D.; Hogness, D. S. *Science* **1986**, *232*, 193.

⁷⁴ Neitz, M.; Neitz, J., Color Vision Defects. In *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, John Wiley & Sons, Ttd: 2005.

⁷⁵ Trabaino, R. J.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17230.

⁷⁶ Fujimoto, K.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *462*, 318.

⁷⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/9910526?report=genpept>

⁷⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4503965?report=genpept>

⁷⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4502387?report=genpept>

⁸⁰ McKusick, V. A.; al., e., RHODOPSIN; RHO. In *OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man*, Johns Hopkins University:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=180380>.

⁸¹ Okada, T.; Ernst, O. P.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 318.



*"Estudia como si fueras a vivir siempre;
vive como si fueras a morir mañana"*

Alanus de Insulis

8. CONCLUSIONS

8

CONCLUSIONS

1. EXCIMERS OF DNA NUCLEOBASES. FORMATION AND ROLE IN THEIR PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOPHYSICS

The present contribution emphasizes the importance of excimers to understand the distinct photophysics of oligonucleotides, as well as DNA itself, rationalizing the intrinsic photoinduced reactivity taking place in these systems. Our calculations on the adenine homodimer, together with our previous studies on the pyrimidine nucleobases homodimers, support the idea that the long-lived excited states seen in DNA model systems are of excimer (exciplex) type, that is, formed by stacks of two nucleobases, and that they are the origin of the red-shifted fluorescence observed in different oligonucleotides.

- a. **Toward the Understanding of DNA Fluorescence. The Singlet Excimer of Cytosine.** The main prediction of the present research is the existence of cytosine excimers, which can be regarded as an intrinsic property of the C-dimer. The computed vertical emission supports the excimer origin of the red-shifted fluorescence observed in cytosine oligonucleotides.
- b. **Production of Cyclobutane Cytosine Dimers from the Triplet Cytosine Excimer.** Based on high-level ab initio

computations, and taking as starting structure the locally excited $^3(\text{LE})$ excimer, which has a face-to-face arrangement at the ground-state geometry of the cytosine monomer, it is shown that a step-wise intermediate, $^3(\text{SWI})$, is produced with no barrier in the triplet manifold. The structure $^3(\text{SWI})$ has a covalent single bond between the carbon atoms $\text{C}_6\text{-C}_{6'}$, with the $\text{C}_5\text{-C}_{5'}$ bond length kept long. The required energy to reach $^3(\text{SWI})$ from two isolated ground-state cytosine monomers, 2.70 eV, is related to the threshold observed experimentally for a given photosensitizer to become a potential DNA photodamager, and it is in agreement with the triplet energy of thymine in DNA deduced experimentally, 2.80 eV. At the $^3(\text{SWI})$ structure a singlet-triplet crossing $(\text{T}_1/\text{S}_0)_\times$ takes place, which mediates the nonradiative deactivation toward the ground state by an intersystem crossing mechanism (ISC). Under favourable conditions for spin-orbit coupling (SOC), and according to the barrierless profile computed, the decay is predicted to occur in a subpicosecond range. Because the $^3(\text{SWI})$ intermediate is obtained from many different initial structures (see Figure 10), the findings can also be applied to situations where no excimers are expected to be present. Thus, the results offer a nice rationale to the known fact that pyrimidine dimers are formed in solution under triplet photosensitization conditions and the lack of any triplet absorption in the transient spectra reported for $(\text{dT})_{20}$ due to

the high efficiency of the process compared to the time resolution used to monitoring the thymine dimer formation.

- c. **The Role of Adenine Excimers in the Photophysics of Oligonucleotides.** The flexibility of DNA is crucial for the formation of the excimer since the degree of coupling between the two moieties, and therefore the stability of the excimer conformation, will rely on the accessible orientations in the DNA strand. We have presented two extreme cases, the DNA B-form structure, where the overlap for the two adenine monomers is minor, and the ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$ excimer where the interaction is maximum. Between the two cases, charge transfer excimer states are found, whose importance and yield of formation is expected to vary in the sequence of nucleotides depending on the driving force controlling the charge separation between the pair of bases. Such driving force is not expected to largely increase from that of the nucleobase in the biological environment, where the nucleotide is surrounded with counterions. The evolution of the system can be understood from an initial bifurcation between stacked and unstacked nucleobase pairs, which may decay in an ultrafast manner (in a subpicosecond regime) toward the formation of excimer states or the ground state, respectively, the latter channel being open through the localization of the excitation in one of the monomers and via the conical intersection between the S_1 and S_0 states of the monomer, $(\text{gs}/\pi\pi^*)_{\text{CI}}$. The formed

excimer states will, on the other hand, display, in some cases, weak fluorescence and, in general, much slower decay times (from tenths to hundred of ps) to the ground state once the barrier to reach the CI of the monomer has been surmounted, a barrier that will be basically related to the energy required to separate the interacting moieties. Additional channels for deactivation will be accessible for pyrimidine dimers with the formation of nucleobase adducts like the cyclobutane pyrimidine dimers through a corresponding conical intersection or singlet-triplet crossing. It is clear therefore that DNA dynamics, its photophysics and photochemistry, will be controlled in a large extent by the formation of excimers/exciplexes, that is, nucleobase excited dimers, and also that the yield in which these excited dimers will be reached will strongly depend on the conformational properties of the DNA strand and the possibility of generating reactive orientations. Intrastrand stacking interactions seem in this way more relevant than interstrand proton/hydrogen interactions to explain the relaxation dynamics of DNA, which in this way presents slow decay pathways not existent in the monomer nucleobases. The relevance of the different excimer/exciplex conformations (face-to-face, charge transfer) in the photochemistry of the different sequence of nucleobases will have to be studied in the future from a theoretical viewpoint, in particular in the formation of exciplexes.

2. CHARGE AND ENERGY TRANSFERS IN BIOLOGICAL SYSTEMS: BIOEXCIMERS AS PRECURSORS

- a. **Ultrafast Electron Transfer in Photosynthesis: Reduced Pheophytin and Quinone Interaction Mediated by Conical Intersections.** The intermolecular ET between a reduced (charged) donor and an acceptor can be formulated as a dance of three steps. Firstly, both systems have to get close enough, with the right relative orientation, to allow overlap between the singly occupied MO of the donor and the LUMO of the acceptor. Secondly, a number of state-crossings related to multiple conical intersections may then take place, resembling the common procedure of internal conversion controlled by crossing seams, as it is normally recognized in modern nonadiabatic photochemistry. Thirdly, a subsequent separation of the produced moieties leads to the products: neutral donor and reduced acceptor. The process can also take place at large distances, through the presence of an electronic coupling between the states, but less efficiently. A vast amount the work involving synthesis of biomimetic materials for artificial photosynthesis deals with molecules made of covalently linked subunits. According to the present results, noncovalently π -stacked materials should also operate efficiently. It is not surprising, since they are used by nature.
- b. **Modelling the Triplet-Triplet Excitation Energy Transfer.** A theoretical analysis of the triplet-triplet excitation energy

transfer (TT-EET) process in several model systems as ethylene-ethylene, methaniminium cation-ethylene, and ethylene-molecular oxygen has been performed using quantum chemical methods, in particular the *ab initio* multiconfigurational CASPT2 approach. In the framework of a two-state model and a weakly coupling regime, Fermi's Golden Rule has been employed to estimate TT-EET rate constants and lifetimes. For this purpose, a supermolecule dimer approach and an energy-gap procedure have been used to determine the strength of the electronic coupling between the protagonist states. A face-to-face arrangement, in which the orbital overlap between the π clouds of the C=C π bonds is maximized, was selected as the most favourable orientation to efficiently account for TT-EET.

3. PSB11 PHOTOISOMERIZATION ISSUES

- a. **Electrostatic control of the photoisomerization efficiency and optical properties in visual pigments: on the role of counterion quenching.** We have provided computational evidence that electrostatic effects do strongly control both spectral and photoreactivity properties in visual pigments, and that the two concepts are strictly related to each other: a unified model has been produced that discloses the key role played by counterion quenching in assisting retinal photoisomerization and setting up its optical features. Based on that, a sound mechanism for spectral tuning in color

vision pigments emerges that is also validated by recent experimental and molecular dynamics investigations, and that provides a rationale for the different structures found in the M/L pigments as compared to the S one. These results suggest a new paradigm in vision deficiencies related to Rh mutations, as night blindness may also result by an impaired counterion shielding efficiency in the mutated pigment. It is also shown that the easiness in M/L malfunctions with respect to the ones found in S can be easily accounted for by considering the different mechanism for color modulation found in those pigments. In conclusion, these results contribute to the understanding of the factors controlling spectral modulation and photoisomerization catalysis in rhodopsins, and suggest that vision pathologies may be also produced by mutations that harm the counterion shielding power of the visual pigment. To the best of our knowledge, this is a novel concept in vision deficiencies that experimentalists are now encouraged to investigate and address. Finally, it has been pointed out that an intriguing consequence of the presented results is that it would be possible in principle to design modified (i.e. mutated) rhodopsins with a smaller counterion shielding power that can become fluorescent. That is, playing with the protein electrostatic field would be the way to switch from photoisomerizable devices to fluorescent dyes, and the rationale for such a molecular design has been provided here.



PAPERS

"Ultrafast Electron Transfer in Photosynthesis: Reduced Pheophytin and Quinone Interaction Mediated by Conical Intersections".

G. Olaso-González, M. Merchán, and L. Serrano-Andrés.

Journal of Physical Chemistry B, 110, 24734-24739 (2006)

Ultrafast Electron Transfer in Photosynthesis: Reduced Pheophytin and Quinone Interaction Mediated by Conical Intersections

Gloria Olaso-González, Manuela Merchán, and Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received: June 22, 2006; In Final Form: September 20, 2006

The mechanism of electron transfer (ET) from reduced pheophytin (Pheo⁻) to the primary stable photosynthetic acceptor, a quinone (Q) molecule, is addressed by using high-level *ab initio* computations and realistic molecular models. The results reveal that the ET process involving the (Pheo⁻ + Q) and (Pheo + Q⁻) oxidation states can be essentially seen as an ultrafast radiationless transition between the two hypersurfaces taking place via conical intersections (CIs). According to the present findings, an efficient ultrafast ET implies that the Pheo⁻ and Q move toward each other in a given preferential parallel orientation, reaching the most effective arrangement for ET at intermolecular distances (*R*) around 5–3 Å, where the lowest CIs are predicted. Favored donor/acceptor interactions are related to orientations with some overlap between the lowest occupied molecular orbitals (LUMO) of the two systems, and they lead to state-crossings at an earlier stage of the movement (larger *R*). Furthermore, when the topology of the interacting moieties does not make possible the LUMOs overlap, the corresponding diabatic potential energy curves do not intersect. Thus, it is anticipated that large scale motions, which are difficult to monitor experimentally, are actually occurring in the photosynthetic reaction centers of bacteria, algae, and higher plants, to fulfill the observed ultrafast ET processes.

1. Introduction

A vast amount of information about photosynthesis is currently available thanks to the efforts of numerous researchers along the past two centuries and it keeps growing considerably every day.^{1–8} Nevertheless, to achieve a detailed knowledge of the entire process of transformation of solar into chemical energy in the photosynthetic reaction centers (RCs) of bacteria, algae, and higher plants still represents a true challenge, from both experimental and theoretical standpoints. It is clear that learning about photosynthesis means a better understanding of life on earth as we know and it is also well recognized that the realm of photosynthesis has become truly interdisciplinary. Apart from its intrinsic interest, research in the field is essential in synthetic organic chemistry, nanotechnology, and material science, whereas bioinspired devices have been successfully designed and their performance is increasing continuously.⁹ Because of the outstanding development of computational methods and tools, the discipline of quantum chemistry may help to unravel, and it indeed does,^{10–18} certain aspects of the extraordinarily complex mechanisms involved in the RCs that can hardly be deduced from direct experiments.

The purple bacteria RC is probably the most studied and best understood photosynthetic system.^{1,8,15} Upon excitation of the special pair (SP) dimer of bacteriochlorophyll (BChl) *a* molecules (more frequently found than BChl *b*), charge separation occurs within a few picoseconds, yielding the oxidized special pair (SP⁺) and a reduced bacteriopheophytin (BPheo⁻). The captured electron is subsequently transferred to ubiquinone in about 200 ps.⁴ In oxygenic photosynthesis a simultaneous excitation of pairs of chlorophyll (Chl) *a* molecules, labeled as P680 in photosystem II (PSII) and P700 in photosystem I (PSI), also takes place, producing oxidized P680 (P680⁺) and reduced

Pheo (Pheo⁻) in PSII. Pheo is a pheophytin molecule that can be viewed as a chlorophyll moiety with the central magnesium ion replaced by two hydrogen atoms (see Figure 1) and it is the actual primary electron acceptor of PSII. The extra electron of Pheo⁻ is then rapidly given to the plastoquinone molecule, considered as the primary *stable* electron acceptor of PSII. Therefore, both bacteria and plants proceed through a similar scheme. Once the photoinduced charge separation on excited RCs occurs, a quinone-like system is capable of gaining the electron localized on a reduced pheophytin-like molecule in a time regime of picoseconds. What is the underlying mechanism of this ultrafast electron transfer (ET)? Answering to this question has been the main motivation to undertake the present research.

Understanding the mechanism involved in ET reactions is both intriguing and challenging.¹⁹ Nowadays, it constitutes one of the most active areas of research in physical chemistry. It is well-known that ET processes are encountered quite often in biological functions in connection with the transduction of energy that ultimately leads to a biochemical signal. They are usually described within the framework of quasi-equilibrium schemes, Marcus' theory being the most popular.²⁰ In photosynthesis, ETs have two specific characteristics: (i) they are activationless, that is, they take place in the so-called inverted region of the Marcus theory, and (ii) they proceed very fast and in the same order of magnitude as the time scale of vibrational motion (in the femto- or picosecond regime) and consequently nonequilibrium aspects cannot be discarded. In this sense, ultrafast ET reactions can essentially be seen as radiationless transitions of the supersystem because of the breakdown of quasi-equilibrium dynamic models.^{17,19} The relationship between the Marcus–Hush diagrams and the topology of the conical intersections for different intramolecular electron transfer rearrangements has been discussed in detail by Blancafort et al.²¹ A large body of experimental and

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Luis.Serrano@uv.es.

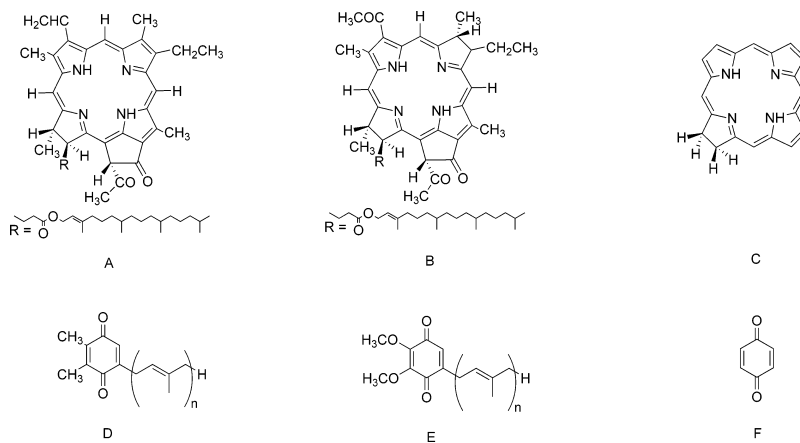
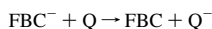


Figure 1. Structures of phaeophytin *a* (A), bacteriopheophytin *a* (B), chlorin (C), plastoquinone (D), ubiquinone (E), and *p*-benzoquinone (F).

theoretical work involving a complete variety of relevant biological chromophores, including electron-transfer reactions, supports today that efficient ultrafast nonradiative transitions are mediated by conical intersections (CIs).^{22–26} True electronic degeneracy occurs at a CI point, which is lifted in at least two directions, which are functions of nuclear coordinates. The denomination *conical intersection* comes from the fact that the corresponding hypersurfaces at a CI point have the shape of a double cone when the energy of the upper and lower state is plotted against those privileged coordinates. An infinite number of CI points form a crossing seam or hyperline between two states of the same multiplicity. To describe the dynamics of photochemical reactions, full characterization of the hyperline is essential. Normally, in practice, efficient transition from one state to the other is expected to take place mainly around the region of the lowest energy point of the hyperline, i.e., at the lowest CI.²² Thus, most of the theoretical work has been addressed to characterize the lowest minimum energy crossing point (MECP).²⁷ Furthermore, for a system of large molecular size as that here considered, the realistic goal is to find the region of coordinates where the MECP could be characterized.

Just to mention two paradigmatic examples, the photostability of the DNA bases^{28–31} and the primary photochemical event of visual transduction of the retinal protonated Schiff base³² are both controlled by the presence of CIs involving the respective hypersurfaces of the ground and lowest electronic excited state. In connection with the present research, it is worth mentioning that recent computational evidence supports that the ultrafast photoinitiated long-range ET in cyclophane-bridged zincporphyrin–quinone complexes is facilitated via a CI.^{16,17} The current work represents, however, the first high-level *ab initio* research of *intermolecular* ET involving *neutral/reduced* species on realistic models related to the photosynthetic RCs. For this purpose, and in order to make the computation manageable, the study has been focused on the following reaction



where FBC/FBC[−] represent the neutral/reduced forms of free base chlorin and Q/Q[−] the *p*-benzoquinone molecule and *p*-benzosemiquinone radical anion, respectively. As can be seen from Figure 1, the relationship of FBC with Pheo (or BPheo) and Q with the actual primary photosynthetic stable quinone

acceptors is clear. Therefore, it is not surprising that FBC and Pheo have similar optical spectra.¹⁰ Substituents in Pheo are most probably used to anchor the chromophores and are expected to play a secondary role for the efficiency of the ET process. The FBC system has been preferred with respect to Pheo (with no symmetry elements), also because the former has somewhat higher molecular symmetry, which represents a noticeable computational advantage without detriment of the conclusions achieved.

To describe properly the electron attachment in FBC and Q, electron correlation has to be included to a large extent.^{33–35} It is well-known that anionic systems are more difficult to handle theoretically than neutral molecules.³⁶ As shown earlier for different molecules, the CASPT2/CASSCF protocol is capable of recovering dynamic electron correlation, yielding accurate electron affinities.^{35,37,38} Computation of the [FBC/Q][−] system at the CASPT2 level employing extended basis sets was found to be mandatory in order to lead to conclusive results. Doubtless such calculations have constituted a formidable task, requiring considerable manpower and software/hardware resources. As shall be discussed below, the results reported here give insight on the global conditions and relative donor–acceptor orientation in order to display an efficient ET. In addition, we can safely anticipate that the same principles are expected to control the efficiency of analogous ET-based materials operating under the same basic principles, which might be helpful to bear in mind as guidance for future development on material science.

2. Computational Details

The low-lying excited states of the [FBC/Q][−] system, as well as those of the corresponding isolated moieties, have been studied by using multiconfigurational second-order perturbation theory through the CASPT2 method.³⁹ The successful performance of the CASPT2 approach in computing spectroscopic properties is well-established.^{40–42} State-average CASSCF wave functions were used as zeroth-order wave functions, including in the average procedure the roots of interest. Details about the active spaces and basis sets employed shall be given below as required. To minimize the influence of weakly interacting intruder states at the second-order level, the so-called imaginary level shift technique was employed,⁴³ being the value of the selected shift 0.2 au. The CASSCF state interaction (CASSI)

TABLE 1: Computed Vertical Electron Affinity (VEA) for Free Base Chlorin (FBC) Employing Different One-Electron Basis Sets^a

basis set	CASSCF (eV)	CASPT2 (eV)
6-31G	-0.13	0.13
6-31G*	-0.17	0.42
ANO-S ^b C,N[3s2p1d]/H[2s]	0.25	1.05

^a The active space comprises four MOs (Gouterman's model) with four (five) active electrons for the neutral (anionic) molecule. ^b Primitive sets: C,N (10s6p3d)/H(7s), ref 48.

method^{44,45} was used to calculate the transition dipole moments. In the expression for the oscillator strength, the CASSCF transition moment and the energy difference obtained in the CASPT2 computation were employed.

The ground-state geometry for FBC was optimized at the B3PW91/6-31G* level, which has been successfully employed earlier for molecules with similar structure.⁴⁶ Geometry optimization was performed within the constraints of the C_{2v} and C_s point groups. The present results are in accordance with previous findings obtained at a comparable level of theory and consistent with the corresponding optimized MP2 structure.⁴⁷ On the basis of a previous experience on *p*-benzoquinone,³⁴ the ground-state geometry of the system (D_{2h} symmetry) was optimized at the π -CASSCF level by including in the active space the π valence orbitals, that is, a total of eight electrons were distributed among the eight π molecular orbitals (MOs). The ANO-S basis set was used with the contraction scheme C,O[3s2p1d]/H[2s].⁴⁸ For detailed information about the geometric parameters, the reader is referred to the Supporting Information.

The calculations were performed with the tools available in the MOLCAS-6⁴⁹ and the Gaussian 98⁵⁰ quantum chemistry packages.

3. Results and Discussion

3.1. Calibration Calculations: Electron Affinities. The vertical electron affinity (VEA) of FBC was calculated using the CASSCF and CASPT2 methods. The influence of the results upon increasing the flexibility of the basis sets was carefully analyzed. The active space comprised four molecular orbitals, which correspond to the Gouterman's model.^{51–53} Accordingly, four and five electrons were used as active for the neutral and anion, respectively. As can be seen in Table 1, the computed VEA depends on both the level of calculation and the type of basis set employed. Only with the larger ANO-type basis set the VEA becomes positive at the CASSCF level. In order words, as reflected by the negative values (6-31G and 6-31G* results), the FBC anion is predicted to be unbound with respect to electron attachment at the CASSCF level of theory. When dynamic electron correlation is included by using the CASPT2 method, positive VEA are obtained with the three basis sets employed, increasing from 0.13 to 1.05 eV upon enlargement of the basis set. On the other hand, the difference between the CASPT2 and CASSCF results calculated with the ANO-S basis sets is 0.8 eV, which is entirely due to the inclusion of dynamic electron correlation through the CASPT2 approach. Quite impressive, indeed, considering it is just a second-order method, although it is not surprising on the basis of previous experience.^{37,54} Therefore, our best estimate for the VEA of FBC is 1.05 eV. Because of the single configurational nature of the CASSCF wave functions of both the neutral and radical anion systems and taking into consideration the inherent flexibility of the ANO-type contraction employed, the result can be

considered to be in practice converged (± 0.1 eV) with respect to further improvements (enlargement of the active space and basis set). The VEA of FBC is expected to be a well-defined positive value in view of the important role that this molecule has in biological processes and the known redox potential.¹⁰ As far as we know, there is lack of experimental datum to compare with. Nevertheless, the computed VEA of FBC (1.05 eV) is comparable to that obtained at the IP-EOM-CC level for free base porphyrin (1.07 eV)⁵⁵ employing a basis set of similar quality.

The relevant contribution of dynamic electron correlation (CASSCF vs CASPT2 results) on the computed EA of *p*-benzoquinone has been discussed elsewhere.³⁵ Employing the ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s] basis set, the VEA for *p*-benzoquinone is here computed to be 1.63 eV at the π -CASPT2 level, which is consistent with earlier findings.^{34,35} A previous determination at the same level of theory yielded 1.64 eV using a larger basis set, in particular the ANO-L C,O[4s3p1d]/H[2s1p] + 1s1p1d diffuse functions. Therefore, at least for the low-lying states, the ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s] basis set is flexible enough for the treatment of *p*-benzoquinone in [FBC/Q]⁻. Furthermore, in accordance with the single configurational nature of the neutral ground state and the *p*-benzosemiquinone radical anion, the calculated VEA at the restricted open-shell MP2 level employing the ANO-S C,O[3s2p1d]/H[2s] basis set, 1.77 eV, is also of comparable quality, just 0.14 eV above the π -CASPT2 result, giving insight into the (minimum) active space required for the treatment of the [FBC/Q]⁻ system. Therefore, it is expected that the ANO-S type basis set with the contraction C,N[3s2p1d]/H[2s] and the active space of five electrons distributed in five molecular orbitals will be able to describe accurately the ET involved in [FBC/Q]⁻.

3.2. Electron-Transfer Between Free Base Chlorin Radical Anion and Quinone. Potential energy curves (PECs) for two different oxidation states of the system [FBC/Q]⁻ along the intermolecular distance *R* have been built for three different parallel arrangements, with the subsystems kept fixed at the respective ground-state equilibrium geometry. As shown in Figure 2, the orientations considered are defined by the angle θ formed between the binary symmetry axis C_2 of FBC (perpendicular to the axis containing the inner pyrrolic hydrogen atoms) and the axis passing through the oxygen atoms of the Q molecule. The results obtained at the CASPT2 level are depicted in Figure 2. The ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s] basis set was employed throughout. In [FBC/Q]⁻, as derived from calibration calculations on FBC and Q, the active space for the reference CASSCF wave function comprised five MOs (four of FBC and one of Q) and five active electrons. At each intermolecular distance recorded in the pictures, state-average CASSCF calculations of the lowest three roots were carried out for the global system at $\theta = 0^\circ$ (C_s symmetry) and $\theta = 45^\circ$ (C_1 symmetry), whereas two roots of each symmetry were computed for the C_s $\theta = 90^\circ$ orientation. Since the third root is not relevant for the ET process here considered, it will not be further discussed. The CASSCF results have been collected in the Supporting Information.

Our study starts once the photoinduced charge separation has occurred in the photosynthetic RCs and the Pheo⁻ species (or BPheo⁻) has been consequently produced. Thus, one should be placed in the right-hand side of the PECs of Figure 2. Of course, at infinity separation (here computed as two independent fragments) the three asymptotic limits, corresponding to the three different orientations, become equivalent and equal to the (FBC⁻ + Q), which is about 0.7 eV above the lowest limit (FBC +

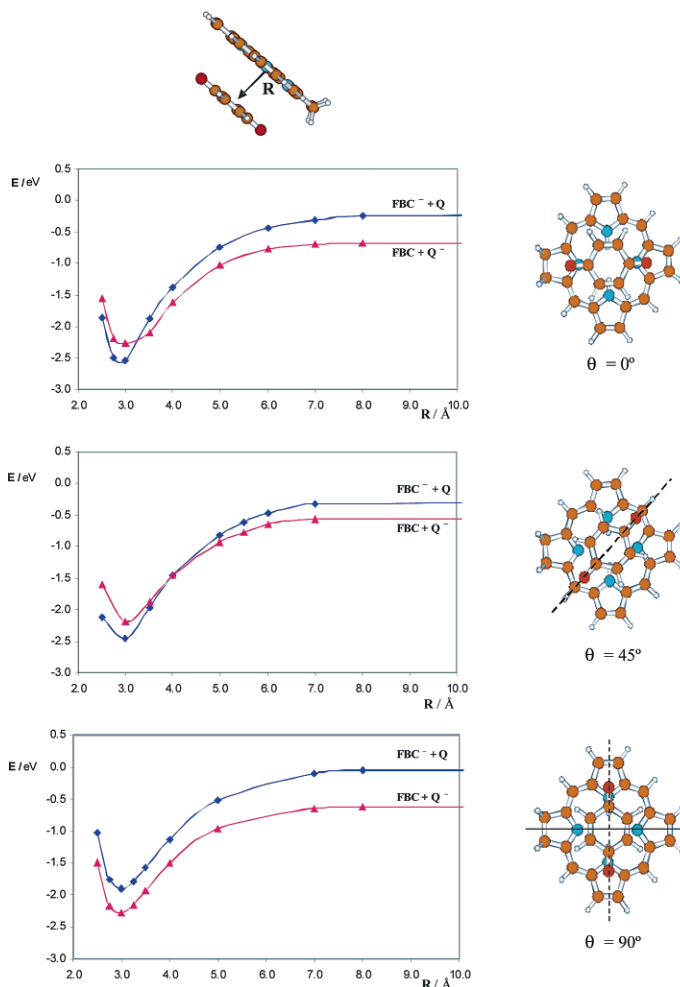


Figure 2. CASPT2 potential energy curves for the $[\text{FBC}/\text{Q}]^-$ system built with respect to the intermolecular distance R . The three different orientations are defined by angle θ (see the text).

Q^-). That energy difference is precisely the energy difference of the VEAs computed for Q and FBC. It is worth noting that the reactants of interest, $(\text{FBC}^- + \text{Q})$, correspond at large R to the lowest excited state of the $[\text{FBC}/\text{Q}]^-$ system. Since the Q molecule has a higher VEA than FBC, the noninteracting FBC plus Q^- system becomes the ground state at large R .

As can be readily seen from Figure 2, the energy separation between the two states at $R = 10 \text{ \AA}$ is the largest for the orientation at $\theta = 90^\circ$ and the smallest at $\theta = 45^\circ$, between them being the situation at $\theta = 0^\circ$. In other words, that at $R = 10 \text{ \AA}$ ($\theta = 90^\circ$) the energy difference between the two states is already close to the asymptotic limit at infinity reveals that the interaction between FBC^- and Q is not as strong as compared to the other arrangements. Since the CASSCF wave functions of FBC^- and Q^- are basically described by a single configuration with the extra electron located in the LUMO-like natural orbital, structures that facilitate the overlap between the two LUMOs

lead to a more pronounced interaction and the occurrence of the state-crossing. According to the topology of the LUMOs of FBC and Q (see Figure 3), the overlap between those decreases at $\theta = 90^\circ$. Consequently, there is no crossing between the two PECs for $\theta = 90^\circ$ (see Figure 2, bottom). A similar situation can be expected for perpendicular and other intermediate molecular arrangements; therefore, they were not taken into consideration.

On the contrary, the PECs do intersect at the other two orientations. The most effective interaction occurs at $\theta = 45^\circ$, which hints to a larger overlap between the respective LUMOs. For this reason, when the two moieties get progressively closer, the crossing between the two curves appears earlier at $\theta = 45^\circ$, at about 4 \AA , with respect to $\theta = 0^\circ$, at about 3.3 \AA , reflecting in the latter a somewhat less efficient interaction. Therefore, it is expected that the ET process becomes most efficient at $\theta = 45^\circ$, associated with a relatively higher rate constant.¹⁹ The

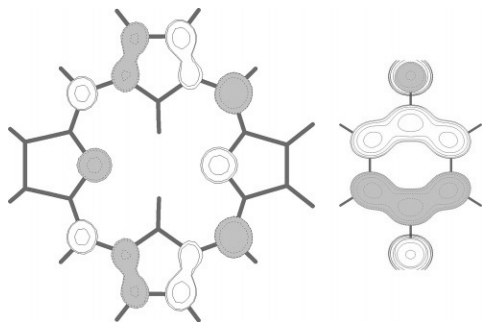


Figure 3. LUMOs of FBC (left) and Q (right).

actual crossing point should hopefully correspond to a CI and its geometry most probably should display for the FBC skeleton a distortion from planarity. This suggestion is inspired by the well-known effects that nonplanarity causes on the lifetimes of singlet excited states in porphyrin derivatives⁸ and DNA nucleobases.^{28–31} The lifetimes can be considerably shortened (from nanoseconds to picoseconds) in nonplanar chromophores because of the presence of many different decay paths and funnels connecting the excited and ground states.^{30,31,56} Corroboration of this hypothesis represents by itself a formidable objective and should be addressed in the future with the necessary expected software and hardware improvements. We can just remark at present that such crossings do exist in regions where the degeneracy of electronic states is found in multidimensional systems,⁵⁶ reinforcing previous suggestions by Dreuw et al.¹⁷ on the important role that crossing seams play in the ultrafast ET processes occurring ubiquitously in many biochemical systems of current interest. Curves in Figure 2 should not be seen, however, as a representation of the ultrafast ET mechanism in RC but demonstrate that the involvement of CIs in the ET process is possible for certain donor–acceptor orientations.

At $\theta = 45^\circ$ the minima $(FBC^- + Q)_\text{min}$ and $(FBC + Q^-)_\text{min}$ are found at about $R = 3 \text{ \AA}$. The latter is placed vertically about 0.3 eV above the former, with a computed oscillator strength for the related transition of 0.03. It is worth mentioning that the basis set superposition error (BSSE) computed using the counterpoise procedure⁵⁷ was shown not to affect the vertical relative energies at given intermolecular distances, because the magnitude of the correction is the same for both states. At short intermolecular distances the $FBC^- + Q$ system becomes the ground state, which is connected adiabatically to $FBC + Q^-$ at infinity. Depending on the topology of the actual CI, both minima may be populated. Ideally, such topology should be favoring population of the charge-transfer state $(FBC + Q^-)$. A number of crossing and recrossings probably occur around the CI region leading to the fulfillment of ET. By a subsequent increase of the intermolecular distance the products of the ET reaction, neutral FBC and reduced quinone Q^- , are ultimately collected. The primary reduced quinone is so ready to transfer an electron to the secondary quinone and Pheo (FBC in our model) is willing to be involved again in new photoinduced charge-transfer process in the RCs.

4. Conclusions

Delineation of the mechanism of electron transfer from a reduced pheophytin-like system to a quinone-like molecule, with special emphasis on the role of the quinone movement during

the process, has been the major aim of the present research. Because of the inherent difficulties in the theoretical determination of electron affinities, high-level *ab initio* methodologies, CASSCF and CASPT2, have been applied. As far as we know, it is the first time that this kind of research has been undertaken. Therefore, the present findings can be used as reference results to be compared to less demanding theoretical approaches that could undertake, however, models of larger molecular size.

In summary, we conclude that intermolecular ET between a reduced (charged) donor and an acceptor can be formulated as a dance of three steps. First, both systems have to get close enough, with the right relative orientation, to allow overlap between the singly occupied MO of the donor and the LUMO of the acceptor. Second, a number of state-crossings related to multiple conical intersections may then take place, resembling the common procedure of internal conversion controlled by crossing seams, as is normally recognized in modern nonadiabatic photochemistry. Third, a subsequent separation of the produced moieties leads to the products: neutral donor and reduced acceptor.

A vast amount of the work involving synthesis of biomimetic materials for artificial photosynthesis deals with molecules made of covalently linked subunits. According to the present results, noncovalently π -stacked materials should also operate efficiently. It is not surprising, since they are used by nature.

Acknowledgment. The research reported has been supported by the MEC-FEDER project CTQ2004-01739 and by project GV06-192 of the Generalitat Valenciana. G.O.G. gratefully acknowledges a Ph.D. (FPU) fellowship from the Spanish MEC.

Supporting Information Available: Cartesian coordinates for the optimized structures and CASSCF profiles (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Allen, J. P.; Williams, J. C. *FEBS Lett.* **1998**, *438*, 5.
- Govindjee; Foyer, C. H. *Photosynth. Res.* **2005**, *85*, 251.
- Whitmarsh, J.; Govindjee. In *Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis*; Singhal, G. S.; Renger, G.; Irrgang, K. D.; Sopory, S.; Govindjee, Eds.; Kluwer: Pittsburgh, 1999.
- Dekker, J. P.; van Grondelle, R. *Photochem. Phys. Chem.* **2000**, *63*, 195.
- Zou, A.; Witt, H. T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W.; Orth, P. *Nature* **2001**, *409*, 739.
- McDonald, M. S. *Photobiology of higher plants*; John Wiley & Sons: Chichester, UK, 2003.
- Ferreira, K. N.; Iverson, T. M.; Maghlaoui, K.; Barber, J.; Iwata, S. *Science* **2004**, *303*, 1831.
- Fajer, J. *Photosynth. Res.* **2004**, *80*, 165.
- Levanon, H.; Möbius, K. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Strat.* **1997**, *26*, 495.
- Hasegawa, J.; Ozeki, Y.; Ohkawa, K.; Hada, M.; Nakatsuji, H. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1320.
- Blomberg, M. R. A.; Siegbahn, P. E. M.; Babcock, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8812.
- Siegbahn, P. E. M.; Crabtree, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 117.
- Sundholm, D. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *302*, 480.
- Parusel, A. B. J.; Grimme, S. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 5395.
- Sundström, V. *Prog. Quantum Electron.* **2000**, *24*, 187.
- Worth, G. A.; Cederbaum, L. S. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *338*, 219.
- Dreuw, A.; Worth, G. A.; Cederbaum, L. S.; Head-Gordon, M. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19049.
- Siegbahn, P. E. M.; Blomberg, M. R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1655*, 45.
- Barbara, P. F.; Meyer, T. J.; Ratner, A. M. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13148.
- Marcus, R. A. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1964**, *15*, 155.
- Blancafort, L.; Jolibois, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 722.

- (22) *Conical Intersections: Electronic Structure, Dynamics and Spectroscopy*; Domcke, W., Yarkony, D. R., Köppel, H., Eds.; World Scientific: Singapore, 2004.
- (23) Computational Photochemistry. In *Theoretical and Computational Chemistry*; Olivucci, M., Ed.; Elsevier Publishing: Amsterdam, 2005; Vol. 16.
- (24) Fernández, E.; Blancafort, L.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7528.
- (25) Jolibois, F.; Bearpark, M. J.; Klein, S.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5801.
- (26) Sinicropi, A.; Pischel, U.; Basosi, R.; Nau, W. M.; Olivucci, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4582.
- (27) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104107.
- (28) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8108.
- (29) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1820.
- (30) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691.
- (31) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chem.—Eur. J.* **2006**, *12*, 6559.
- (32) González-Luque, R.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Merchán, M.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9379.
- (33) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Rubio, M.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *295*, 195.
- (34) Pou-Américo, R.; Merchán, M.; Ortí, E. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 9536.
- (35) Pou-Américo, R.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Ortí, E.; Forsberg, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6067.
- (36) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; Schleyer, P. (v) R., et al., Eds.; Wiley: Chichester, UK, 2004.
- (37) Frutos, L. M.; Castaño, O.; Merchán, M. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 5472.
- (38) Rubio, M.; Merchán, M.; Ortí, E.; Roos, B. O. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14980.
- (39) Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
- (40) Roos, B. O.; Fülcher, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219.
- (41) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Fülcher, M. P.; Roos, B. O. In *Recent Advances in Multireference Methods*; Hirao, K., Ed.; World Scientific Publishing: Singapore, 1999.
- (42) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *729*, 99.
- (43) Forsberg, J.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196.
- (44) Malmqvist, P.-Å. *Int. J. Quantum Chem.* **1986**, *30*, 479.
- (45) Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 189.
- (46) Rubio, M.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 7202.
- (47) Almöf, J.; Fischer, T. H.; Gassman, P. G.; Ghosh, A.; Häser, M. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10964.
- (48) Pierloot, K.; Dumez, B.; Widmark, P.-O.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta* **1995**, *90*, 87.
- (49) Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülcher, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmelpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Stålring, J.; Thorsteinsson, T.; Veyazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.0; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, 2004.
- (50) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A., Jr.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adamo, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; González, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andrés, J. L.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. *Gaussian 98*, revision A.6; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, 1998.
- (51) Gouterman, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139.
- (52) Gouterman, M.; Wagnière, G.; Snyder, L. C.; *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, *11*, 108.
- (53) Weiss, C.; Kobayashi, H.; Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1965**, *16*, 415.
- (54) Garavelli, M.; Bernardi, F.; Cembran, A.; Castaño, O.; Frutos, L. M.; Merchán, M.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13770.
- (55) Gwaltney, S. R.; Bartlett, R. J. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 6790.
- (56) Truhlar, D. G.; Mead, C. A. *Phys. Rev. A* **2003**, *68*, 032501.
- (57) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65.

**"Toward the Understanding of DNA Fluorescence: The Singlet
Excimer of Cytosine".**

**G. Olaso-González, D. Roca-Sanjuán, L. Serrano-Andrés, and M.
Merchán.**

Journal of Chemical Physics, 125, 231102-1-4 (2006)

Toward the understanding of DNA fluorescence: The singlet excimer of cytosine

Gloria Olaso-González, Daniel Roca-Sanjuán,
Luis Serrano-Andrés, and Manuela Merchán^{a)}

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

(Received 16 October 2006; accepted 16 November 2006; published online 18 December 2006)

By using the multiconfigurational second-order perturbation method CASPT2, including corrections for the basis set superposition error, the lowest-singlet excited state of the face-to-face π -stacked cytosine homodimer is revealed to be bound by about half an eV, being the source of an emissive feature consistent with the observed redshifted fluorescence. © 2006 American Institute of Physics.
[DOI: 10.1063/1.2408411]

Determination of the photophysical and photochemical attributes of nucleic acid bases and related biopolymers has been, and remains, a subject of active research.^{1–4} Quest of the underlying mechanisms implied in the photoinduced damage to biological material has most probably been one of the major motivations for the outstanding development seen in this area, which may have a great impact in the development of new biotechnologies.⁵

One intriguing aspect of ultraviolet (UV)-irradiated DNA is the appearance of redshifted long-lived emissive states not found in base monomers.^{6,7} Whereas the DNA absorption spectra closely resembles that of the building-blocks monomers, apart from the well-documented increase of intensity (hypochromism), the fluorescence spectra of DNA and the constituent nucleotides are qualitatively different.⁸ Interestingly, the redshifted fluorescence is observed for both the single- and double-stranded forms of polynucleotides. It is normally denoted in the literature as *excimer fluorescence*, a term first proposed by Eisinger *et al.*,⁶ reflecting the relevant role assumed to be played by the corresponding excited dimer (excimer) of the biopolymer. The assignment of the excimer origin of the redshifted fluorescence rests indeed upon the similarity between the emission from polynucleotides and dinucleotides.

The recent time- and wavelength-resolved fluorescence study on different oligonucleotides reported by Plessow *et al.*⁷ using 80 picoseconds (ps) excitation pulses makes readily apparent the longer-decay components and redshifted emission that it was assumed to arise from excimer formation. In particular, for the cytosine (C) oligonucleotide 15-mer d(C)₁₅ a decay component of several nanoseconds (ns) is clearly observed as compared to the less intense feature of the dimer d(C)₂, and to the mononucleotide CMP, the latter showing a short instrument-limited decay. Because of the slow rate of energy relaxation, these long-lived states associated to excimer-like states have been suggested as the precursors of the DNA photolesions, including photodimers.^{3,9} On the other hand, Crespo-Hernández *et al.*¹⁰ have recently

shown by using femtosecond transient absorption spectroscopy that excimers are formed in high yields in a variety of synthetic DNA oligonucleotides and conclude that excited-state dynamics of A·T DNA is controlled by base stacking.

Despite the existence of excimer- and exciplex-like excited states of nucleobases being invoked widely in experimental literature, as far as we know there is no *ab initio* study supporting it. In this scenario, the performance of accurate (predictive) quantum-chemical computations on the excimers of nucleobases seems timely. We address in this communication the study of the C-excimer in vacuo by using a well-established quantum-chemical *ab initio* method, namely the complete active space self-consistent-field second-order perturbation theory (CASPT2)^{11–13} as implemented in the MOLCAS 6.0 software,¹⁴ in conjunction with extended one-electron basis sets.

As a first step toward the characterization of the low-lying singlet excimers of cytosine, the potential energy curves (PECs) with respect to the intermolecular separation (R) of two cytosine molecules kept at the ground-state equilibrium geometry (see Fig. 1) have been built at the CASPT2 level. Unless otherwise stated the one-electron basis set of atomic natural orbital (ANO) type with the primitive set C, N, O(10s6p3d)/H(7s3p), the ANO-S set,¹⁵ contracted to C, N, O[3s2p1d]/H[2s1p] was used (hereafter basis set A).

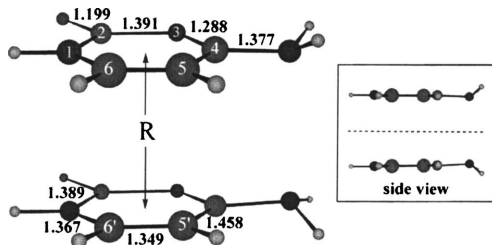


FIG. 1. Labeling for the cytosine dimer. Bond distances (in Å) correspond to the ground-state equilibrium geometry of the monomer computed at the CASSCF(8,7)/ANO-S C, N, O[3s2p1d]/H[2s1p] level. The homodimer system displays C_s symmetry, being the mirror symmetry plane represented by a dashed line in the side-view inset.

^{a)} Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: Manuela.Merchan@uv.es

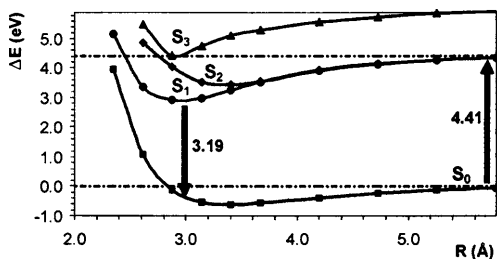


FIG. 2. CASPT2(12,12)/ANO-S C,N,O[3,2p,d]/H[2s1p] potential energy curves built with respect to the intermolecular distance $R(C5-C5')$ of two face-to-face π -stacked cytosine molecules.

The optimized structure for ground-state cytosine was determined at the complete active space self-consistent field (CASSCF) level, employing basis set A. The active space comprised eight active π electrons distributed among seven molecular π orbitals (MOs), denoted as CASSCF(8,7). It corresponds to the full π system, except for the deep π MO localized mainly on the nitrogen atom of the NH_2 fragment, which was treated as inactive. The choice is sustained by the fact that when the $\pi-NH_2$ MO is allowed to become active, the occupation number of the corresponding CASSCF natural orbital (NO) is close to 2.0. In order to mimic the actual interaction of pyrimidines in DNA in the biologically relevant *cis-syn* stereoisomer, the face-to-face arrangement of the C-dimer was considered.

Although the homodimer displays spatial C_s symmetry, the PECs with respect to R were computed with no symmetry restrictions (C_1 symmetry), since wave function symmetry breaking is a prerequisite to describe correctly the asymptotic limit for the lowest singlet electronic transition of the two moieties.¹⁶ For the computations of the dimer, two additional π MOs were also kept inactive, since the occupation number of the corresponding natural orbitals when they were treated as active was practically 2.0. They correspond to the all-in-phase MOs in each cytosine. The dimer was, therefore, described initially by the CASSCF(12,12) wave function, employing four roots in the averaging procedure. On the other hand, the corresponding results including the second-order corrections shall be labeled as CASPT2(12,12). In order to minimize weakly interacting intruder states, the imaginary level-shift technique, with $IMAG=0.2$ a.u.,¹⁷ was turned on.

The PEC for the ground state is repulsive at the closed-shell Hartree-Fock and at the CASSCF(12,12) level. Similarly, at the semiempirical level, employing the AM1 parameterization,⁹ no stable excimer was found if the two molecules were constrained to be parallel, leading to a small binding energy (3 kcal/mol) upon geometry optimization. The lowest singlet excited state becomes weakly bound at the CASSCF(12,12) level. In contrast, as can be seen in Fig. 2, the CASPT2(12,12) PECs for the ground state (S_0) and the three lowest singlet excited states (S_1 , S_2 , and S_3) have well-defined minima with binding energies of a few tenths of an eV. In the PECs we have chosen to monitor the intermolecular distance $R(C5-C5')$, which is particularly relevant in the

formation of cyclobutane photodimers. In Fig. 2, energies are referred to two ground-state cytosine molecules separated about 20 a.u. In the asymptotic limit S_1 and S_2 become degenerate. They are related to the equivalent situations $C+C^*$ and C^*+C , where C and C^* represent the ground-state cytosine and its lowest singlet excited state, respectively.

Thus, the absorption $S_0 \rightarrow S_1$ calculated at 20 a.u., corresponds to the monomer absorption. It is here computed at 4.41 eV in agreement with previous findings and experimental evidence.^{18–20} The value becomes about half an eV too low if computed in C_s symmetry because localization of the electronic excitation in one monomer is not permitted by symmetry constraints. However, at short intermolecular distances the CASSCF(12,12) wave functions are completely delocalized over the two moieties and the S_1 and S_2 states correlate nicely with the wave functions $1^1A''$ and $2^1A'$ of C_s symmetry, respectively. Therefore, S_1 is described mainly by intermonomer charge-transfer one-electron promotions and S_2 by simultaneous singly excited intra-monomer configurations with leading weights 69% (S_1) and 40% (S_2). Since S_3 is related to a higher excited state of the monomer it shall not be discussed further. On the other hand, the vertical emission from the $(S_1)_{min}$ structure is calculated at 3.19 eV. The agreement with the fluorescence maximum observed in aqueous solution for the dimer $d(C)_2$ and the 15-mer $d(C)_{15}$ ($\lambda_{max}=385$ nm; 3.22 eV),⁷ considerably redshifted as compared to that of the monomer ($\lambda_{max}=313$ nm; 3.96 eV),¹ is surprising. It is clear that the results might be affected by the basis set superposition error (BSSE) that so far has not been taken into account. In order to analyze in detail these results, the BSSE has been considered for the states of interest (S_0 , S_1 , and S_2) “*a posteriori*” at the minima of the CASPT2(12,12) PECs, as it is a common practice routinely employed in theoretical computations. The relevant spectroscopic results are listed in Table I.

The binding energy (E_b) has been obtained as

$$E_b(S_n) = E_C + E_{C^*} - E_{CC^*}, \quad (1)$$

with E_C , E_{C^*} , and E_{CC^*} being the total energies of C , C^* , and the dimer CC^* , respectively. The BSSE has been corrected by using the counterpoise correction (CP).²¹ Therefore, the CP- E_b is defined as follows:

$$CP-E_b(S_n) = E_C(C^*) + E_{C^*}(C) - E_{CC^*}, \quad (2)$$

where $E_C(C^*)$ and $E_{C^*}(C)$ represent the energy of C in the presence of the ghost orbitals of C^* and the energy of C^* employing also the orbitals of C , respectively, computed at the CC^* structure considered. Conversely, the CP-BSSE for a given state at a fixed geometry can be seen as the difference

$$CP - BSSE(S_n) = E_b(S_n) - (CP - E_b(S_n)). \quad (3)$$

For the ground state, the C^* in these expressions has, of course, to be replaced by C . The energies for $E_C(C^*)$ and $E_{C^*}(C)$ have been obtained at the CASPT2(6,6) level, where the two-roots state-average CASSCF(6,6) reference wave function comprised the equivalent active MOs as in the respective CASSCF(12,12) computation of the dimer.

The CASPT2(12,12) ground-state binding energy is substantial, 0.62 eV, but the system becomes unbound by

TABLE I. Binding energy (E_b), basis set superposition error (BSSE) obtained through the counterpoise method (CP-BSSE), and the corrected binding energy (CP- E_b), computed at the CASPT2(12,12)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level at the PECs minima of ground and lowest singlet excited states of the cytosine dimer represented in Fig. 1. Distances in Å and energies in eV.

State	R(C5–C5')	E_b	CP-BSSE	CP- E_b
S_0	3.416	At the (S_0) _{min} structure		
		0.62	0.77	-0.15
S_1^a	2.954	At the (S_1) _{min} structure		
		1.51	0.97	0.54
S_0	2.954	At the (S_2) _{min} structure		
		0.29	0.97	-0.68
S_2	3.376	0.99	0.74	0.25

^aThe CASPT2(12,12) vertical emission (fluorescence) including the CP-BSSE correction leads to 3.19 eV, as the result of (4.41 eV–0.54 eV–0.68 eV).

–0.15 eV when the BSSE is included, that is, the ground-state dimer at 3.416 Å is 0.15 eV above the sum of two ground-state monomers. The CP-BSSE corrections seem to be large. However, as discussed below, it is just an indication of the diffuseness of the basis set employed, flexibility which is required to treat successfully the excited states of the monomer and the dimer. Table II, which compiles the results for the ground state at the SCFP2 level (equivalent to MP2 but with IMAG=0.2 a.u.), dramatically makes this point. First, as expected, the CP- E_b at the CASPT2(12,12) and SCFP2 levels employing basis set A are similar, –0.15 and –0.12 eV, respectively. A similar result, –0.11 eV, is also obtained using the same contraction scheme with the larger primitive set implied in the ANO-L type.²² The SCFP2 convergence on CP- E_b is certainly slow. A comparable pattern has been recently reported at the CASPT2 level for the benzene dimer.²³ With the larger basis set (H) the dimer interac-

TABLE II. Convergence pattern with respect to the increase of the one-electron basis set for the binding energy (E_b), basis set superposition error (BSSE) obtained through the counterpoise method (CP-BSSE), and the corrected binding energy (CP- E_b) computed at the SCFP2 level for the ground state (S_0) of the cytosine dimer at the intermolecular distance R(C5–C5') = 3.416 Å. Energies are given in eV.

Basis set	N ^a	E_b	CP-BSSE	CP- E_b
Generally contracted ANO-S-type scheme ^b				
A: C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]	274(848)	0.64	0.76	-0.12
Generally contracted ANO-L-type scheme ^c				
B: C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]	274(1176)	0.67	0.78	-0.11
C: C,N,O[4s3p2d]/H[2s1p]	418(1176)	0.41	0.47	-0.06
D: C,N,O[4s3p2d]/H[3s2p]	458(1176)	0.42	0.47	-0.05
E: C,N,O[5s4p2d]/H[2s1p]	482(1176)	0.30	0.36	-0.06
F: C,N,O[5s4p2d]/H[3s2p]	522(1176)	0.30	0.35	-0.05
G: C,N,O[5s4p2d1f]/H[2s1p]	594(1512)	0.21	0.26	-0.05
H: C,N,O[4s3p2d1f]/H[3s2p1d]	620(1662)	0.35	0.39	-0.04
Additional ANO-L contractions checked ^d				
I: C,N,O[4s3p1d]/H[2s1p]	338(1176)	0.34	0.44	-0.10
J: C,N,O[5s4p1d]/H[2s1p]	402(1176)	0.17	0.27	-0.10
K: C,N,O[6s5p1d]/H[2s1p]	466(1176)	0.12	0.21	-0.09
For comparison, a segmented basis set ^d				
L: cc-pVDZ[3s2p1d/2s1p]	274(486)	0.05	0.20	-0.15

^aNumber of basis functions (number of primitives).

^bPrimitive set: C,N,O(10s6p3d)/H(7s3p) (Ref. 15).

^cPrimitive set: C,N,O(14s9p4d3f)/H(8s4p3d) (Ref. 22).

^dPrimitive set: C,N,O(9s4p1d)/H(4s1p) (Ref. 25).

tion is repulsive by 0.04 eV (0.94 kcal/mol), consistent with previous findings for an equivalent structure (2.45 kcal/mol).²⁴ By inspection of Table II one can conclude that the CP- E_b result using basis set B is too repulsive, by 0.07 eV, as compared to that obtained with basis set H. Since an analogous performance can be presumed for the excited states as regards the influence of the basis set, we expect the computed CP- E_b to be accurate within ± 0.1 eV. On the other hand, the segmented basis set L, much less diffuse but of comparable quality to basis set A, yields a similar corrected result, –0.15 eV, even if the E_b and CP-BSSE values are totally different with respect to the ANOs results.

We conclude that at the highest level of theory, with inclusion of the BSSE, both S_1 and S_2 are bound (cf. Table I). According to their nature, the S_2 state displays a minimum at a larger R(C5–C5') distance than that computed for S_1 . Because of the cancellation of BSSE corrections, the vertical emission remains like the direct CASPT2(12,12) result once that the BSSE has been taken into account. For this reason, and since the basis set A already bears enough flexibility to describe the excited states, further improvement of the basis set does not significantly change the computed vertical emission (0.04 eV with the basis set I). One question still remains: Would inclusion of the BSSE change the equilibrium intermolecular distance? In order to answer to this question, the PECs have been recalculated including the BSSE. The results are depicted in Fig. 3, which represents our best esti-

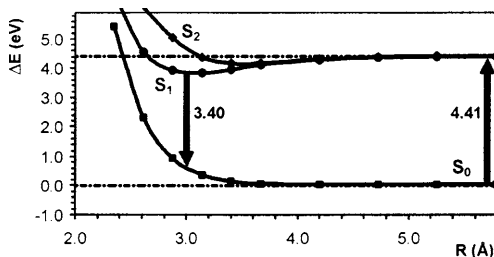


FIG. 3. BSSE-CASPT2(12,12)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] potential energy curves built with respect to the intermolecular distance R(C5–C5') of two face-to-face π -stacked cytosine molecules.

mate for the cytosine dimer. The minimum for S_1 is obtained at $R(C5-C5')=3.076 \text{ \AA}$, with a vertical emission of 3.40 eV, and a binding energy $CP-E_b$ of 0.58 eV. Thus, our best estimate has a difference of 0.18 eV with respect to the emission maximum datum recorded recently.⁷ It is worth recalling that the computed vertical transition does not have experimental counterpart, and for a truly correct comparison with experiment, vibrational resolution of the band should be computed in order to determine the band maximum. In this respect, the calculated CASPT2(12,12) result for the vertical emission without (3.19 eV) and with inclusion of the BSSE (3.40 eV) are equally reasonable as compared to the available experimental data for dinucleotides, polynucleotides, and DNA (3.2–3.4 eV).^{6,7}

In summary, the main prediction of the present research is the existence of cytosine excimers, which can be regarded as an intrinsic property of the C-dimer. The computed vertical emission supports the excimer origin of the redshifted fluorescence observed in cytosine oligonucleotides.^{6,7} Parallel work involving the remaining DNA/RNA nucleobases is currently addressed in our group.

The research reported in this communication has been supported by projects MEC-FEDER CTQ2004-01739 and Generalitat Valenciana GV06-192. G.O.G. and D.R.S. thank MEC-FPU grants.

¹P. R. Callis, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **34**, 329 (1983).

²J. Cadet and P. Vigny, in *Bioorganic Photochemistry*, edited by H. Morison (Wiley, New York, 1990).

³C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler, *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* **104**, 1977 (2004).

⁴L. Serrano-Andrés, M. Merchán, and A. C. Borin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 8691 (2006).

⁵P. N. Prasad, *Introduction to Biophotonics* (Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2003).

⁶J. Eisinger, M. Guéron, R. G. Shulman, and T. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 1015 (1966).

⁷R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer, and K. Kohse-Höinghaus, *J. Phys. Chem. B* **104**, 3695 (2000).

⁸J. Eisinger and R. G. Shulman, *Science* **161**, 1311 (1968).

⁹V. I. Danilov, O. N. Slyusarchuk, J. L. Alderfer, J. J. P. Stewart, and P. R. Callis, *Photochem. Photobiol.* **59**, 125 (1994).

¹⁰C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, and B. Kohler, *Nature (London)* **436**, 1141 (2005).

¹¹K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, and B. O. Roos, *J. Chem. Phys.* **96**, 1218 (1992).

¹²B. O. Roos, M. P. Fülcher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, and M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* **93**, 219 (1996).

¹³M. Merchán and L. Serrano-Andrés, in *Computational Photochemistry*, edited by M. Olivucci (Elsevier, Amsterdam, 2005).

¹⁴K. Andersson, M. Barysz, A. Bernhardsson *et al.*, MOLCAS, version 6.0, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund, Lund, Sweden, 2004.

¹⁵K. Pierloot, B. Dumez, P.-O. Widmark, and B. O. Roos, *Theor. Chim. Acta* **90**, 87 (1995).

¹⁶M. Merchán, R. Pou-Amérigo, and B. O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* **252**, 405 (1996).

¹⁷N. Forsberg and P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* **274**, 196 (1997).

¹⁸M. Merchán and L. Serrano-Andrés, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8108 (2003).

¹⁹M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. A. Robb, and L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1820 (2005).

²⁰M. P. Fülcher and B. O. Roos, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2089 (1995).

²¹S. F. Boys and F. Bernardi, *Mol. Phys.* **100**, 65 (2002).

²²P.-O. Widmark, P.-A. Malmqvist, and B. O. Roos, *Theor. Chim. Acta* **77**, 291 (1990).

²³T. Rocha-Rinza, L. De Vico, V. Veryazov, and B. O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* **426**, 268 (2006).

²⁴P. Jurecka, J. Sýponer, and P. Hobza, *J. Phys. Chem. B* **108**, 5466 (2004).

²⁵T. H. Dunning, Jr., *J. Chem. Phys.* **90**, 1007 (1989).

**"Molecular Basis of DNA Photodimerization: Intrinsic
Production of Cyclobutane Cytosine Dimers".**

**D. Roca-Sanjuán, G. Olaso-González, I. González-Ramírez, L.
Serrano-Andrés, and M. Merchán**

Journal of the American Chemical Society. 130, 10768-10779 (2008)

Molecular Basis of DNA Photodimerization: Intrinsic Production of Cyclobutane Cytosine Dimers

Daniel Roca-Sanjuán, Gloria Olaso-González, Israel González-Ramírez, Luis Serrano-Andrés, and Manuela Merchán*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received April 25, 2008; E-mail: Manuela.Merchan@uv.es

Abstract: Based on CASPT2 results, the present contribution establishes for the first time that cytosine photodimer formation ($C \leftrightarrow C$) is mediated along the triplet and singlet manifold by a singlet–triplet crossing, $(T_1/S_0)_X$, and by a conical intersection, $(S_1/S_0)_{CI}$, respectively. The former can be accessed in a barrierless way from a great variety of photochemical avenues and exhibits a covalent single bond between the ethene C_6-C_6' carbon atoms of each monomer. The efficiency of the stepwise triplet mechanism, however, would be modulated by the effectiveness of the intersystem crossing mechanism. The results provide the grounds for the understanding of the potential photogenotoxicity of endogenous and exogenous compounds via triplet–triplet sensitization, with a lower bound for cytosine oligonucleotides predicted to be 2.70 eV, and give support to the traditional view of the primary role of triplet excited states in the photochemistry of DNA, a well-known source of photoproducts in solution under triplet photosensitization conditions. The function played by singlet excimers (excited dimers) to explain both the red-shifted fluorescence and photoreaction is highlighted. A rationale on the pronounced wavelength dependence of the observed fluorescence is offered. Geometrical arrangements at the time of light irradiation close to, but energetically above, $(S_1/S_0)_{CI}$ are suggested as *reactive orientations* that become prone to produce $C \leftrightarrow C$ directly, with no energy barrier. Because of the outstanding intrinsic ability of cytosine to form stable relaxed excimers, the system located near the bound relaxed excimer has to accumulate enough vibrational energy to surmount a small barrier of 0.2 eV to reach $(S_1/S_0)_{CI}$, making the overall process to proceed at a slower relative rate as compared to other compounds such as thymine, which is not susceptible of forming so stable excimers.

Introduction

Cyclobutane pyrimidine dimers (Pyr \leftrightarrow Pyr) formed by adjacent pyrimidine bases can be considered the most frequent lesion induced in ultraviolet (UV)-irradiated *cellular* DNA, occurring with a yield of formation 1 order of magnitude larger than pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts.^{1,2} Living organisms are able to reverse the photodamage by using DNA photolyase enzymatic repair, which catalyzes the cleavage of the C_5-C_5' and C_6-C_6' bonds of the formed Pyr \leftrightarrow Pyr, restoring the pyrimidines to their native state. The different DNA repair enzymes usually involve electron transfer from a catalytic cofactor to the dimer.³ The Pyr \leftrightarrow Pyr photoproducts are lesions normally associated with various lethal biological responses happening at the cellular level since they inhibit DNA replication and transcription.^{1,4,5} The different mechanisms proposed for Pyr \leftrightarrow Pyr production¹ involve singlet and triplet states of the monomers in solution and singlet states of vertical stacked nucleobases in the solid state, respectively. The efficiency of

the photodimerization markedly depends on the experimental conditions (solvent, aggregation state, pH, degree of hydration), the sequence of nucleotides, and the type (A-, B-like) of DNA conformation. It is also worth mentioning the vast amount of literature where the presence of Pyr \leftrightarrow Pyr photoproducts was detected.^{1,6–10} It is, however, surprising that despite the importance of the matter just two recent high-level *ab initio* studies are available on this issue.^{11,12} Those communications have independently suggested that the [2 + 2] cycloaddition photoreaction¹³ for thymine (T) dimerization occurs via a barrierless concerted nonadiabatic mechanism on a singlet excited-state through a S_1/S_0 conical intersection (CI), which is the funnel for ultrafast nonradiative decay leading to $T \leftrightarrow T$.^{11,12}

- (1) Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioorganic Photochemistry*; Morrison, H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1990; Vol. 1, pp 1–272.
- (2) Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495–2501.
- (3) Heelis, P. F.; Hartman, R. F.; Rose, S. D. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 289–297.
- (4) Danilov, V. I.; Slyusarchuk, O. N.; Alderfer, J. L.; Stewart, J. J. P.; Callis, P. R. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 125–129.
- (5) Kraemer, K. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11–14.

- (6) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977–2019.
- (7) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B. *Nature* **2005**, *436*, 1141–1144.
- (8) Marguet, S.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5780–5781.
- (9) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625–629.
- (10) Holman, M. R.; Ito, T.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6–7.
- (11) Boggio-Pasqua, M.; Groenhof, G.; Schäfer, L. V.; Grubmüller, H.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10996–10997.
- (12) Blancafort, L.; Migani, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14540–14541.
- (13) Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*; VCH Publishers: New York, 1995.

The major photoproduct induced in DNA by UV radiation is T<>T, but TT sites are not mutational hotspots.² In contrast, cytosine-cytosine (CC) sequences are sites of relatively frequent CC to TT tandem mutations, although the corresponding photoproducts (C<>C) are produced with relatively lower yields.² As a first step toward elucidating the distinct behavior of CC with respect to TT sites, we focus in this contribution on the characterization on theoretical grounds of the intrinsic mechanisms responsible for the production of cyclobutane cytosine (CBC) along both the triplet and singlet manifolds.

The nature of electronic excited states in base multimers depends on conformation and base sequence.^{6–10,14–16} The electronic coupling between closely spaced bases is responsible for the distinct spectroscopic features such as the well-known hypochromism of the lowest-energy absorption band and the decrease of the ionization potential.^{6,15} The coupling is not large enough, however, to affect significantly the absorption spectra of biopolymers. Thus, the DNA absorption spectrum closely resembles the sum of the spectra of its building blocks. For this reason, it is generally assumed that, when DNA is illuminated by UV radiation, light is initially absorbed by the nucleic acid bases leading mainly to excited states of the same multiplicity (singlet) as the respective ground state. The low-lying excited states of DNA bases that can be accessed by UV absorption lie near 5 eV.^{6,15} Thanks to the great efforts of several groups during the last decades, together with the outstanding development of novel spectroscopic techniques seen more recently, it is well established by now the extremely short lifetimes, in the subpicosecond regime, of singlet excited states of nucleotides, nucleosides, and isolated purine and pyrimidine bases, suggesting the presence of fully operative ultrafast internal conversion (IC) channels.^{6,9,14,17} Accordingly, the fluorescence quantum yields measured for these systems are small.¹⁸ In the meantime, as a nice example of constructive interplay between quantum chemistry and experimental outcome, computational evidence has been able to successfully identify specific radiationless decay mechanisms in isolated DNA bases,^{19–43} involving energetically accessible regions of so-called conical inter-

sections (CIs) between the lowest excited and the ground state, which are essentially responsible for efficient internal conversion (IC).^{13,44,45} These favorable IC processes represent a self-protection mechanism preventing the occurrence of chemical reactions induced by UV light. Photostability is therefore the primordial photophysical characteristic of the building blocks of DNA (as well as of their Watson–Crick canonical pairs⁴⁶), a concomitant DNA property, crucial to understanding life on earth as we know it, that has probably evolved as the most optimal biochemical response of genetic material to sunlight exposure.

The fluorescence spectra of multimers are qualitatively different from that of the constituent nucleotides. The most striking photophysical attribute of base polynucleotides and DNA is the appearance of long-lived emissive states not found in base monomers. The red-shifted emission seen in base multimers was first termed *excimer fluorescence* by Eisinger et al.,¹⁶ and it is observed for both the single- and double-stranded forms of polynucleotides. Eight years ago, Plessow et al.,⁴⁷ employing a novel picosecond laser approach, reported time- and wavelength-resolved fluorescence of different oligonucleotides and were able to make readily apparent the longer-decay components of the emission, that are assumed to have arisen from excimer formation. In this respect, we have recently reported that formation of bound cytosine excimers can be regarded as an intrinsic property of the cytosine dimer.⁴⁸ In particular, the computed vertical emission fully supports the excimer origin of the red-shifted fluorescence observed in cytosine-containing oligonucleotides.^{16,47} A recent femtosecond excited-state absorption (fs-ESA) study of Kohler and co-workers⁷ has shown that excimers are formed in high yields in a variety of synthetic DNA oligonucleotides and concludes that excited-state dynamics of A•T DNA is controlled by base stacking. On the other hand, Kwok et al.¹⁴ have subsequently reported the first femtosecond combined time- and wavelength-resolved study on the ultraviolet-excited adenosine and a single-stranded adenine-containing oligonucleotide in aqueous solution,

- (14) Kwok, W.-M.; Ma, C.; Phillips, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11894–11905.
- (15) Eisinger, J.; Shulman, R. G. *Science* **1968**, *161*, 1311–1319.
- (16) Eisinger, J.; Guéron, M.; Shulman, R. G.; Yamane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1966**, *55*, 1015–1020.
- (17) Canuel, C.; Mons, M.; Pluzzi, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I.; Elhanine, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 074316.
- (18) Callis, P. R. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34*, 329–357.
- (19) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8108–8109.
- (20) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1820–1825.
- (21) Merchán, M.; González-Luque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471–26476.
- (22) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6559–6571.
- (23) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691–8696.
- (24) Climent, T.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *441*, 327–331.
- (25) Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7584–7590.
- (26) Kistler, K. A.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2650–2661.
- (27) Marian, C. M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104314.
- (28) Tomic, K.; Tatchen, J.; Marian, C. M. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 8410–8418.
- (29) Marian, C. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1545–1553.
- (30) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6257–6265.
- (31) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13238–13244.
- (32) Ismail, N.; Blancafort, M.; Olivucci, M.; Kohler, B.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6818–6819.
- (33) Blancafort, L.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B.; Robb, M. A. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4431–4436.
- (34) Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 210–219.
- (35) Chen, H.; Li, S. H. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 8443–8446.
- (36) Chen, H.; Li, S. H. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154315.
- (37) Nielsen, S. B.; Solling, T. I. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1276–1281.
- (38) Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalamani, G.; Frisch, M. J.; Barone, V.; Improta, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 607–619.
- (39) Zgierski, M. Z.; Patchkovskii, S.; Lim, E. C. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 081101.
- (40) Zgierski, M. Z.; Patchkovskii, S.; Fujiwara, T.; Lim, E. C. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9384–9387.
- (41) Zgierski, M. Z.; Patchkovskii, S.; Lim, E. C. *Can. J. Chem.* **2007**, *85*, 124–134.
- (42) Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11880–11883.
- (43) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473–2484.
- (44) Olivucci, M., Ed. *Computational Photochemistry*; Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (45) Domcke, W.; Yarkony, D. R.; Köppel, H., Eds. *Conical Intersections*; World Scientific: Singapore, 2004.
- (46) Sobolewski, A. L.; Domcke, W.; Hättig, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 17903–17906.
- (47) Plessow, R.; Brockhinke, A.; Eimer, W.; Kohse-Höinghaus, K. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3695–3704.
- (48) Olaso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 231102.

providing clear evidence for the involvement of excimers in the excited relaxation pathways of adenine nucleotides.

The singlet excimer has been suggested by some authors to be a precursor to photodimerization.^{1,4} In this sense, thymine dimerization has recently been determined by Schreier et al.⁹ to be an ultrafast reaction along the singlet manifold, although no thymine excimers could be recorded earlier.⁷ Therefore, the excited-state dimerization reaction occurs in competition with internal conversion processes to the electronic ground state. The role of triplet states in DNA chemistry, in particular on the formation of Pyr<>Pyr,^{49,50} has been highlighted since it was first suggested by Cadet and co-workers.¹ Despite the fact that triplet formation has a low quantum yield, the longer-lived triplet states are crucial in the photochemistry and photophysics of DNA components, since they induce cyclobutane dimers at the bipyrimidine sites under triplet photosensitization conditions.^{1,50} Another way for triplet state Pyr-formation is also possible. As it has been documented in detail for cytosine,²⁰ uracil,²⁴ and thymine,⁴² the lowest triplet state can be populated along the ultrafast internal conversion by an intersystem crossing (ISC) mechanism. Apparently in contrast, recent time-resolved studies of thymine dimer formation by Marguet and Markovitsi⁸ show that direct excitation of (dT)₂₀ leads to cyclobutane thymine dimers (T<>T) in less than 200 ns with a remarkably absence of any triplet absorption from the transient spectra of the oligonucleotide. It is clear that the origin and mechanisms of both excimer and photodimer formation at the molecular level are controversial and poorly understood.

In this scenario, a model built on the basis of predictive quantum chemical computations seems timely in order to understand the underlying basics at the molecular level of these relevant photoreactions. In particular, theory can shed light on whether excimers can be considered precursors of cyclobutane pyrimidine dimers. For this purpose, a well-established and sound quantum chemical ab initio method, namely the complete-active-space self-consistent-field second-order perturbation theory (CASPT2)^{51–55} as implemented in the MOLCAS 6.0 software,⁵⁶ in conjunction with extended one-electron basis sets, was used.

Methods and Computational Details

The basis set of atomic natural orbital (ANO) type with the primitive set C,N,O(10s6p3d)/H(7s3p), the ANO-S set,⁵⁷ contracted to C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] was used throughout. Geometry optimizations, minimum reaction paths (MEPs), and determination of hypersurface crossings were carried out initially at the CASSCF level. The active space comprises the same π system employed

earlier for ground-state cytosine.¹⁹ It represents in the dimer a total of 16 electrons distributed among 14 molecular orbitals (MOs), that is, all the π system except for the deep π orbital localized on the NH₂ fragment of each cytosine, which was treated as inactive. Dynamic electron correlation was subsequently taken into account perturbatively at the second-order level through the CASPT2 method.⁵¹ In order to mimic the actual interaction of pyrimidines in DNA, geometry optimizations were initially performed within the constraints of the C_s symmetry, thus allowing for an effective and natural interaction of two cytosine molecules in the biologically relevant cis-syn stereoisomer. Seven active MOs in each of the irreducible representation a' and a'' (16 active electrons) were used in C_s symmetry. At the optimized geometries, the energies were computed at the CASPT2 level with no symmetry restrictions (C₁ symmetry), since wave function symmetry breaking is a prerequisite to describe correctly the asymptotic limit for the lowest electronic singlet and triplet transition of the two moieties. It is said that the calculation breaks symmetry when the computed electronic wave function has lower symmetry than that implied by the nuclear coordinates (see, e.g., ref 58). For the computations in C₁ symmetry, two additional π MOs were also kept inactive, since the occupation number of the corresponding natural orbitals when they were treated as active was practically 2.0. They correspond to the plus and minus linear combinations of the deeper all-in-phase π MOs of the two cytosine molecules. A CASSCF wave function of 12 active π electrons and 12 active π MOs was therefore employed, hereafter denoted as CASSCF(12,12). On the other hand, the corresponding results with the second-order corrections included shall be labeled as CASPT2(12,12). For the triplet and singlet states the state-average CASSCF(12,12) reference wave function involved two and four roots, respectively. In order to minimize weakly interacting intruder states, the imaginary level-shift technique with a parameter 0.2 au, has been employed.⁵⁹ MEPs have been built as steepest descendent paths in a procedure⁶⁰ which is based on a modification of the projected constrained optimization (PCO) algorithm of Anglada and Bofill⁶¹ and follows the Müller–Brown approach.⁶² Each step requires the minimization of the potential energy hypersurfaces on a hyperspherical cross section of the explored hypersurface centered on the initial geometry and characterized by a predefined radius. The optimized structure is taken as the center of a new hypersphere of the same radius, and the procedure is iterated until the bottom of the energy surface is reached. Mass-weighted coordinates are used, therefore the MEP coordinate corresponds to the so-called intrinsic reaction coordinate (IRC), measured in au, that is, bohr·amu^{1/2}. The singlet–triplet crossing (T₁/S₀)_X and the conical intersection (S₁/S₀)_{CI} were computed by using the restricted Lagrange multipliers technique as included in the MOLCAS-6.0 package⁵⁶ in which the lowest-energy point was obtained under the restriction of degeneracy between the two considered states.⁶⁰ The CASSCF structure computed for (T₁/S₀)_X represents also a crossing at the CASPT2 level. It does not hold true for (S₁/S₀)_{CI}. Thus, the reported CASPT2 (S₁/S₀)_{CI} conical intersection was obtained by exploring a grid of points along the distortions that involve the smallest values for the CASSCF gradients in the region of the crossing. Additional details on the computational strategy developed will be given in the next section as required.

As shown previously,⁴⁸ the inclusion of the basis set superposition error (BSSE) is crucial to accurately describe the binding energies. Here the effect was taken into account by using the

- (49) Word, P. D.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256–4263.
- (50) Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318–6319.
- (51) Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218–1226.
- (52) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Nebot-Gil, I.; Lindh, R.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 3151–3162.
- (53) Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülcher, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219–331.
- (54) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. In *Computational Photochemistry*; Olivucci, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2005.
- (55) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. In *Encyclopedia of Computational Chemistry*; Schleyer, P. v. R., Schreiner, P. R., Schaefer, H. F., III, Jorgensen, W. L., Thiel, W., Glen, R. C., Eds.; Wiley: Chichester, 2004.
- (56) Andersson, K.; et al. *MOLCAS*, version 6.4; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Center, University of Lund: Lund, Sweden, 2006.
- (57) Pierloot, K.; Dumez, B.; Widmark, P.-O.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta* **1995**, *90*, 87–114.

- (58) Merchán, M.; Pou-AméRigo, R.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 405–414.
- (59) Forsberg, N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196–204.
- (60) De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 1029–1037.
- (61) Anglada, J. M.; Bofill, J. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 992–1003.
- (62) Müller, K.; Brown, L. D. *Theor. Chim. Acta* **1979**, *53*, 75–93.

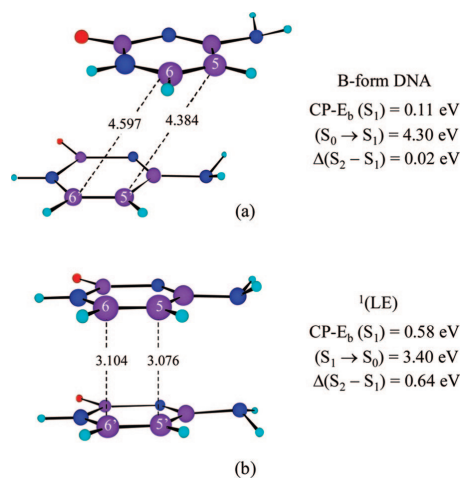


Figure 1. Structures for two cytosine molecules at the ground-state B-form DNA (a) and at the S₁ locally excited state ¹(LE)-type structure in a face-to-face orientation (b) (see text). The computed CASPT2 binding energies for S₁ corrected for the BSSE through the counterpoise correction, CP-E_b, the vertical absorption transition energy (S₀→S₁), the vertical fluorescence (S₁→S₀), together with the splitting for the two lowest excited states, Δ(S₂-S₁), are also included. Interatomic distances in Å.

counterpoise correction (CP).⁶³ The binding energy and the corrected counterpoise binding energy will be denoted E_b and CP-E_b, respectively (see Supporting Information).

All the computations have been carried out by using the MOLCAS 6.0 quantum-chemical software.⁵⁶

Results and Discussion

Singlet and Triplet Cytosine Excimers. Figure 1 shows two cytosine molecules in the ground-state B-type DNA conformation⁶⁴ and the structure for the locally excited-state relative minimum on S₁, hereafter ¹(LE), computed at the CASPT2 level with respect to the intermolecular distance in the face-to-face π-stacked arrangement of the two moieties, maintaining the monomers at the optimized ground-state CASSCF(8,7) geometry.⁴⁸

As can be readily seen from the molecular drawings, the ground-state stacking in the B-form is somewhat different from the idealized “sandwich” geometry required for producing a fully stabilized “excimer”.⁶⁵ In the ground-state B-form DNA, the interatomic distances R(C₅-C₅) and R(C₆-C₆) are about 1.5 and 1.3 Å larger than those in ¹(LE), whereas the dihedral angle ∠C₅-C₆-C₆-C₅ varies from 0° in ¹(LE) to 38.6° in B-DNA. *The lowest singlet excited-state in the parallel excimer ¹(LE) is 0.47 eV more stable than in the B-form.* Accordingly, the binding energy (CP-E_b) for the former, ¹(LE), increases considerably, about half an eV, with respect to the B-form. In the B-form the vertical S₁ state is weakly bound, just by 0.11 eV, whereas the S₂-S₁ splitting is small, reflecting a weak coupling between the states. As expected, the vertical transitions, 4.30 eV (S₁) and 4.32 eV (S₂), are slightly red-shifted as compared to the lowest vertical singlet-singlet transition of the cytosine monomer. At the same level of theory, the ground-state CP-E_b in the

B-form is computed to be 0.04 eV, whereas it is found -0.43 eV at the ¹(LE)-geometry. In fact, the potential energy curve with respect to the intermolecular distance of two cytosine molecules in the face-to-face orientation has been shown for the ground-state to be repulsive.⁴⁸ The vertical emission, calculated at the ¹(LE) structure, 3.40 eV, is consistent with the maximum of the red-shifted fluorescence observed for dinucleotides, polynucleotides, and DNA (3.2–3.4 eV).^{16,47} On the other hand, the pronounced S₂-S₁ gap for ¹(LE), 0.64 eV, points out to an efficient coupling between the two states. Although at the ¹(LE) geometry the S₂ becomes unbound by 0.06 eV, the potential energy curve for the S₂ state has a minimum at longer interatomic distances.⁴⁸

Taking into account the inherent flexibility of DNA and related oligonucleotides, competitive ¹(LE)-type orientations might be present at the time of UV-irradiation. Because of the concomitant increased stability in the lowest singlet excited-state at those parallel arrangements, geometries around the ¹(LE)-type structure can be considered the best candidates as precursors of photodimers. It seems that the ideal twist angle between successive base pairs makes the geometry of B-DNA (and A-DNA) nonreactive. According to recent experimental evidence,⁹ the static Pyr-Pyr conformations and not conformational motions after photoexcitation determines the formation of Pyr<>Pyr photoproducts. Within the model proposed by Schreier et al.,⁹ the relatively smaller degree of flexibility of A-DNA compared to B-DNA to achieve the right orientations that become prone to react can be related to the greater resistance of A-DNA to Pyr<>Pyr formation. As shown by these authors, dimerization occurs only for thymine residues that are already in a reactive arrangement at the instant of excitation, because the rate of photoproduct formation by favorably oriented thymine pairs is much faster than the rate of orientation change. A similar situation can therefore be assumed in cytosine oligomers. From the results compiled so far, the ¹(LE)-type cytosine excimer is revealed as a reactive intermediate, a possible source of the CBC photoproduct, and consequently the ¹(LE) excimer has been taken as the starting point for the study of the dimerization reaction occurring along the singlet manifold (see below). It is also worth pointing out that singlet cytosine excimers may be involved in the photoinduced formation of the pyrimidine 6-4 pyrimidone photoadducts (Pyr(6-4)Pyr), whose precursor is an oxetane adduct, and other minor photohydrated products.¹ For cytosine in particular, and in contrast to cellular DNA, in the isolated system the formations of C<>C and C(6-4)C become competitive.² For a complete elucidation of the relative importance of those mechanisms, modeling of the environment and explicitly considering the Watson-Crick pairing should be most probably required since the yield formation depends on the type of nucleotide, the isolated or cellular nature of the DNA biopolymer, and the range of the UV radiation.^{8,9,66,67} Future research shall be addressed in those directions.

A parallel study has been performed for the two lowest triplet states. The numerical results are listed in Table 1, where for the sake of completeness the related findings for the two lowest singlet excited states are also included. The potential energy curves at the CASPT2(12,12)+BSSE level are depicted in Figure 2. The corresponding BSSE-uncorrected results can be

(63) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65–73.

(64) Lu, X.-J.; Olson, W. K. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5108–5121.

(65) Birks, J. B. *Rep. Prog. Phys.* **1975**, *38*, 903–974.

(66) Douki, T.; Court, M.; Sauvaigo, S.; Odin, F.; Cadet, J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11678–11685.

(67) Mouret, S.; Baudouin, C.; Charveron, M.; Favier, A.; Cadet, J.; Douki, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 13765–13770.

Table 1. Binding Energy (E_b), Basis Set Superposition Error (BSSE) Obtained through the Counterpoise Method (CP-BSSE), and Corrected Binding Energy CP- E_b , Computed at the CASPT2(12,12) Level for the Lowest Triplet and Singlet Excited States of the Cytosine Excimer^a

state	$R(C_5-C_5)$	E_b^b	CP-BSSE	CP- E_b
At the $(T_1)_{\min}$ Structure:				
T_1	3.029	1.15	0.98	0.17
S_0	3.029	0.41	0.97	-0.56
vertical emission ^c : 2.93 eV (=3.66-0.17-0.56)				
0-0 transition ^c : 3.49 eV (=3.66-0.17)				
At the $(T_1)_{\min}$ +BSSE structure: ${}^3(LE)$				
T_1	3.304	1.06	0.84	0.22
S_0	3.304	0.61	0.82	-0.21
vertical emission ^c : 3.23 eV (=3.66-0.22-0.21)				
0-0 transition ^c : 3.44 eV (=3.66-0.22)				
At the $(S_1)_{\min}$ Structure: ^d				
S_1	2.954	1.51	0.97	0.54
S_0	2.954	0.29	0.97	-0.68
vertical emission ^c $S_0 S_1$: 3.19 eV ^d (=4.41-0.54-0.68)				
0-0 transition ^c : 3.87 eV (=4.41-0.54)				
At the $(S_1)_{\min}$ +BSSE Structure: ${}^1(LE)$				
S_1	3.076 ^d	1.47	0.89	0.58 ^d
S_0	3.076	0.47	0.90	-0.43
vertical emission ^c : 3.40 eV ^d (=4.41-0.58-0.43)				
0-0 transition ^c : 3.83 eV (=4.41-0.58)				

^a Distances in Å and energies in eV. The triplet and singlet locally excited states ${}^3(LE)$ and ${}^1(LE)$ discussed in the text are identified. ^b Binding energy with respect to the corresponding states of the monomers. ^c Vertical excitations in the monomer: $S_0 \rightarrow T_1$ (3.66 eV) and $S_0 \rightarrow S_1$ (4.41 eV). ^d Taken from Olaso-González et al.⁴⁸

found in the Supporting Information. The accurate theoretical treatment of these singlet and triplet excimers becomes particularly challenging since it requires inclusion of electron dynamic correlation, flexible enough one-electron basis sets, wave functions with no symmetry constraints in order to achieve the correct asymptotic limit, and BSSE corrections. The influence of the latter factor is apparent by inspection and comparison of the two sets of results displayed in Figure 2 and in the Supporting Information.

At the highest level of theory employed, the binding energy for the lowest triplet state (T_1) computed at the CASPT2(12,12)+BSSE level is 0.22 eV, with a predicted vertical emission (phosphorescence) of 3.23 eV and a 0-0 triplet-singlet transition of 3.44 eV. Consequently, it is concluded that the triplet excimer is bound, although the binding energy is reduced about 60% with respect to the lowest singlet excimer. Interestingly, as can be noted from Figure 2, the S_1 and T_2 states are involved in a singlet-triplet crossing around the intermolecular distance 3.0–3.4 Å, precisely the distances expected for the ground-state biopolymer.^{6,15} Thus, T_2 could be populated through an ISC mechanism, becoming then deactivated toward T_1 via a CI facilitated with the breathing movement of the own DNA. Apart from the near-degeneracy found, the magnitude of the spin-orbit coupling (SOC) is also relevant to assess the efficiency of the ISC process, which would be strongly affected by the actual environment of the biopolymer. The possibility of excimer formation arises from the Watson-Crick structure in which hydrogen-bonded pairs A-T and G-C are situated inside a double helix, the backbone formed by two sugar-phosphate chains. One turn of the helix involves 10 base pairs and is 34 Å high. Thus, the interplanar distance between neighboring base pairs is about 3.4 Å, a value which is often found in excimer-

type organic crystals.^{65,68} The structure for the locally excited-state relative minimum on T_1 computed at the CASPT2(12,12)+BSSE level with respect to the intermolecular distance in the face-to-face arrangement (maintaining the monomers at the optimized ground-state geometry) shall be accordingly denoted as ${}^3(LE)$. As compiled in Table 1, the ${}^3(LE)$ structure has a $R(C_5-C_5)$ distance of 3.304 Å. Similarly, as in the case of the singlet manifold, the ${}^3(LE)$ -type cytosine excimer has been taken as the starting structure to study the intrinsic reactivity of the system along the triplet manifold.

To summarize, from the results compiled so far, the ${}^1(LE)$ - and the ${}^3(LE)$ -type cytosine excimers are revealed as promising, local, two-by-two reactive intermediates easily accessible in DNA single- and double strands that may be the source of the CBC dimer photoproducts, and consequently they have been taken as the starting point for the study of the photoinduced dimerization reaction occurring along the singlet and triplet manifold, respectively. Of course, the LE-type structures might not be the unique arrangements susceptible of initiating photoreactions in such complex hypersurfaces, but a priori they are clear candidates and bear the requirements to produce C<>C, and we shall therefore focus next on how they evolve. In fact, as shall be discussed below, the T_1 -MEP and S_1 -MEP computations from the ${}^3(LE)$ and ${}^1(LE)$ structures lead to stationary points on the respective hypersurfaces close to regions where an efficient radiationless decay toward the ground state can take place.

Photodimerization of Cytosine along the Triplet Manifold. A detailed analysis of the CASSCF wave functions for the LE states, that is, the T_1 and S_1 states at the LE geometries, shows that both the triplet ${}^3(LE)$ and the singlet ${}^1(LE)$ excited states can be described as belonging to the irreducible representation ${}^{3,1}A''$, as appropriate, of the C_s symmetry group. The CASPT2 energies for the states ${}^3(LE)$ and ${}^1(LE)$ computed within the geometrical constraints of C_s and with no restrictions (C_1 symmetry) are actually the same. In other words, no symmetry breaking of the respective wave functions is made apparent at the geometries of the ${}^3(LE)$ and ${}^1(LE)$ states as it happens markedly when going to longer intermolecular distances of the two cytosine moieties. In fact, only working in C_1 symmetry the degeneracy between the two lowest triplet (T_2 , T_1) and singlet (S_2 , S_1) states can be achieved at the asymptotic limit (cf. Figure 2). Inspired by this finding, CASSCF geometry optimizations and MEP computations for the lowest triplet and singlet states were carried out in practice for the ${}^{3,1}A''$ states (C_s symmetry). In order to make sure that a balanced treatment is given in all the explored regions of the hypersurfaces considered, the CASPT2 results reported here correspond always to computations carried out in C_1 symmetry. Furthermore, consistency with the results presented for the excimers in the previous section requires also inclusion of the BSSE correction. Therefore, BSSE has been introduced in the calculation of the relative stability between the different structures discussed. This is an important remark to bear in mind, because as the structural difference between two given stationary points becomes larger, the larger the difference between the computed relative stability with or without the BSSE correction would be. The procedure is certainly somewhat cumbersome, but it has the advantage that the results obtained for the states are consistent and directly comparable among them at the distinct geometries, from CBC to infinity separation of the two cytosine molecules.

(68) Klöpffer, W. In *Organic Molecular Photophysics*; Birks, J. B., Ed.; Interscience: London, 1973; pp 357–402.

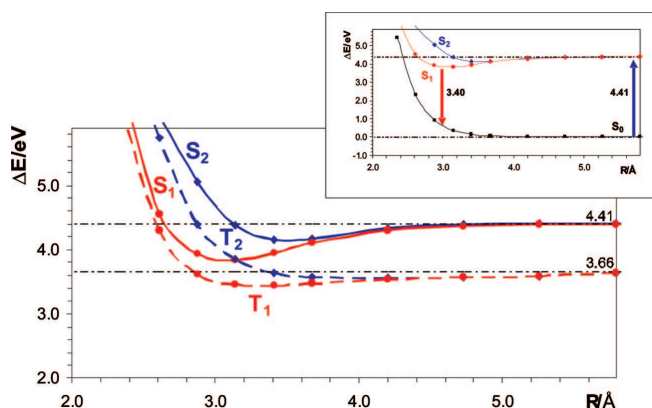


Figure 2. CASPT2+BSSE potential energy curves built with respect to the intermolecular distance $R(C_5-C_5)$ of two face-to-face π -stacked cytosine molecules involving the ground and the lowest two triplet and two singlet excited states. The inset, obtained at the same level of theory,⁴⁸ illustrates the emission event related to the observed red-shifted fluorescence in cytosine oligonucleotides.^{16,47}

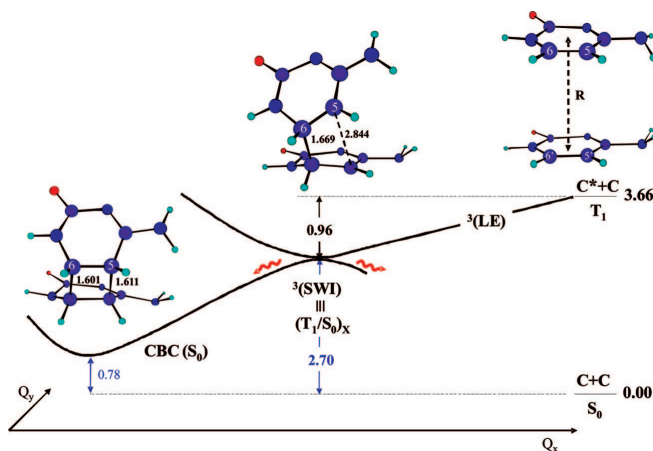


Figure 3. Proposed scheme, based on actual CASPT2 results, for the decay path of the lowest triplet excited state (T_1) of the cytosine dimer through the triplet locally excited state ${}^3(LE)$ and the stepwise intermediate ${}^3(SWI)$ leading to ground-state cyclobutane cytosine (CBC) via an intersystem crossing mechanism (ISC). The main intermolecular geometric parameters (in Å) are included. The remaining numerical values (in eV) correspond to relative energies, as indicated, with respect to two ground-state cytosine molecules separated by $R \approx 10.5$ Å. At the ${}^3(SWI)$ -optimized structure a singlet–triplet crossing, $(T_1/S_0)_x$, takes place. The Q_x coordinate is mainly related to the average intermolecular distance of $R(C_5-C_5)$ and $R(C_6-C_6)$, whereas Q_y is associated to the remaining degrees of freedom.

The overall proposed photodimerization decay path taking place along the triplet manifold is shown schematically in Figure 3. On the right-hand side of Figure 3, C + C denote two ground-state cytosine molecules separated by about 10.5 Å, both at the equilibrium geometry of ground-state cytosine. In $C^* + C$ one monomer (C^*) is electronically excited. Transition from the ground to the lowest excited-state at this intermolecular distance thus corresponds to the vertical transitions $S_0 \rightarrow T_1$, 3.66 eV, in agreement with earlier results for isolated cytosine.²⁰ The CASPT2 results for the MEP computation along the T_1 state starting from the ${}^3(LE)$ state are depicted in Figure 4, where the evolution of the S_0 and T_2 states is also included. Remarkably, the T_1 -MEP leads directly in a barrierless fashion to a structure coincident to that obtained by optimizing the geometry, denoted as a triplet stepwise intermediate, ${}^3(SWI)$, which has a clear degeneracy with the ground state. In other words, the triplet

state is coincident with a triplet–singlet crossing, $(T_1/S_0)_x$, a region of the hypersurface where decay to the ground state becomes particularly favored.

The stationary point ${}^3(SWI)$ is characterized by the formation of a single covalent bond between the C_6-C_6 atoms computed to be 1.669 Å, whereas the C_5-C_5 interatomic distance stays elongated, about 2.8 Å (see Figure 3). Thus, ${}^3(SWI)$ cannot be really considered an excimer but an intermediate toward the formation of CBC.

Starting from an ample range of parallel arrangements around the ${}^3(LE)$ structure, geometry optimization of the ${}^3A'$ state leads unambiguously to the ${}^3(SWI)$ structure, pointing out to the presence of many related reactive orientations. Of course, if the symmetry restrictions are released and initially the two cytosine molecules are considerably far apart, at about an intermolecular distance of 7 Å or larger, a local relaxed triplet in one of the

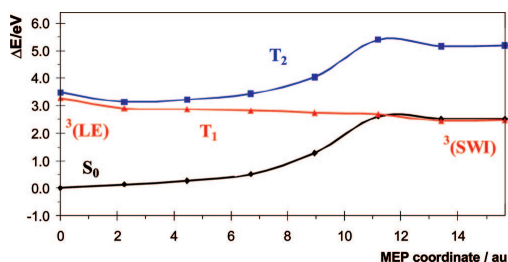


Figure 4. Low-lying triplet excited states of the cytosine dimer computed at the CASPT2/CASSCF level along the minimum energy path (MEP) of the T_1 state from the geometry of the triplet locally excited state ${}^3(\text{LE})$. The T_1 -MEP ends at the stepwise intermediate ${}^3(\text{SWI})$ (see Figure 3), and it is isoenergetic with the ground state (S_0).

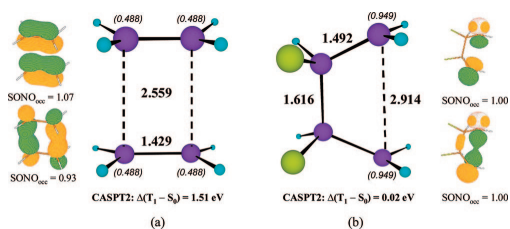


Figure 5. CASPT2(4,4) optimized geometry for the lowest triplet state of the ethene dimer (a) and the fluorethene dimer (b). The occupation number of the corresponding CASSCF singly occupied natural orbital (SONO_{occ}) is also included, as well as the CASPT2(4,4) energy difference computed between the lowest triplet and ground state. Main spin population derived from Mulliken analysis is given within parentheses. Distances in Å.

monomers is obtained, whereas the other maintains the ground-state equilibrium structure. As documented in detailed elsewhere,²⁰ the lowest triplet state of the monomer has $\pi\pi^*$ character and a band origin of 3.04 eV, which represents an stabilization of about 0.6 eV with respect to the vertical singlet–triplet transition.

In order to get further insight into the source and nature of the species ${}^3(\text{SWI})$, comparable results for the lowest triplet state of ethene and fluorethene dimers (ED and FED hereafter) are helpful and illustrative. The T_1 state for ED and FED has been optimized at the CASSCF(4,4) level employing as active space the π valence molecular orbitals (MOs) (four electrons active) and the same ANO-type basis set as for cytosine. As can be readily seen from Figure 5, the equilibrium geometry for the lowest T_1 state of the FED molecule resembles to that of ${}^3(\text{SWI})$, whereas for ED the structure of lowest T_1 state (HOMO–LUMO type) is rectangular. Furthermore, the single bond formed in T_1 of FED involves the intermolecular substituted carbon atoms, and the spin density is localized on the remaining carbon atoms. The T_1 -FED equilibrium structure corresponds clearly to a biradical, and not surprisingly, it is degenerate with the ground state, both at the CASSCF and CASPT2 levels. On the contrary, for ED the T_1 state is about 1.5 eV above S_0 , having the spin density of the two unpaired electrons equally shared by the four carbon atoms. Interestingly, according to the nature of the states, the optimized geometries for T_1 -ED and T_1 -FED are actual minima. A similar situation can be expected for ${}^3(\text{SWI})$ in the cytosine dimer.

The singlet–triplet degeneracy occurring at the equilibrium structure ${}^3(\text{SWI})$ can be therefore understood on the basis of

the biradical character of the triplet/singlet states, having the unpaired electrons located on the C_5 and C_5' atoms, yielding also a rationalization for the relatively longer C_5 – C_5' bond distance with respect to that calculated for C_6 – C_6' . Taking into consideration that the C_6 atom (and C_6') is attached to a nitrogen atom, whereas C_5 (and C_5') is linked to a carbon atom, the C_6 and C_6' centers are relatively more electron deficient than the C_5 and C_5' atoms, since the electron affinity of nitrogen is higher than that of carbon. The single bond-making process between C_6 and C_6' is therefore favored. As it occurs in FED, the substituted carbon atoms compensate for the lack of electron density by getting closer to the other monomer, causing in their quest for restoring the missed electron density the birth of a new bond.

The ${}^3(\text{SWI})$ state has a CP- E_b of 0.96 eV and lies 2.70 eV above two ground-state cytosine molecules, which represents a stabilization of 0.3 eV with respect to the adiabatic triplet state of isolated cytosine. The 2.70 eV energy can be considered a lower bound for the triplet energy of cytosine in DNA. It can be envisaged that exogenous photosensitizers would populate the relaxed triplet state of the monomer, which may interact attractively with ground-state cytosine, and the so-formed dimer would evolve toward ${}^3(\text{SWI})$, precursor of CBC. The possibility of endogenous photosensitization by triplet energy transfer in DNA between different nucleobases has also to be kept in mind. In either case, the required energy to access the ${}^3(\text{SWI})$ state can be related to the threshold observed experimentally in a given compound to become a potential DNA photodamager via $C < C$ formation. The computed result for the ${}^3(\text{SWI})$ state of cytosine, 2.70 eV, is consistent with the triplet energy of thymine in DNA deduced experimentally, 2.80 eV.⁵⁰ Triplet–triplet energy transfer is very important and common in chemical reactions.¹³ It is utilized to specifically populate the triplet state of the reactant. This process is referred to as photosensitization, and the donor is called a triplet sensitizer. It is important to recall that, for efficient energy transfer to take place, the donor must absorb in the region of interest, undergo efficient ISC, and have a triplet-state energy higher than that of the acceptor, that is in this case, the ${}^3(\text{SWI})$ species. The present results offer a nice rationale to the known fact that pyrimidine dimers are formed in solution under triplet photosensitization conditions.¹

The computed intermediate ${}^3(\text{SWI})$ thus represents a channel for photodimer formation from the triplet state of π -stacked cytosine in DNA and provides the basic understanding of potential phototegenotoxicity via triplet–triplet sensitization. It is known that UVA radiation (3.10–3.87 eV) preferentially induces the production of cyclobutane dimers at TT sites without any detectable formation of Pyr(6-4)Pyr photoproducts. Direct singlet population cannot take place at such low irradiation energies, and the process should then proceed through a triplet–energy transfer photosensitization mechanism.⁶⁷ As preliminary calculations support, a similar pathway for the formation of the ${}^3(\text{SWI})$ intermediate can be expected to take place for dimers including thymine. At higher irradiation energies, UVB or UVC, the singlet excited states of the pyrimidine molecule are accessible, and the mechanism of intrinsic population of the lowest triplet state of the monomer becomes operative. Since the efficiency of triplet-state formation has been determined to be larger in isolated thymine than in cytosine,^{20,42} it is possible to rationalize the preference of the TT sites, and to a lesser extent CT, TC, and CC, to generate the cyclobutane photoproduct.

The presence of the $(T_1/S_0)_X$ crossing clearly favors the ISC to the ground state, but the actual efficiency of the decay process

along the triplet manifold will also rely on the enhancement of the SOC, estimated to be just a few cm^{-1} at the in-vacuo $^3(\text{SW})$ structure. In this respect, the solvent (or, in general, the environment) is expected to play a crucial role in the ISC process.⁶⁹ Under favorable ISC conditions, the decay would most probably take place on a subpicosecond range, which is considerably less than the 200 ns employed in the time-resolved study of thymine dimer formation.⁸ We support therefore the suggestion made by Marguet and Markovitsi⁸ in relation to the possibility that the ultrafast reactivity of the triplet state to yield cyclobutane dimers occurs with quasi-unit efficiency.

Photodimerization of Cytosine along the Singlet Manifold.

Considering the seminal work reported by Bernardi, Olivucci, and Robb in 1990 on predicting forbidden and allowed excited-state $[2 + 2]$ cycloaddition reactions of two ethene molecules, decay toward ground-state CBC from the singlet excimer should take place via a CI.^{70,71} The ethene–ethene photochemical cycloaddition reaction path has been documented to occur in a single step via a rhomboid (C_{2h} symmetry) conical intersection,⁷² and a similar situation is expected to occur here as it has already been documented for the thymine dimer.^{11,12} Imposing C_s symmetry in the study represents therefore a clear approximation in this case, since in principle the rhomboid arrangement cannot be reached. The cut along the singlet reaction path within C_s symmetry would lead to a region of the S_1 surface used to be referred as “pericyclic minimum” because it was thought that, in general, the touching between the states was likely weakly avoided everywhere, even without symmetry constraints.¹³ Thanks to the extensive work performed by these authors and many others,^{44,45} the exact location of the bottom of the respective funnel has been determined in considerable detail for many different processes and has been demonstrated to be of fundamental significance in many photoreactions. In this respect, it should be emphasized that exploring the excited-state potential energy surfaces by using geometries from the ground-state path might lead to meaningless results, and consequently, the model should not be employed. Currently, the importance of the crucial role played by CIs in modern photochemistry is well established theoretically and supported experimentally.

If one is able to connect the different relevant stationary points to CBC within C_s symmetry constraints, the geometry around the touching region would be then a good guess for the computation of the actual CI (C_1 symmetry). The computational strategy has been found quite advantageous, especially taking into consideration that the present study is addressed to get further insight into the intrinsic possible photodimerization paths along the singlet manifold occurring in oligonucleotides and DNA. The C_s symmetry constraints somehow simulate for two cytosine monomers the restrictions that those would have in the actual biopolymer. In order to be fully aware of the complexity of the study, it is worth mentioning that unconstrained geometry optimization of two stacked cytosine molecules leads for the lowest singlet states to structures with orientations unlikely to occur in the single and double strands of DNA. Those unconstrained structures are solely appropriate

to be compared to the gas-phase data, a target that is out of the scope of the current research and shall not be further discussed. Past work has overcome this problem by keeping fixed the C_5-C_5' and C_6-C_6' bonds and the corresponding dihedral angle to those data known for a B-DNA form.^{11,12,73,74} For the reasons indicated above, we have first preferred mapping the full photoreaction within C_s symmetry, which nicely gives the basic clues of the nonradiative decay path taking place along the S_1 hypersurface toward the ground state.

On the basis of CASPT2 results, the overall photoinduced production of CBC along the singlet manifold is schematically displayed in Figure 6. On the right-hand side of the drawing, the transition $S_0 \rightarrow S_1$ at 4.41 eV corresponds to that of the isolated cytosine molecule. The related oscillator strength for the singlet–singlet absorption is 0.09. The findings are consistent with earlier results for the system at the same level of theory.^{19,21,48} Using a similar notation as in Figure 3, $C + C$ represent two ground-state cytosine molecules separated at about 10.5 Å, both at the equilibrium geometry of ground-state cytosine, whereas in $C^* + C$ one monomer (C^*) is in the lowest electronically excited (singlet, in Figure 6) state. As shown in Figure 7, MEP computations along the singlet excited state starting from the $^1(\text{LE})$ excimer leads in a barrierless form to a relaxed excimer, hereafter labeled like $^1(C^*C)$. In the MEP $^1(\text{LE}) - ^1(C^*C)$ the energy of the ground-state is not significantly affected (cf. Figure 7). Recall at this point that CASSCF MEP geometry optimizations were carried out within C_s symmetry for the $^1A''$ state, and punctual CASPT2 calculations at the converged structures were obtained from averaging the lowest four roots with no symmetry constraints. As it is clearly verified from Figure 8, the relaxed excimer $^1(C^*C)$ connects with the lowest singlet excited-state of the photodimer CBC, and it is apparent that from ground-state CBC the S_1 -MEP evolves in a steepest descendent fashion toward the relaxed structure $^1(C^*C)$. For the sake of completeness, results for the S_2 and S_3 states are also included in Figures 7 and 8. For CBC, the lowest vertical transition, computed to be at 4.57 eV with oscillator strength 0.070, is expected to contribute to the photoreversibility process observed in pyrimidines.¹⁰ The energy of the ground state (S_0) along the S_1 -MEP of Figure 8 increases progressively and, after reaching a maximum, decreases. Around the proximity of the MEP coordinate 4.5 au where the maximum for S_0 is accomplished, the S_1 and S_0 states are placed relatively close, being the corresponding geometry a good candidate as initial trial to search for a crossing between the respective singlet hypersurfaces. In this manner, the stationary point for the actual conical intersection (S_1/S_0)_{CI} displayed in Figure 6 was obtained in C_1 symmetry. The funnel (S_1/S_0)_{CI} provides the 2-fold channel for ultrafast internal conversion toward the ground-state of the system, that is, to CBC and to the separated monomers, although just the former has been emphasized in Figure 6.

The relaxed excimer $^1(C^*C)$ has a binding energy (CP- E_b) of 1.10 eV, and it is stabilized with respect to $^1(\text{LE})$ by about ~ 0.5 eV. In order to reach the conical intersection (S_1/S_0)_{CI} from $^1(C^*C)$, the system has to surmount a barrier height of 0.2 eV. Because of the pronounced CP- E_b and the presence of a barrier, the relaxed species $^1(C^*C)$ can be expected to be fluorescent. The predicted fluorescence features from $^1(\text{LE})$ and $^1(C^*C)$, 3.40 and 2.76 eV, respectively, may help to rationalize

(69) Hare, P. M.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18641–18650.

(70) Bernardi, F.; De, S.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1737–1744.

(71) Bernardi, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 405–412.

(72) Celani, P.; Robb, M. A.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 1–8.

(73) Durbeej, B.; Eriksson, L. A. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 159–167.

(74) Zhang, R. B.; Eriksson, L. A. *J. Chem. Phys. B* **2006**, *110*, 7556–7562.

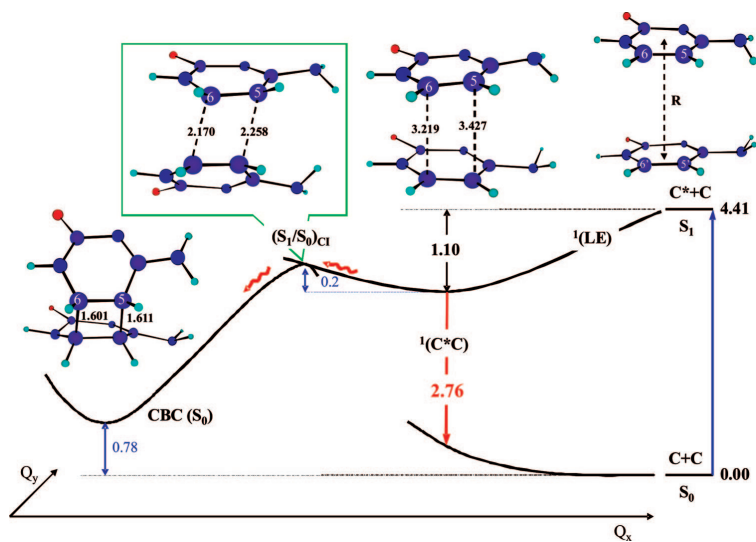


Figure 6. CASPT2 results for the computed decay path of the lowest singlet excited state (S_1) of the cytosine dimer involving the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$ through the conical intersection $(S_1/S_0)_{CI}$ leading to ground-state cyclobutane cytosine (CBC). The photoreaction competes with the fluorescence from ${}^1(C^*C)$. The main intermolecular geometric parameters (in Å) are included. The remaining numerical values (in eV) correspond to relative energies, as indicated, with respect to two ground-state cytosine molecules separated $R \approx 10.5$ Å. The Q_x coordinate is mainly related to the average intermolecular distance of $R(C_5-C_5')$ and $R(C_6-C_6')$, whereas Q_y is associated with the remaining degrees of freedom.

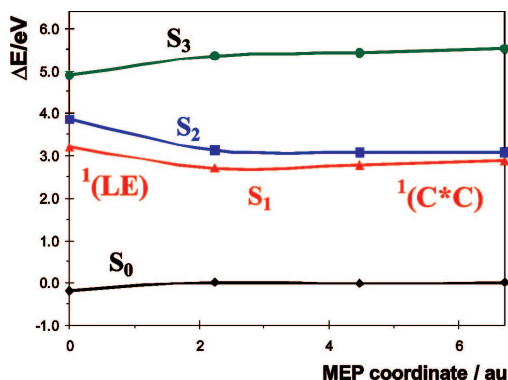


Figure 7. Low-lying singlet excited states of the cytosine dimer computed at the CASPT2//CASSCF level along the minimum energy path (MEP) of the S_1 state from the geometry of the singlet locally excited state ${}^1(LE)$. The S_1 -MEP ends at the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$ (see Figure 6).

the dramatic wavelength dependence seen by using fluorescence polarization measurements of the pure excimer fluorescence observed for CpC in neutral ethylene glycol/water glasses at low temperatures.^{75,76} Thus, when the excitation wavelength (λ_e) used is 250 nm (4.96 eV), the recorded fluorescence wavelength (λ_f) becomes 310 nm (4.00 eV), whereas at $\lambda_e = 300$ nm (4.13 eV) the observed emission is $\lambda_f = 460$ nm (2.70 eV). Even if the results computed in vacuo are not strictly comparable to those data derived from glycol/water glasses, it is tempting to anticipate qualitatively that when λ_e is shorter (case A) or longer

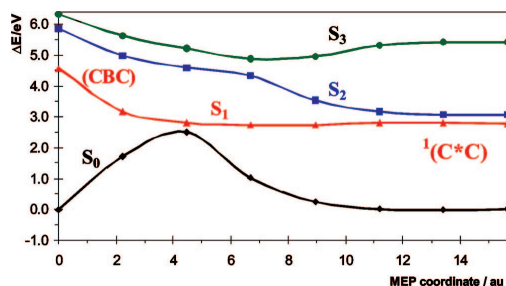


Figure 8. Low-lying singlet excited states of the cytosine dimer computed at the CASPT2//CASSCF level along the minimum energy path (MEP) of the S_1 state from the cyclobutane cytosine (CBC) dimer at its ground-state equilibrium geometry. The S_1 -MEP ends at the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$ (see Figure 6).

(case B) than the absorption maximum (λ_{max}) of the monomer, computed at 4.41 eV, the fluorescence observed for CpC could be related to the ${}^1(LE)$ -type excimer or to a relaxed ${}^1(C^*C)$ -type excimer, respectively. The predicted fluorescence from the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$, 2.76 eV, is indeed consistent with case B (2.70 eV).^{75,76} The observed variation in the polarization character could then be attributed basically to the different nature of the systems responsible of the fluorescent features in the unrelaxed (case A) and relaxed (case B) excimers.

The presence of a conical intersection as the main actor in the photoinduced production of bipyrimidine lesions along the singlet manifold is intrinsic to any ethene-like dimer system such as the cytosine dimer. For this reason, examination of the results for the crossing $(S_1/S_0)_{CI}$ in the ethene dimer itself, employing the same tools and computational strategies as described above, is illustrative. Figure 9 shows the $(S_1/S_0)_{CI}$

(75) Callis, P. R. *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *19*, 551–555.

(76) Wilson, R. W.; Callis, P. R. *J. Phys. Chem.* **1976**, *80*, 2280–2288.

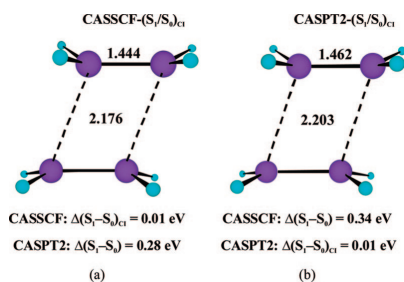


Figure 9. Conical intersection (S₁/S₀)_{CI} of the ethene dimer and energy difference between the implied states at the different levels of theory (a) at the CASSCF(4,4) optimized geometry, and (b) at the CASPT2(4,4) optimized geometry. Distances in Å.

optimized geometry computed at the CASSCF(4,4) and CASPT2(4,4) levels of theory by using analytical and numerical gradients, respectively. The (S₁/S₀)_{CI} structures are of rhomboid type and agree with previous results based on large-scale MRCI and CASPT2 computations.^{77,78} As can be readily seen in Figure 9, dynamic electron correlation accounted for at the CASPT2 level tends to increase the intra- and interbond distances. On the other hand, at the optimized geometry for the CASSCF crossing, the energy difference between the two states becomes 0.28 eV at the CASPT2 level, whereas at the conical intersection computed at the CASPT2 level, the CASSCF energy difference is 0.34 eV. A similar situation happens for the cytosine dimer, where the CASSCF and CASPT2 conical intersections are placed in different regions of the hypersurface. The differential electron correlation between S₀ and S₁ at the region of crossing is relevant both qualitatively and quantitatively. While (S₁/S₀)_{CI} is below the relaxed excimer ¹(C*^cC) at the CASSCF level, the former is separated by a barrier height of 0.2 eV from the latter at the CASPT2 level. In other words, the pathway is predicted barrierless by using the CASSCF approach. In contrast the more advanced CASPT2 method offers a completely different picture (cf. Figure 6). The ethenic bond lengths (C₅-C₆) and (C₅-C₆') at the (S₁/S₀)_{CI} geometry, 1.471 Å and 1.422 Å, respectively, are elongated with respect to the relaxed ¹(C*^cC) excimer, 1.399 Å, and shorter than those in CBC, 1.539 Å. In the meantime, a progressive decrease of the intramonomer bond distances C₅-C₅' and C₆-C₆' takes place from ¹(C*^cC) to CBC passing through (S₁/S₀)_{CI}. These structural changes reflect the conversion process involving the transformation of two carbon-carbon double bonds into single bonds, together with the simultaneous formation of two new single carbon-carbon bonds.

While the photoinduced [2 + 2] cycloaddition of two stacked cytosine molecules proceeds through a stepwise mechanism in the triplet manifold, the photoreaction occurs via a concerted mechanism on the lowest singlet excited state. The former is mediated by a singlet-triplet crossing and the latter takes place through a singlet-singlet conical intersection, which are the funnels for the ultrafast nonradiative decay leading to CBC. The singlet-triplet crossing can be accessed barrierless, but the efficiency of the process relies on the effectiveness of the ISC mechanism. On the other hand, a small barrier (0.2 eV) has to be overcome along the studied pathway in the singlet manifold

to reach the conical intersection, but there might be many different orientations in the vicinity of the crossing (S₁/S₀)_{CI} prone to react directly with no barrier. Figure 6 just shows that from the most plausible reactive species, a relaxed excimer characterized by a large binding energy, a small barrier to reach the funnel does exist. Figure 10 displays a scheme of CBC formation through both singlet and triplet manifold. Within the present context, a key question rises: Why is thymine more reactive than cytosine? Because of the methyl group in thymine, the corresponding thymine excimers are expected to be less stable than those of cytosine. In this respect, thymine can be considered more reactive toward the formation of photoinduced dimers than cytosine because the lack of competitive stable thymine excimers. The present picture is supported by independent experimental research. On the one hand, excimer contributions to the total fluorescence yield were found less prominent in (dT)₁₅ than in (dC)₁₅.⁴⁷ On the other hand, the transient absorption signals at 570 nm from (dT)₁₈ and its 5'-mononucleotide TMP agree within experimental uncertainty, that is, formation of thymine excimers was not observed.⁷ Both facts point out to the absence of thymine excimers. Consequently, the decay of the thymine-base monomer via internal conversion becomes the main deactivation route, whereas for cytosine oligomers it competes with the formation of stable excimers bearing well characterized photophysical properties.^{16,47} In addition, as we have shown here, cytosine excimers can also be considered as precursors of mutagenic photoproducts. Thus, when a system is able to form stable singlet excimers placed at energies below the crossing with the ground state, as it is the case of cytosine, formation of photoproducts along the singlet mechanism should proceed at a slower relative rate for these orientations, because of the presence of a barrier to be overcome, making the full process less efficient (see Figure 10). Furthermore, taking into consideration that a very recent study based on femtosecond time-resolved infrared spectroscopy shows that thymine dimers are fully formed around 1 ps after UV excitation,⁹ it is tempting to propose that the intrinsic ultrafast photoreactivity of the thymine dimer is partially due to the absence of stable thymine excimers, since, in practice, basically all the relative orientations of the two monomers close to the region where the corresponding conical intersection^{11,12} takes place become potentially reactive. In accordance with the fact that no stable excimers are formed, the initial reactive orientations (shadowed regions in Figure 10) are expected to reach the funnel in a barrierless mode because they are at higher energies than the conical intersection (S₁/S₀)_{CI}. Nevertheless, the accessibility of the area around the funnel would be ultimately dictated by the inherent flexibility of the biopolymer under consideration.

Conclusions

The present contribution emphasizes the importance of excimers to understand not only the distinct photophysics of oligonucleotides, as well as DNA itself, but also to rationalize the intrinsic and distinct photoinduced reactivity of cytosine and thymine toward the formation of cyclobutane dimers, recognized as one of the most common processes leading to DNA damage under UV irradiation. Taking as starting structures the locally excited ³(LE) and ¹(LE) excimers, which have a face-to-face arrangement at the ground-state geometry of the cytosine monomer, it is shown on the basis of high-level ab initio computations that a stepwise intermediate, ³(SWI), is produced with no barrier in the triplet manifold, whereas the barrierless

(77) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104107.

(78) Dallos, M.; Lischka, H.; Shepard, R.; Yarkony, D. R.; Szalay, P. G. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7330-7339.

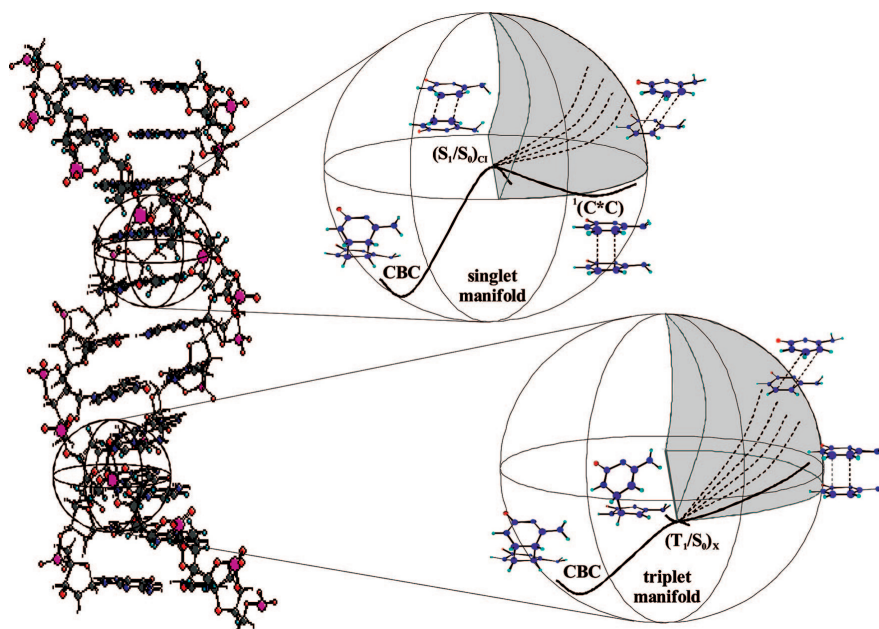


Figure 10. Scheme of the photodimerization process of the π -stacked cytosine dimer along the singlet and the triplet manifold. The shadowed volumes in the sphere represent regions of the DNA strand with reactive orientations, in which the decay path lies above the singlet–triplet crossing (T_1/S_0)_X and the conical intersection (S_1/S_0)_{CI}.

pathway along the lowest singlet hypersurface yields the relaxed excimer $^1(C^*C)$. The structure $^3(SWI)$ has a covalent single bond between the carbon atoms C_6-C_6' , with the C_5-C_5' bond length kept long. The required energy to reach $^3(SWI)$ from two isolated ground-state cytosine monomers, 2.70 eV, is related to the threshold observed experimentally for a given photosensitizer to become a potential DNA photodamager, and it is in agreement with the triplet energy of thymine in DNA deduced experimentally, 2.80 eV.⁵⁰ At the $^3(SWI)$ structure a singlet–triplet crossing (T_1/S_0)_X takes place, which mediates the nonradiative deactivation toward the ground state by an intersystem crossing mechanism (ISC). Under favorable conditions for spin–orbit coupling (SOC) and according to the barrierless profile computed, the decay is predicted to take place on a subpicosecond range. Because the $^3(SWI)$ intermediate is obtained from many different initial structures (see Figure 10), the findings can also be applied in situations where no excimers are expected to be present. Thus, the results offer a nice rationale to the known fact that pyrimidine dimers are formed in solution under triplet photosensitization conditions¹ and the lack of any triplet absorption in the transient spectra reported for (dT)₂₀ due to the high efficiency of the process compared to the time resolution used to monitor the thymine dimer formation.⁸

The *shearing-type* conical intersection involving the lowest singlet and the ground state becomes the cornerstone to understand the formation of photoproducts along the singlet manifold. In order to reach the funnel, the system placed at $^1(C^*C)$ has to overcome a barrier of 0.2 eV. In competition to the photoreaction, fluorescence from the $^1(C^*C)$ becomes also possible. The fluorescent features from the locally excited $^1(LE)$ and the relaxed $^1(C^*C)$ excimers help to rationalize the pronounced wavelength dependence observed in solution

by using fluorescence polarization techniques.^{75,76} The presence of a barrier does not imply however that the overall process of formation of cyclobutane cytosine (CBC) is hindered. Instead, analysis of the current theoretical and experimental information at hand suggests *reactive orientations* those that at the time of light irradiation are close but energetically above the shearing-type conical intersection (S_1/S_0)_{CI}, which is concomitant to Pyr <> Pyr formation (see Figure 10). In this sense, the lack of stable excimers represents a larger potential of the system to achieve reactive arrangements, which is translated into a relative higher rate. Such a situation is accomplished by thymine.^{7,47} On the contrary, as it occurs in cytosine, stable excimers may decrease the effectiveness of photoproduct formation in the singlet manifold, since the orientations of the monomers around the region of the relaxed excimer might not be so reactive and an excess of vibrational energy is required to surmount the corresponding barriers and, as a result, the CBC formation becomes globally less effective (see Figure 10). In summary, stable singlet excimers slow down the efficiency of dimer formation, as for cytosine, whereas the absence of excimers, such as thymine, may indirectly favor the photoreaction. The scheme serves to rationalize the reason why a reaction which proceeds via triplet state in solution may have a singlet-state precursor when the biochromophores are held together, as is the case in frozen solutions or in a biopolymer.¹⁵ It may also be useful to design health care phototherapeutic nucleobase-based drugs addressed to either enhance or decrease pyrimidine dimer formation by using, for instance, appropriate nucleobases derivatives. Not surprisingly, bioexcimers are ubiquitously used by Nature. They play a fundamental role in photobiology by modulating the

charge redistribution in the lowest excited state, something which is crucial to understand electron transfer in photosynthesis⁷⁹ and, as shown here, to rationalize the distinct intrinsic reactivity of DNA nucleobases toward intrastrand pyrimidine dimerization.

Acknowledgment. The research reported has been supported by the MEC-FEDER projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010

(79) Olaso-González, G.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24734–24739.

Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience. D.R.S., G.O.G., and I.G.R. gratefully acknowledge Ph.D. fellowships from the Spanish MEC.

Supporting Information Available: Further computational details and wave function descriptions, complete ref 56, Cartesian coordinates for the optimized structures, and plots on BSSE-uncorrected curves (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA803068N

**"Bioexcimers as Precursors of Charge Transfer and Reactivity in
Photobiology".**

L. Serrano-Andrés, M. Merchán, D. Roca-Sanjuán, G. Olaso-
González, and M. Rubio

In: *"Computational Methods in Science and Engineering. Theory
and Computation: Old Problems and New Challenges"*.

Vol. I. Eds. T. Simos and G. Maroulis, American Institute of
Physics, pp. 526-532, 2007.

Bioexcimers as Precursors of Charge Transfer and Reactivity in Photobiology

Luis Serrano-Andrés,^{†,*} Manuela Merchán,[†] Daniel Roca-Sanjuán,[†]
Gloria Olaso-González,[†] Mercedes Rubio[‡]

[†]*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València
Apartado de Correos 22085, ES-46071 Valencia, Spain,
and*

[‡]*Fundació General, Universitat de València,
Plaza del Patriarca, 4, 1, ES-46002 Valencia, Spain
Luis.Serrano@uv.es*

Abstract. Accurate CASPT2//CASSCF calculations show that π -stacked interactions in different biochromophores such as DNA nucleobases or porphyrin-quinone pairs yield excimer-like situations which behave as precursors of processes like charge transfer or photoreactivity. Examples are the transfer of charge between a reduced pheophytin and an accepting quinone molecule, process that trigger the sequence of electron transfer phenomena in photosynthetic photosystem II, the electron transfer between adjacent DNA nucleobases in a strand of oligonucleotides, and the photodimerization taking place in cytosine pairs leading to cyclobutanecytosine mutants. These processes take place through nonadiabatic photochemical mechanisms whose evolution is determined by the presence and accessibility of conical intersections and other surface crossings between different electronic states.

Keywords: Bioexcimer; CASPT2; Conical Intersection; DNA photochemistry

PACS: 31.10.+z; 31.15.Ar; 31.25.Qm; 31.50.Df; 31.50.Gh; 33.50.-j; 34.70.+e

INTRODUCTION

An excimer was classically defined as a dimer which is associated in an excited electronic state and which is dissociative in its ground state.¹ In other words, the so-called excimer can be seen as a homodimer where one of the partners is electronically excited but such a dimer immediately dissociates upon deexcitation. Strictly, a similar complex formed between two different molecules, a heterodimer, should be called exciplex. Presence of excimers is more common than expected,^{1,2,3} and in the present contribution we want to focus on those complexes relevant in photobiology. Therefore, we talk about bioexcimers and their crucial role mediating in different aspects of the biological activity, from charge-transfer processes to photoreactivity. In particular, we will start by establishing the existence and nature of bioexcimers by properly analyzing the binding energies in different states of the neutral cytosine homodimer.⁴ Later, we will determine how bioexcimers can mediate electron transfer processes in photosynthesis⁵ or in DNA environments, and how they behave as precursors in the formation of DNA-bases photoproducts.^{3,6} Our methodology involves the multiconfigurational CASSCF and CASPT2 quantum chemical approaches and highly accurate ANO-S-type one-electron basis sets contracted to C,N,O [3s2p1d] / H [2s1p], an strategy which has proved its accuracy.^{7,8,9,10}

Figures 1 and 2 display the CASPT2(12,12) potential energy curves (PECs) for the ground and low-lying singlet excited states of the cytosine homodimer along the intermolecular distance between the two π -stacked systems (active space of 12 electrons in 12 orbitals). A face-to-face arrangement has been selected because it represent the most favorable conformation to yield an excimer, which, on the other hand, it is also present in other structures, for instance the B-DNA form. The inclusion of the Basis Set Superposition Error (BSSE) correction, estimated by the counterpoise correction,⁴ was required to get the proper description of the system. In Figure 1 it is observed how the lack of BSSE causes an overestimation of the states binding energies. Corrected results on Figure 2 yield a more accurate picture. Whereas the ground state is dissociative, the lowest singlet excited state becomes clearly bound (0.58 eV) at the BSSE-CASPT2(12,12) level, with a S_1 minimum placed at $R(C_5-C_5') = 3.076$ Å. In the PECs we have chosen to monitor the intermolecular distance $R(C_5-C_5')$,

which is particularly relevant in the formation of cyclobutane photodimers. In the figures, energies are referred to two ground-state cytosine molecules separated about 20 au. In the asymptotic limit S_1 and S_2 become degenerate. They are related to the equivalent situations $C+C^*$ and C^*+C , where C and C^* represent the ground-state cytosine and its lowest singlet excited state, respectively.

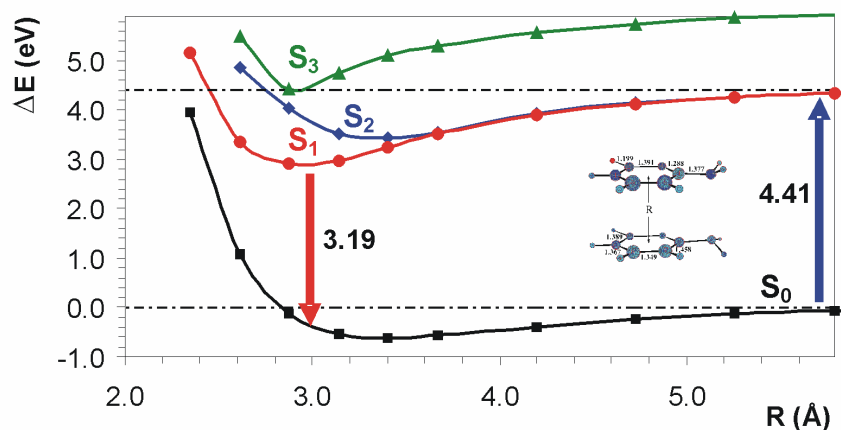


FIGURE 1. CASPT2 potential energy curves built with respect to the intermolecular distance R of two π -stacked cytosine molecules. Lack of BSSE causes overestimation of the states binding energies.

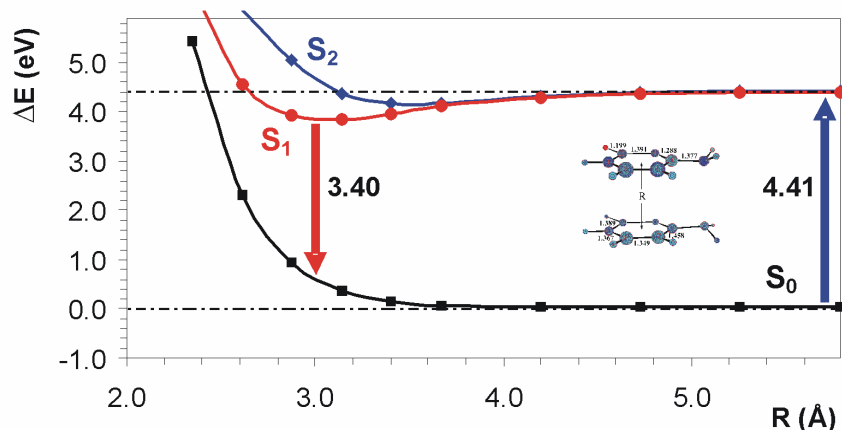


FIGURE 2. BSSE-CASPT2 potential energy curves built with respect to the intermolecular distance R of two π -stacked cytosine molecules.

Thus, the absorption $S_0 \rightarrow S_1$ calculated at 20 au, corresponds to the monomer absorption. It is here computed at 4.41 eV in agreement with previous findings and experimental evidence.^{11,12,13} The value becomes about half an eV too low if computed in C_s symmetry because localization of the electronic excitation in one monomer is not permitted by symmetry constraints. At short intermolecular distances S_1 is described mainly by intermonomer charge-transfer one-electron promotions and S_2 by simultaneous singly excited intra-monomer configurations with leading weights 69% (S_1) and 40% (S_2). Since S_3 is related to a higher excited state of the monomer it shall not be discussed further. The level of the calculation does not affect the conclusions obtained, but it changes the quantitative outcome. In absence of the BSSE correction, the vertical emission from the $(S_1)_{\min}$ structure is calculated at 3.19 eV, a value that increases to 3.40 eV at the BSSE-CASPT2 level (see Fig. 2). There is a good agreement with the fluorescence maximum observed in aqueous solution for the dimer $d(C)_2$

and the 15-mer d(C)₁₅ ($\lambda_{\text{max}} = 385 \text{ nm}$; 3.22 eV),¹⁴ considerably red-shifted as compared to that of the monomer ($\lambda_{\text{max}} = 313 \text{ nm}$; 3.96 eV).¹⁵

In summary, we can predict the existence of cytosine excimers, which can be regarded as an intrinsic property of the C-dimer. The computed vertical emission supports the excimer origin of the red-shifted fluorescence observed in cytosine oligonucleotides.^{14,16} Parallel work involving the remaining DNA/RNA nucleobases is currently addressed in our group.

BIOEXCIMERS AND NONADIABATIC PHOTOCHEMISTRY

Charge Transfer in Photosynthetic Processes and DNA

Once the existence of excimers formed by biochromophores has been established, we can start studying their role in different photoinduced biochemical processes, for instance biologically relevant charge transfer flows. In the present contribution we will focus on electron transfer (ET) photoreactions. The underlying mechanism of ET occurring from reduced pheophytin (Pheo⁻) to the primary stable photosynthetic acceptor, a plastoquinone (PQ) molecule, constitutes one of the most outstanding examples of ultrafast ET, which takes place in oxygenic photosynthesis.⁵ ET processes involving biochromophores are quite often encountered in the corresponding biological functions in connection with the transduction of energy that ultimately leads to a biochemical signal and are usually described within the framework of the quasi-equilibrium Marcus' theory,¹⁷ and that we will describe by pointing out the close presence of conical intersections (CIs) and state crossings.⁵ In photosynthesis, ETs have two specific characteristics: first, they are activationless, that is, they take place in the inverted region of the Marcus theory, and second, they proceed very fast and in the same order of magnitude as the time scale of vibration motion (in the femto- or picosecond regime) and consequently nonequilibrium aspects have to be accounted for explicitly.^{18,19,20} In order to make the computation manageable, the study has been focused on the following reaction: $\text{FBC}^- + \text{Q} \rightarrow \text{FBC} + \text{Q}^-$, where FBC/FBC⁻ represent the neutral/reduced forms of free base chlorin and Q/Q⁻ the *p*-benzoquinone molecule and *p*-benzosemiquinone radical anion, respectively. Based on the computational evidence, it is concluded that the associated ultrafast ET reaction for the [FBC/Q]⁻ bioexciplex can essentially be seen as a radiationless transition mediated by a CI. Potential energy curves (PECs) for two low-lying doublet states of the [FBC/Q]⁻ bioexciplex have been built at the CASPT2(5,5) level (four orbitals of FBC and one of Q) along the intermolecular distance R for different parallel arrangements, maintaining the structures fixed at the respective ground-state of the interacting moieties. At the infinity separation of the monomers, the energy difference between the two lowest states of the bioexciplex corresponds precisely to the energy difference of the vertical electron affinity computed for Q and FBC, about 0.7 eV, being the (FBC⁻ + Q) asymptotic limit above the lowest limit (FBC + Q⁻). The CASSCF wave functions of FBC⁻ and Q⁻ are basically described by a single configuration with the extra electron located in the LUMO-like natural orbital. Structures that facilitate the overlap between the two LUMOs lead therefore to a more pronounced interaction and the occurrence of the state-crossing, which may become absent when the orbital overlap decreases too much. On the contrary, the PECs do intersect at the other orientations, between 3.3 and 4 Å. The actual crossing point should hopefully correspond to a CI and its geometry most probably should display for the FBC skeleton a distortion from planarity. This finding reinforces previous suggestions on the role that crossing seams play in the ultrafast ET processes occurring ubiquitously in many biochemical systems. They computed PECs (see Ref. 5) do not represent the ultrafast ET mechanism but demonstrate that the involvement of CIs in the ET process is possible for certain donor-acceptor orientations. At short intermolecular distances the FBC⁻ + Q system becomes the ground state, which is connected adiabatically to FBC + Q⁻ at infinity. Depending on the topology of the actual CI, both minima may be populated. Ideally, such topology should be favoring population of the charge-transfer state (FBC + Q⁻). A number of crossing and recrossings probably occur around the CI region leading to the fulfillment of ET. By a subsequent increase of the intermolecular distance the products of the ET reaction, neutral FBC and reduced quinone Q⁻, are ultimately collected. The primary reduced quinone is then ready to transfer an electron to the secondary quinone and Pheo (FBC in our model) is willing to be involved again in new photoinduced charge-transfer process.

A similar scheme has been applied to DNA base monomers. Potential energy curves for the lowest doublet states of the cytosine homodimer anion, CC⁻, at different arrangements have been computed at the BSSE-

CASPT2(12,12) level of theory in order to get insight into the mechanism of charge transfer along the DNA double helix. Taking into account the results obtained for the anionic species and those computed for the neutral dimer CC, a number of relevant features can be extracted, leading us toward an improved global understanding of the cytosine homodimer behavior under different conditions common in DNA: UV-Vis irradiation and reductive stress. The face-to-face arrangement has been displayed in Figure 3, although similar conclusions can be obtained for instance by using the B-DNA conformation.

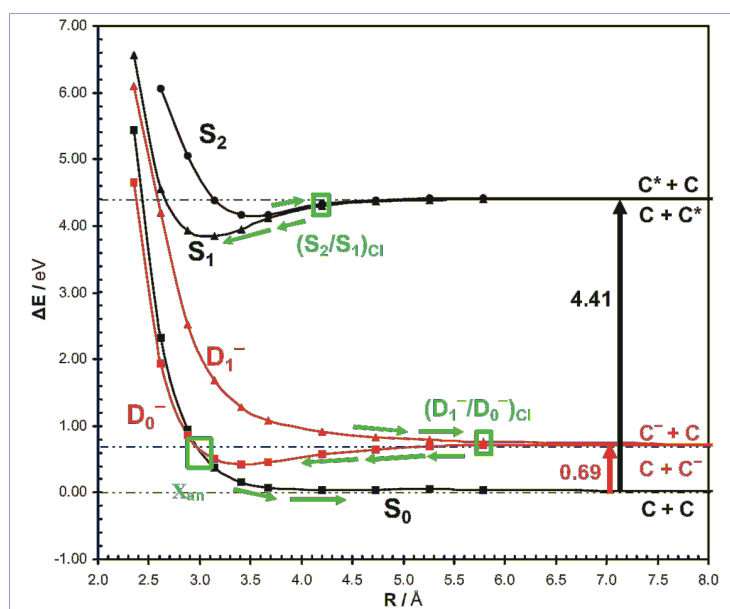


FIGURE 3. BSSE-CASPT2 potential energy curves, built respect to the intermonomer distance (R), of the reduced (D_0^- , D_1^-), and neutral (S_0 , S_1 , S_2) cytosine homodimer in different excited states. The conical intersection (CI) between the ground and lowest excited state of CC^- , and the two lowest excited states of CC , are represented by $(D_1^-/D_0^-)_{CI}$, and $(S_2/S_1)_{CI}$, respectively. The crossing point between D_0^- (CC^-) and S_0 (CC) is denoted by X_{an} .

By inspection of Figure 3 it is concluded that the CC and CC^- systems are unbound and bound, respectively, in their ground state. The negatively charged system has a minimum within the intermolecular range 3.1–3.4 Å, close to the typical measured distance in DNA, and a binding energy of 0.26 eV. Formation of stable excimer-like structures is revealed to be an intrinsic property of cytosine, enabling the basis to rationalize at the molecular level the distinct photophysics of related oligonucleotides,⁴ providing also the framework to assemble the process of charge migration within the same basic unique scheme or unified theory. Whereas energy transfer between excited states of the neutral system is mediated by the conical intersection $(S_2/S_1)_{CI}$, a similar role can be attributed to the structure $(D_1^-/D_0^-)_{CI}$, which connects the low lowest states of the anionic system. In this context, we propose a *micro-hopping* mechanism for charge transport along a single strand of cytosine molecules formulated as a sequence of steps. Starting from an arrangement of π -stacked monomers at typical intermolecular distances of 3.1–3.4 Å, and considering the inherent flexibility of the DNA helix, in each step the distance between two adjacent nucleobases may increase and decrease by means of a thermally activated process, leading the system to reach accessible CIs between the lowest doublet states of the system and to transfer the excess electron (or hole charge) between the two molecules in an ultrafast manner. Therefore, charge migrates from an initial charged nucleobase to the adjacent moiety in one step and between the initial and final charged DNA-sites in a sequence of such steps, making so possible the charge-transfer process along the strand. In any case, and as a working hypothesis under study in our group, a step comprising charge migration between adjacent alike nucleobases, *i.e.*, cytosine-cytosine here, is expected to be less favorable than that taking place between dissimilar nucleobases, because in the former case the conical intersection is found at relatively large intermolecular distances. Within the proposed *micro-hopping* mechanism, and taking into account the existence of a bound structure in the charged cytosine homodimer, the current accepted view that

adjacent π -stacked charged alike nucleobases behave as potential-energy wells where the charge is somewhat trapped, and consequently the charge-transfer process is hindered, is fully confirmed.

Photoreactivity in DNA: Formation of Mutated Pyrimidine Dimers

The UV irradiation of many microorganism leads to mutations, in many cases photodamage in DNA centers, that in most of the occasions have lethal consequences.²¹ Although many different excited states might be involved in such processes, we will focus here in the role of singlet and triplet states. After the light absorption to the main singlet excited states has taken place, the excited state reactions will occur along the singlet manifold in competition with internal conversion processes to the electronic ground state. On the other hand, DNA triplet excited states will be populated through ISC mechanisms. During the last decade the role of triplet states in DNA chemistry, in particular on the formation of Pyr \leftrightarrow Pyr complexes, has been highlighted since it was first suggested.²² Despite the fact that triplet formation has a low quantum yield, the longer-lived triplet states are crucial in the photochemistry and photophysics of DNA components, since they induce mutations at the bipyrimidine sites under triplet photosensitization conditions. Another via for triplet state Pyr-formation is also possible. Indeed, as it has been documented in detail for cytosine¹² and uracil,²³ along the ultrafast internal conversion, the lowest triplet state can be populated by an intersystem crossing (ISC) mechanism. On the other hand, thymine dimerization has recently been determined²⁴ to be an ultrafast reaction along the singlet manifold, although no evidence for thymine excimers could be earlier recorded. It is clear that the origin and mechanisms of both excimer and photodimer formation at the molecular level are controversial and poorly understood.

One of the main motivations for studying the excited states of nucleic acids relies on the observation that UV illumination causes mutations due to photochemical modifications, the most common involving cycloaddition reactions of pyrimidines thymine and cytosine. Although the production of T-T cyclobutane dimers is most frequent, those involving C more often lead to mutation. The singlet excimer state has been suggested as a precursor to photodimerization by some authors.^{3,25} Excimer emission has indeed played an extensive role in the study of excited-state properties of nucleic acid polymers and oligomers, wherein the planar base molecules are stacked upon excitation. Thus the term *static excimer* has been suggested in order to describe pairs of aromatic molecules which are in contact at the time of absorption.³ The close proximity of the two chromophores in a system that forms *static excimers* can lead to changes in absorption and differences in fluorescence excitation spectra, two effects that are observed in base multimers. The existence of a singlet excimer discussed above can be extended to the two lowest triplet states of the cytosine-cytosine system. The binding energy for the lowest triplet state computed at the CASPT2 level (plus BSSE) is 0.22 eV. Consequently, it is concluded that the triplet excimer is bound, although the binding energy is reduced about 60% with respect to singlet excimer. The possibility of excimer formation arises from the Watson-Crick structure in which hydrogen-bonded pairs A-T and G-C are situated inside a double helix, the backbone formed by two sugar-phosphate chains. One turn of the helix involves ten base pairs and is 34 Å high. Thus, the interplanar distance between neighboring base pairs is about 3.4 Å, a value which is often found in excimer-type organic crystals.¹ The structure for the locally excited state relative minimum on S₁ and T₁ computed at the CASPT2 level with respect to the intermolecular distance in the face-to-face arrangement (maintaining the monomers at the optimized ground-state geometry) shall be accordingly denoted as ¹(LE) and ³(LE), respectively. Taking into account the inherent flexibility of the DNA and related oligonucleotides, competitive ¹(LE)-type parallel orientations might be present at the time of UV-irradiation. Because of the increased stability of the lowest excited state, geometries around the ¹(LE)-type structure can be considered as the best candidates as precursors of photodimers. It seems that the ideal twist angle between successive base pairs makes the geometry of the B-DNA (and A-DNA) nonreactive. According to recent experimental evidence, the static Pyr-Pyr conformations and not conformational motions after photoexcitation determines the formation of (Pyr \leftrightarrow Pyr) photoproducts. Within the model proposed by Schreier *et al.*,²⁴ the relatively smaller degree of flexibility of A-DNA compared to B-DNA to achieve the right orientations that become prone to react has been related to the greater resistance of A-DNA to (Pyr \leftrightarrow Pyr) formation. As shown by these authors, dimerization occurs only for thymine residues that are already in a reactive arrangement at the instant of excitation because the rate of formation by favorably oriented thymine pairs is much faster than the rate of orientation change. A similar situation can therefore be assumed in cytosine oligomers. From the results compiled so far, the ¹(LE)-type cytosine excimer is revealed as a reactive intermediate, possible source of the cyclobutane cytosine (CBC) dimer photoproduct, and consequently the ¹(LE) excimer has been taken as the starting point for the study of the dimerization reaction occurring along the singlet manifold. Similarly, the ³(LE)-type cytosine excimer has been taken as the starting structure to study the

reactivity of the system along the triplet manifold. It should be however kept in mind that the magnitude of the spin-orbit coupling (SOC), which is directly related to the efficiency of the ISC process, would strongly be affected by the actual environment of the biopolymer.

MEP computations from $^3(\text{LE})$ lead directly in a barrierless fashion to the triplet step-wise intermediate $^3(\text{SWI})$, which is characterized by the formation of a single covalent bond between the $\text{C}_6\text{-C}_6$. Remarkably, at the optimal structure $^3(\text{SWI})$ the ground state of the system becomes degenerate. In other words, the triplet state is coincident with a triplet-singlet crossing, $(\text{T}_1/\text{S}_0)_\times$, a region of the hypersurface where decay to the ground state becomes particularly favored. The $^3(\text{SWI})$ structure cannot be considered an excimer but an intermediate toward the formation of CBC. The $^3(\text{SWI})$ state lies 2.70 eV above two ground-state cytosine molecules. The latter can be considered a lower bound for the triplet energy of cytosine and in DNA. It can be envisaged that exogenous photosensitizers could populate the relaxed triplet state of the monomer, which will subsequently evolve toward $^3(\text{SWI})$ and then toward the formation of the mutated dimers. Thus, the required energy can be related to the threshold observed experimentally for a given compound to become a potential DNA photodamager via $(\text{C}\langle\rangle\text{C})$ or $(\text{T}\langle\rangle\text{T})$ formation. The computed result for the $^3(\text{SWI})$ structure of cytosine is totally consistent with the triplet energy of thymine in DNA²⁶ deduced experimentally, 2.80 eV.²⁷ The intermediate labeled $^3(\text{SWI})$ represents thus a channel for photodimer formation from the triplet state of π -stacked cytosine (and presumably also for thymine) in DNA and provides the basic understanding of potential phototogenotoxicity via triplet-triplet sensitization.

Ongoing work is in progress to elucidate the mechanism of cytosine photodimer formation along the singlet manifold. Taking into account the seminal work reported by Bernardi, Olivucci, and Robb in 1990 on predicting forbidden and allowed excited-state 2+2 cycloaddition reactions of two ethene molecules,²⁸ one would expect a CI to be the via of decay toward ground-state CBC from the relaxed singlet excimer. It is clearly verified so far that MEP computations from the $^1(\text{LE})$ state lead to such stationary (relaxed) excimer. The process in the singlet manifold is also expected to follow a steepest descent path as it occurs along the triplet hypersurface, although further details on the mechanism have to wait until the CI structure is fully characterized. Thus, the current view supports the hypothesis that the dimerization photoreaction of two cytosine molecules occurs barrierless, both on the singlet and triplet hypersurfaces. It would depend of the experimental conditions whether the singlet or triplet mechanism becomes activated, fully operative or even competitive with each other. The different mechanisms proposed in the literature involve singlet and triplet states of the monomers and vertical stacking to account for dimerization in solution and solid state, respectively. All those are here supported on the basis of CASPT2 results. The efficiency of the photodimerization would markedly depend on the experimental conditions (solvent, aggregation conditions, pH, degree of hydration), the sequence of nucleotides, and the type (A-, B- C-like) of DNA conformation.^{22,24} In fact, if dimer formation occurs with reasonable yields between monomeric solute molecules in solution, the dimer must have a triplet precursor, because singlet lifetimes simply are not long enough to permit excited bimolecular reactions to occur.²⁹ To summarize, theory predicts that the photoinduced reactions both on the singlet and triplet hypersurfaces are essentially barrierless and singlet and triplet excimers play an active role in the photophysics outcome and in the photochemical properties of cytosine-containing biopolymers. In particular, an *ultrafast* decay of the triplet state to yield the corresponding ground-state cyclobutane dimer is expected under appropriate conditions. The present results also offer a nice rationale to the known fact that pyrimidine dimers are formed under triplet photosensitization conditions.²²

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support is acknowledged from projects CTQ2004-01739 and CTQ2007-61260 of the Spanish MEC/FEDER and GV06-192 of the *Generalitat Valenciana*.

REFERENCES

-
1. J. B. Birks, *Rep. Prog. Phys.* **38**, 903 (1975).

-
2. W. Klöpffer, *Intramolecular Excimers*. In: *Organic Molecular Photophysics*, J. B. Birks, Ed., Interscience, London, p 35.
 3. C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, and B. Kohler, *Chem. Rev.* **104**, 1977 (2004).
 4. G. Olaso-González, D. Roca-Sanjuán, L. Serrano-Andrés, and M. Merchán, *J. Chem. Phys.* **125**, 231102 (2006).
 5. G. Olaso-González, M. Merchán, and L. Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. B* **110**, 24734 (2006).
 6. L. Serrano-Andrés and M. Merchán, *Photostability and Photoreactivity in Biomolecules: Quantum Chemistry of Nucleic Acid Base Monomers and Dimers*. In: *Radiation Induced Molecular Phenomena*, J. Leszczynski and M. Shukla, Eds. Springer, 2007.
 7. K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, and B. O. Roos, *J. Chem. Phys.* **96**, 1218 (1992).
 8. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, and B. O. Roos, *J. Chem. Phys.* **98**, 3151 (1993).
 9. B. O. Roos, K. Andersson, M. P. Fülcher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, and M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* **93**, 219 (1996).
 10. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, and A. C. Borin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8691 (2006).
 11. M. Merchán and L. Serrano-Andrés, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8108 (2003).
 12. M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. A. Robb, and L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1820 (2005).
 13. M. P. Fülcher and B. O. Roos, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2089 (1995).
 14. R. Plessow, A. Brockhinke, W. Eimer, and K. Kohse-Höinghaus, *J. Phys. Chem. B* **104**, 3695 (2000).
 15. P. R. Callis, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **34**, 329 (1983).
 16. J. Eisinger, M. Guéron, R. G. Shulman, and T. Yamane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 1015 (1966).
 17. R. A. Marcus, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **15**, 155 (1964).
 18. A. Dreuw, G. A. Worth, L. S. Cederbaum, and M. Head-Gordon, *J. Phys. Chem. B* **108**, 19049 (2004).
 19. P. F. Barbara, T. J. Meyer, and M. A. Ratner, *J. Phys. Chem.* **100**, 13148 (1996).
 20. L. Blancafort, F. Jolibois, M. Olivucci, M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 722 (2001).
 21. K. H. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11 (1997).
 22. J. Cadet and P. Vigny, *The Photochemistry of Nucleic Acids*. In: *Bioorganic Photochemistry*, H. Morrison, Ed., Wiley, New York, 1990.
 23. T. Climent, R. González-Luque, M. Merchán, and L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* **441**, 327 (2007).
 24. W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, and B. Kohler, *Science* **315**, 625 (2007).
 25. V. I. Danilov, O. N. Slyusarchuk, J. L. Alderfer, J. J. P. Stewart, P. R. Callis, *Photochem Photobiol.* **59**, 125 (1994).
 26. D. Roca-Sanjuán, G. Olaso-González, I. González-Ramírez, L. Serrano-Andrés, and M. Merchán, To be published.
 27. F. Bosca, V. Lhiaubet-Vallet, M. C. Cuquerella, J. V. Castell, and M. A. Miranda, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6318 (2006).
 28. F. Bernardi, M. Olivucci, and M. A. Robb, *Acc. Chem. Res.* **23**, 405 (1990).
 29. J. Eisinger and R. G. Shulman, *Science* **161**, 1311 (1968).

**"DNA Nucleobases Properties and Photoreactivity: Modeling
Environmental Effects".**

**D. Roca-Sanjuán, Gloria Olaso-González, M. Rubio, P. B. Coto,
M. Merchán, N. Ferré, V. Ludwig, and L. Serrano-Andrés**
Pure & Applied Chemistry, 81, 743-754 (2009)

DNA nucleobase properties and photoreactivity: Modeling environmental effects*

Daniel Roca-Sanjuán¹, Gloria Olaso-González¹, Mercedes Rubio¹,
Pedro B. Coto¹, Manuela Merchán¹, Nicolas Ferré²,
Valdemir Ludwig³, and Luis Serrano-Andrés^{1,‡}

¹*Institute of Molecular Science, University of València, Apartado de Correos 22085, ES-46071 València, Spain;* ²*Universités d'Aix-Marseille I, II et III-CNRS, UMR 6264: Laboratoire Chimie Provence, Theoretical Chemistry, F-13397 Marseille Cedex 20, France;* ³*Department of Physics, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul CP 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil*

Abstract: The accurate ab initio quantum chemical (QM) method multiconfigurational second-order perturbation (CASPT2)/complete active space self-consistent field (CASSCF) has been used in conjunction with molecular mechanics (MM) procedures to compute molecular properties and photoinduced reactivity of DNA/RNA nucleobases (NABs) in isolation and within a realistic environment, in which the double helix strand, the aqueous media, and the external counterions are included. It is illustrated that the use of an MM model is helpful both to account for short- and long-range effects of the system surrounding the QM molecular core and to provide the proper structural constraints that allow more accurate QM geometry determinations.

Keywords: quantum chemistry; solvent effects; photochemistry; DNA bases; QM/MM.

INTRODUCTION

In parallel to an intense period of experimental activity [1], the last few years have known a growing number of theoretical studies on the properties and photoreactivity of DNA components, in particular, the pyrimidine and purine nucleobases (NABs): uracil (U), thymine (T), cytosine (C), adenine (A), and guanine (G), as well as of close related derivatives and analogous, as monomers or dimers [2]. The use of modern quantum chemical (QM) methods for ground and excited states has enabled the accurate determination of properties such as ionization potentials (IPs) or electron affinities (EAs) (see, e.g., [3,4]), ground-state reactivity [5,6], and more recently excited-state reactivity, including excimer formation, photochemical dimerization, and NABs-photopharmacophore adduct formation [7–9]. In particular for excited states, where the description of states degeneracy (in general conical intersections, CIs) is required, the multiconfigurational approaches have been the protagonists of the achievements, in particular the ab initio complete active space self-consistent field (CASSCF) and the multiconfigurational second-order perturbation (CASPT2) methods [10–13], and to a minor extent other multiconfigurational procedures such as the combined density functional theory/multireference configuration interac-

*Paper based on a presentation at the 19th International Conference on Physical Organic Chemistry (ICPOC-19), 13–18 July 2008, Santiago de Compostela, Spain. Other presentations are published in this issue, pp. 571–776.

‡Corresponding author: Luis.Serrano@uv.es

tion (DFT/MRCI) approach [14] and the ab initio CASSCF/MRCI method [15,16]. It has been clearly shown that only the full account of the electronic correlation energy can provide results accurate enough to understand the chemical problem, and therefore the use of expensive QM methods and the corresponding limitation in the affordable molecular-size systems can be understood. Most of the experimental results to be rationalized have been, however, obtained in solvated—aqueous in general—environments, or correspond to measurements of oligonucleotide or DNA strands in different media. Thus, there is a clear necessity to include the effects of the environment and see how it modifies the accurate QM results obtained for the isolated system, which can, on the other hand, be safely compared with data in gas phase or molecular beams.

The most comprehensive theoretical procedures to deal with the effects of the surrounding environment in chemical processes involve the coupling of the QM molecular core with a modeling of the external effects by means of molecular mechanics (MM) procedures that take into account dielectric, electrostatic, and steric interactions as well as the dynamic aspects of the problem. In order to tackle the issue of large systems at a reasonably computational cost, QM/MM methods represent, perhaps, one of the best alternatives. However, it has to be clear that these hybrid methods work because of error cancellations that are able to minimize the unbalanced description performed in the frontier region as well as in the non-symmetrical evaluation of the interactions in the QM and MM regions. Since their initial formulations [17], the QM/MM procedures in their many derivations (see, e.g., some recent reviews in refs. [18,19]) have been largely developed to treat many different chemical problems in organic chemistry, liquid-phase organic and organometallic chemistry, biochemistry, solid-state chemistry, and, only recently, photobiology (see, e.g., [20]). In the specific case of the DNA, QM/MM studies have been carried out mainly to analyze enzymatic, reactivity, or charge-transfer (CT) processes in the ground state (see, e.g., [21–24]), and few to study excited-state phenomena [25], whereas, as far as we know, the present one is the first report in which the employed QM approach fully includes on the excited state the electronic correlation energy (necessary to obtain quantitative answers) through the CASPT2 approach [26–29]. Our present goal is to illustrate, with a survey of examples, the capability of the approach to provide answers in the field of DNA properties, reactivity, and, especially, photoreactivity. Many of the examples shown here are parts of a more comprehensive ongoing study that is currently being developed on the DNA photoreactivity addressed to complement our previous studies on the isolated systems [30]. In particular, we will first discuss the oxidative and reductive capabilities of the NABs by analyzing their IPs and EAs, from the monomer to the nucleoside and nucleotide, focusing on cytosine, studying its IPs and EAs in isolation and embedded in a DNA strand, which will be modeled with the QM/MM methodology. Secondly, the use of QM/MM as a tool to provide proper structural constraints shall be analyzed for geometry optimization problems by studying the photoreversibility of the cyclobutane cytosine (CBC) dimer (C<>C) as an isolated dimer and that confined in a DNA strand. Finally, the emissive and nonadiabatic relaxation processes of a DNA analogous, 2-aminopurine, in the gas phase and solution will be discussed in the context of a solvation model. Unless indicated, all reported calculations used the MOLCAS QM package [31,32]. In the case of the QM/MM calculations, MOLCAS is linked to a modified version of the Tinker MM package [33].

METHODOLOGY

The QM/MM scheme employs as QM core the ab initio CASPT2//CASSCF multiconfigurational approach, a method that has repeatedly proved its accuracy in all types of electronic structure calculations and that is especially well suited to compute excited states [26–30,34–39]. The CASSCF level of theory was employed for the geometry optimizations, and dynamic electron correlation was taken into account perturbatively at the second-order level through the CASPT2 method. One-electron basis sets of atomic natural orbital (ANO) type ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] (dimers) and ANO-L

C,N,O[4s3p1d]/H[2s1p] (monomers) were used throughout [31,32]. More specific details of the QM methodology, such as active spaces, will be mentioned when required.

The employed QM/MM strategy is based on an standard electrostatic embedding approach [40], using a hydrogen link atom scheme [41] to describe the frontier region placed at the glycosidic bond of the nucleoside (see Fig. 1). The MM subsystem has been represented using the AMBER99 forcefield [42]. Both subsystems (QM and MM) interact in the following way: (a) the QM wave function is polarized by all the MM point charges, (b) stretching, bending, and torsion potentials involving at least one MM atom are described at the MM level, and (c) standard van der Waals potentials are used to represent the interaction between atom pairs (QM-MM) separated by more than two bonds. Therefore, the Hamiltonian used in the computations takes the following form:

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{QM}} + \hat{H}_{\text{MM}} - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^Q \frac{q_j}{r_{ij}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^Q \frac{Z_i q_j}{R_{ij}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{frontier}} \quad (1)$$

where \hat{H}_{QM} is the Hamiltonian of the QM subsystem in vacuo, \hat{H}_{MM} is the Hamiltonian of the MM subsystem computed using the AMBER force field, and the remaining four terms are the interacting QM/MM Hamiltonian, with the first two terms comprising the electrostatic interactions (polarization of the wavefunction by the MM charges and Coulomb term between QM and MM nuclei, that in the optimizations carried out have been approximated using the electrostatic potential fitted (ESPF) operator method [43]), the third one corresponding to the van der Waals (vdW) interaction term computed using the definition of the AMBER force field, and the last one containing the terms needed for a proper description of the frontier within the hydrogen link-atom scheme. Within this model, the MM charges remain constant through the computation, and no polarization of the MM region is taken into account with an explicit term (yet polarization is included in a mean-field way in the parametrization of the AMBER point charges [42]). During the optimizations, the MM region surrounding the QM subsystem within

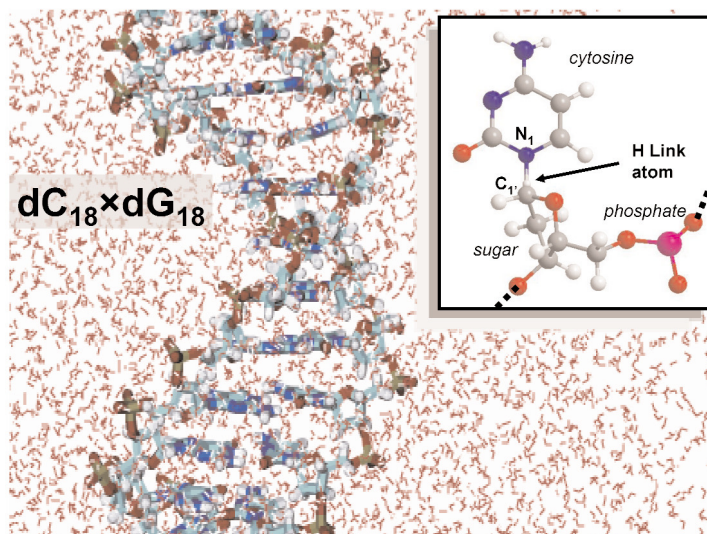


Fig. 1 An 18-base-pair long double helix of poly(C)-poly(G) (dC₁₈ × dG₁₈) surrounded by water molecules and the definition of the hydrogen link atom in the *N*-glycosidic bond between the N₁ of cytosine and C₁' of sugar cycle.

5 Å has been allowed to relax using the microiterations technique (see, e.g., [44]). Examples of successful QM/MM applications on fast chemical processes in biological compounds can be found in the literature [45–47]. All the new computations reported here have been carried out using version 7.3 of the MOLCAS package [31,32,48].

RESULTS AND DISCUSSION

Ionization potentials and electron affinities of cytosine in DNA

The electron donor and acceptor abilities of the DNA and RNA subsystems such as NABs, nucleosides, nucleotides, or a pair of stacked bases are crucial to understand a great amount of phenomena related to DNA (see, e.g., [3–6,30,49–51]). Recently, we applied high-level QM ab initio coupled-cluster (CC) and multiconfigurational perturbation theory methods (CASPT2) [26,52] to compute the vertical and adiabatic ionization potentials (VIPs and AIPs, respectively) and electron affinities (VEAs and AEAs, respectively) of the canonical RNA and DNA bases, uracil, thymine, cytosine, adenine, and guanine in vacuo, establishing theoretical reference values for these properties at a level of theory not reported before [3,4]. The sequence of VIPs was found to be $U > T > C > A > G$ covering the range of energies 9.42–8.09 eV, with uracil and guanine being the least and most favorable, respectively, for electron withdrawal, a trend that is maintained for the adiabatic property with a decrease in the energetic domain down to 9.12–7.65. The values are just in the experimental range for the vertical values and slightly lower for the adiabatic ones. In the case of VEAs (a poorly known property), the opposite trends as for IPs are obtained: guanine appears to be the least favorable to electron attachment (–1.14 eV), followed by adenine (–0.91 eV), cytosine (–0.69 eV), uracil (–0.61 eV), and thymine (–0.60 eV). As a consequence of the geometry relaxation of the charged systems that is taken into account in the adiabatic properties, the AEAs become closer to positive energy values. Adenine becomes the NAB with the most negative AEA, –0.57 eV, followed by guanine, whose energy increases to –0.35 eV, whereas cytosine, thymine, and uracil become very close to zero. In order to determine the role of the sugar and phosphate moieties and the source of the lowest IP in nucleosides and nucleotides, the lowest VIPs of 2'-deoxythymidine 5'-monophosphate (dTMP[–]) and 2'-deoxyguanine 5'-monophosphate (dGMP[–]) were determined at the CASPT2//MP2 level of theory [49,53]. In all cases, and independently of the conformation, the lowest ionization channel is found related to a π -orbital of the NAB, an established concept [54] that had been wrongly questioned on the basis of DFT calculations [55]. The effect of adding a sugar group to the isolated NAB makes the VIP decrease in the thymine nucleoside by near 1 eV, whereas a further 3 eV lowering is observed (down to 6.0 eV) in the nucleotide as the negatively charged phosphate moiety is incorporated.

In a step toward the understanding of DNA behavior in the common cellular conditions under oxidative and reductive stress, it is of great importance to consider the effect of the medium surrounding the subsystems previously studied in vacuo. Therefore, we have carried out computations of the VIP, AIP, VEA, and AEA of NABs, starting with cytosine, applying a QM/MM approach to a system of one cytosine molecule embedded in a 18-base-pair long double helix of poly(C)-poly(G) (hereafter $dC_{18} \times dG_{18}$) surrounded by water molecules (see Fig. 1). In this initial model (to be followed by more extensive calculations), the sugar and phosphate moieties are treated at the MM level and we focus only on the IPs related with the NAB. Table 1 compiles the six low-lying IPs of cytosine in vacuo and in $dC_{18} \times dG_{18}$. The same level of theory, CASPT2(IPEA = 0.25)/ANO-L 431/21//CASSCF/ANO-L 431/21, is employed for the QM calculations in both cases [3,52]. The active space comprises all the π system plus the two in-plane oxygen and nitrogen lone-pair orbitals, conforming a space of 14 electrons distributed in 10 orbitals (14/10). The character of the related state of the cation is described by the type of molecular orbital (MO) where the unpaired electron is essentially placed. All the computed cation states are higher in energy at the molecule ground-state geometry when the double strand and the aqueous media are taken into account, except the π_2 -state which becomes the cation state with the lowest VIP

in the QM/MM calculation. The difference between the lowest-lying VIP in vacuo and in the medium is therefore 0.66 eV, being less favorable to detach an electron from a cytosine molecule in the hydrated poly(C)-poly(G) double strand. Unlike what occurred in the isolated nucleoside and nucleotide, the IPs of embedded NABs do not decrease so dramatically as compared to the isolated values. One of the reasons is the balance imposed by the counterions that approach the negatively charged phosphate group. The states related with the oxygen and nitrogen lone-pair MOs undergo the largest increases in energy, especially that of the oxygen which becomes in the $dC_{18} \times dG_{18}$ model higher in energy than the n_N -state (cf. Table 1). Since these lone pairs are implied in the H-bonds between cytosine and its complementary NAB (guanine) in the double helix, their electron density around the nitrogen and oxygen atoms is lower and the electron detachment from their lone pairs is less favorable.

Table 1 Computed VIPs (in eV) of cytosine in vacuo and embedded in a double helix of hydrated $dC_{18} \times dG_{18}$.

State	In vacuo ^a	DNA
π_1	8.73	9.66
π_2	9.49	9.39
π_3	11.84	12.35
πNH_2	12.71	13.13
n_O	9.42	10.83
n_N	9.88	10.79

^aRefs. [3,49].

Table 2 compiles the low-lying vertical and adiabatic IPs and EAs of cytosine in vacuo and inside $dC_{18} \times dG_{18}$. As in the case of the VIPs, the CASPT2(IPEA=0.25)//CASSCF/ANO-L 431/21 methodology has been employed for the QM calculations of AIPs, VEAs, and AEAs. When the DNA and the water environment are taken into account, all NAB VIPs have been found larger than for the isolated case. Additionally, the lowest VIP in the neutral embedded molecule at 9.39 eV corresponds to the π_2 orbital, that is, the HOMO-1 of the isolated system. When relaxing the geometry of the embedded system the π_1 (HOMO in the isolated cytosine) state of the cation becomes more stable, and therefore the AIP, 8.35 eV, is 0.26 eV lower than the value in vacuo, with a structure inside the DNA in which the amino group leaves the planarity displayed in vacuo. In the case of the VEAs, the presence of the environment increases the value 0.35 eV, still being negative. The geometrical relaxation increases the gas-phase EA by 0.65 eV from the vertical value, but it has even much more dramatic consequences for cytosine in DNA, making the attachment of an electron finally favorable in the biological environment. The AEA becomes positive, 0.69 eV, whereas the molecule acquires a nearly planar arrangement, in contrast to the ring distortion computed in vacuo.

As mentioned above, the present study will be complemented by computing all the NABs and enlarging the fragment included in the QM part. The CASPT2 method was also employed with systems of two adjacent cytosine–cytosine and adenine–cytosine NABs in a face-to-face conformation or in the B-form of DNA to compute the VIP and the VEA [50,51]. As a consequence of the stacking interactions between the NABs, stabilizations between 0.3 and 0.6 eV occur in the cationic and anionic systems. All these effects affect the acceptor and donor capabilities of the different subsystems of DNA and therefore represent the intrinsic abilities of these molecules in the process of electron attachment or detachment, having important consequences in the description of phenomena as CT along the DNA strand or in-site mutations [2,5,6,50]. Continuous efforts to provide accurate theoretical values with reliable methods such as CASPT2 and proper environment representation are required in the field.

Table 2 Computed lowest vertical and adiabatic IPs and EAs (in eV) of cytosine in vacuo and embedded in $dC_{18} \times dG_{18}$.

	In vacuo	DNA
VIP	8.73 ^a	9.39 ^c
AIP	8.61 ^b	8.35 ^c
VEA	-0.91 ^b	-0.56
AEA	-0.26 ^b	0.69

^aRefs. [3,49].

^bCASPT2(IPEA=0.25)/ANO-L 431/21//CASSCF/ANO-L 431/21. See also refs. [3,4].

^cVIP from π_2 and AIP from π_1 .

Photoreversibility of cyclobutane cytosine (CBC) dimer: A QM/MM approach

Cyclobutane pyrimidine dimers (Pyr \leftrightarrow Pyr or CPDs) formed by adjacent pyrimidine bases were the first discovered environmentally induced DNA lesions [56,57], and they can be considered the most frequent adducts photoinduced in UV-irradiated cellular DNA [58,59]. Understanding the mechanism of Pyr \leftrightarrow Pyr production and reversibility could help to propose ways of protection of the cell against the photodamage or strategies to repair the photolesion and restore the pyrimidines to their native state, parallel to the mechanism of DNA-photolyase enzymatic repair. Recently, we have analyzed the molecular basis of the photoproduction of CBC dimer (C \leftrightarrow C or CBC) along the singlet and triplet manifold, proving the crucial role of excited stacked dimers (excimers) as precursors of the photolesion [8]. Whereas a singlet-triplet crossing (T_1/S_0)_X mediates the nonradiative deactivation toward the CBC dimer along a barrierless profile, the excimer has a highly stacked and bound face-to-face conformation in the singlet manifold such as the system has to overcome a barrier of 0.2 eV to reach the CI between the ground (S_0) and lowest singlet excited (S_1) states, (S_1/S_0)_{CI}, which connects the excimer and photoproduct. We have also explained the relationship between the efficiency of the production of the CBC dimer and the orientation of the pyrimidines at the time of irradiation with the relative position between the (S_1/S_0)_{CI} crossing and the excimers formed by the adjacent stacked NABs. Therefore, reactive orientations are those that at the time of light irradiation are close but energetically above the CI, and the yield of formation of each conformation will strongly depend on the dynamics of the DNA strand, whose flexibility allows for long-range nuclear motions. It is interesting to compare the reaction intermediate formed in the triplet manifold, in which only one C₆-C_{6'} intermonomer covalent bond is formed while C₅-C_{5'} remains separated 2.8 Å (C₅ and C₆ are the double C=C bond atoms in cytosine), with that in the singlet manifold, in which the intermediate complex at the CI have intermonomer C-C distances close to 2.2-2.3 Å. The singlet manifold intermediate undoubtedly requires a better stacked and restrained structure of the two monomers than in the case of the triplet manifold intermediate. This can be an explanation of the suggested predominance of the triplet mechanism in solution, where diffusion (and spin-orbit coupling) would basically control the photoreaction, whereas the singlet mechanism is proposed to be more important in a constrained environment such as DNA [8,60]. In a subsequent study [61], we have compared the intrinsic production of the photodimer of cytosine (CBC) and thymine (CBT) in the singlet manifold and we have found that, in thymine, even the conformation of the two NABs with the largest binding energy is energetically above the CI, which explains the higher reactivity of thymine in the process of photodimerization. We also have suggested that irradiation of the photoproduct can lead to the cleavage of the C₅-C_{5'} and C₆-C_{6'} bonds of the Pyr \leftrightarrow Pyr reversing thus the photolesion. This reversibility is less favorable in the case of thymine since it requires more energy.

Up to now, our studies of the NAB dimers were focused on the intrinsic mechanism of photo-production and photoreversibility of CBC and CBT dimers in vacuo. In order to determine the influence of the DNA environment on the photoreactivity of the dimers, we are currently carrying out calculations of the two pyrimidines embedded in the $dC_{18} \times dG_{18}$ double helix model employing QM/MM computational strategies. In the present report we would like simply to highlight one of the uses and advantages of the QM/MM methodology in the determination of molecular geometries and reaction paths, as well as to validate at this level the accuracy of the results obtained for the isolated system [8,61]. When determining the optimal geometry of the cytosine or thymine excimers in its lowest-excited singlet state we found out that, in order to prevent arrangements of the two monomers that could not possibly occur in DNA because of steric constraints, a designed practical solution was to work initially within the C_s symmetry. Such constraint was found preferable to other geometrical restrictions because it allowed explicitly the description of the conformations favorable for excimer and intermediate complexes formation. As an illustration we will show the connection between the low-lying S_1 singlet state of the CBC dimer and the face-to-face bound excimer conformation (C^*C), a reaction path which represents the photoreversibility mechanism of the lesion. Figure 2 displays the low-lying singlet excited states of the isolated cytosine dimer computed at the CASPT2//CASSCF(12,12)/ANO-S 321/21 level along the minimum energy path (MEP) of the S_1 state from the CBC dimer at its ground-state equilibrium geometry. The active space comprises 12 π -orbitals except the two π -MOs localized in the NH_2 fragments and the plus and minus linear combinations of the deeper all-in-phase π -MOs of the two cytosine molecules. The S_1 -MEP ends at the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$, and, close to MEP coordinate 4.5 au, shows a near-degenerate situation with the ground state which is closely related to the $(S_0/S_1)_{CI}$ CI structure. As the calculations are performed within the C_s symmetry, both states do not effectively cross, but the obtained structure is a good candidate as initial trial to search for a crossing at the CASPT2 level and with no symmetry restrictions, as it was performed in the previous study [8], despite the complexity of the calculations. For the sake of a more realistic description of the system, we introduced environmental effects through the QM/MM formalism, allowing also the pair of basis to move with no restrictions within the strands of the DNA model. We report in the present contribution the employment of the QM/MM methodology to study the photoreversibility of the CBC dimer using as a system the $dC_{18} \times$

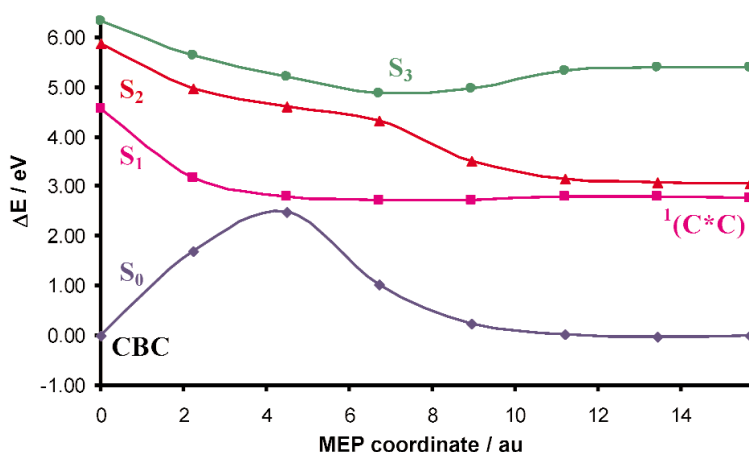


Fig. 2 Low-lying singlet excited states of the cytosine dimer computed at the CASPT2//CASSCF level along the MEP of the S_1 state from the CBC dimer at its ground-state equilibrium geometry. The S_1 -MEP ends at the relaxed excimer ${}^1(C^*C)$.

dG_{18} double helix presented above (see Fig. 1). Figure 3 displays the potential energy surfaces of the ground (S_0) and the lowest excited singlet (S_1) states of the cytosine dimer inside the chain $dC_{18} \times dG_{18}$ obtained along the geometry optimization process of the S_1 state of the CBC compound employing the QM/MM approach and the same ab initio level of theory. The starting structure corresponds to the ground-state equilibrium geometry of the CBC dimer where the adjacent cytosine molecules are linked through the C_5-C_5' and C_6-C_6' bonds. As in the case of the in vacuo CBC S_1 -MEP, the energy difference between S_0 and S_1 along the optimization path decreases progressively, and reaches a region where both states are degenerate ($\Delta E < 0.2$ eV). As can be readily seen in Fig. 3, the geometry of the system at this point is of rhomboid type in accordance with the structure of the $(S_0/S_1)_{CI}$ in the final unconstrained CASPT2 results for the isolated system [8], something that the purely C_s optimization could not provide.

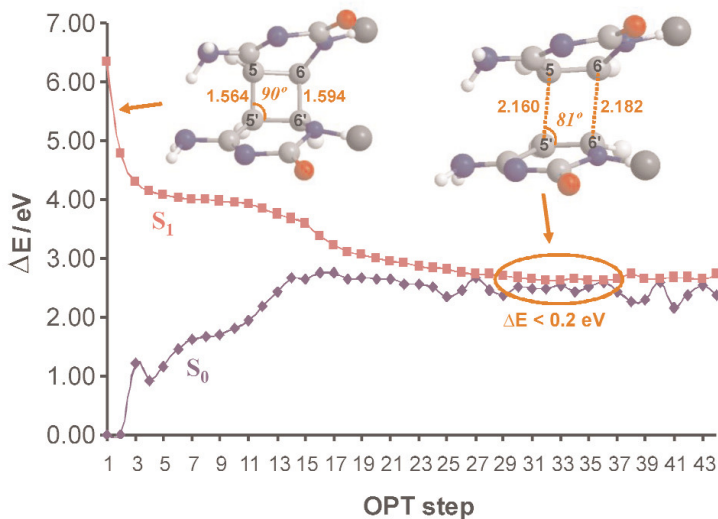


Fig. 3 Low-lying singlet excited states of the cytosine dimer inside the $dC_{18} \times dG_{18}$ double helix computed at the CASSCF level in the QM/MM approach along the optimization path of the S_1 state from the CBC dimer at its ground-state equilibrium geometry.

Emission and non-adiabatic decay of 2-aminopurine in the gas phase and water

2-Aminopurine is a constitutional isomer of adenine widely used as an emissive probe for monitoring DNA dynamics and conformational changes because, unlike adenine (6-aminopurine), it is highly fluorescent and minimally perturbs the DNA structure when substituting the natural NAB [62]. The modern description of the photochemistry of DNA NABs is based on recent works that explain the efficiency of radiationless decay between different electronic states by crossings of different potential energy hypersurfaces (PEHs), named conical intersections (CIs) (see, e.g., refs. [63,64]). These crossings behave as energy funnels where the probability for nonadiabatic, nonradiative jumps, that is, efficient internal conversion processes, is high [65,66]. Therefore, fluorescence quantum yields and excited lifetimes can be related to the nature of the paths and the barriers that the system has to surmount to reach the crossing seam. We recently explained the distinct photochemical behavior of the non-natural and highly emissive 2-aminopurine molecule and its weakly emissive natural isomer adenine in terms of

MEPs, reaction barriers, and accessibility of significant CIs [63,67]. Whereas adenine was shown to display a barrierless energy reaction path along its spectroscopic $\pi\pi^*$ state toward an accessible CI connecting the excited and ground (gs) states, and enabling an efficient, ultrafast non-radiative decay, the equivalent path for 2-aminopurine contained an energy barrier hindering the access to the CI, and consequently increasing the excited state lifetime and leading to emission. The environment plays a significant role in the emissive properties of 2-aminopurine. For example, its fluorescence yield increases dramatically as the solvent polarity increases. For its close 9-ethyl-2-aminopurine derivative, the quantum yield varies from 0.01 in the nonpolar solvent cyclohexane to 0.68 in water [68]. In terms of PEHs the increase of the fluorescence yield should mean that the accessibility of the radiationless decay funnel (i.e., the CI) is more difficult in the polar environment, increasing the state lifetime and the probability of emission from the state minimum. It would be significant to perform calculations mimicking the effects of the solvent that could help to reinforce the photochemical paradigm based on the CI-accessibility concept [63,64].

In order to understand the distinct relaxation and emission properties of 2-aminopurine, we have used the sequential Monte Carlo quantum mechanics (S-MC/QM) approach in which the hydrated environment is modeled by the inclusion of different shells of 400 water molecules mimicked by a distribution of point charges. Statistically uncorrelated solute-solvent configurations are first generated for the subsequent quantum mechanics calculations [69–71]. As a strategy we have employed the different points belonging to the MEP computed at the CASPT2//CASCF(16/13)/6-31G(d,p) level of theory for the isolated system in its initially populated $\pi\pi^*$ (L_a) excited state [63], and at each of such geometries the solvation has been simulated as described. The QM calculations employed the MOLCAS package [31,32], whereas the MC simulations used the DICE program [72]. More technical details can be found elsewhere [73]. Our CASPT2 results in the gas phase indicate that the MEP leads the system along the lowest singlet excited $\pi\pi^*$ state from the Franck–Condon region toward the minimum of the state, and further a barrier (computed as a transition state) of 2.4 kcal/mol has to be surmounted to reach the CI connecting with the ground state, ($gs/\pi\pi^*$)_{CI} [63]. In solution, whereas the MEP toward the state minimum remains barrierless, the barrier required to reach the CI increases to 5.5 kcal/mol, representing an enhancement of 3.1 kcal/mol from the gas-phase situation. The CI, which remains as a degeneracy in solution, decreases its energy with respect to the minimum in the polar media by 7.4 kcal/mol, but this fact has no consequences for the photophysics of the system because the importance relies in the net increase of the energy barrier, which makes the access to the CI less probable [73]. Within this context, it is understandable that emission quantum yields measured near 0.02 in nonpolar solvents increase to 0.68 in water [68]. This result is particularly important because it helps to firmly establish the validity of the CI concept in photochemistry. Previous models such as the proximity effect scheme would have related the fluorescence quenching (here in the gas phase) with the coupling of $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ states that transfer the energy to hot levels of the ground state, whereas the strong emission in water would be attributed to the destabilization (and subsequent poorer coupling) of the $n\pi^*$ state in the protonated environment [74]. As we showed previously [63], the $n\pi^*$ state remains in a totally different region of the configuration space, far from where most of the energy evolves to, therefore, it can hardly be attributed any role in the emissive properties. In contrast, we show that they can be explained just by considering the fate of the bright spectroscopic 1L_a $\pi\pi^*$ state and the corresponding barriers to access the CI that leads to the decay to the ground state. This is consistent with the relative values of dipole moments. A slightly lower dipole moment of the transition state with respect to the minimum causes its relative destabilization in its interaction with the solvent, increasing the energy barrier [73].

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support is acknowledged from projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingénio in Molecular Nanoscience of the Spanish MEC/FEDER and GVPRE-2008-059 of the

Generalitat Valenciana. P.B.C. acknowledges a “Juan de la Cierva” contract from the Spanish MEC, and V.L. thanks the Universitat de València for financial support.

REFERENCES

1. C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler. *Chem. Rev.* **104**, 1977 (2004).
2. See, e.g., J. Leszczynski, M. Shukla (Eds.). *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids. A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*, Springer, New York (2008).
3. D. Roca-Sanjuán, M. Rubio, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *J. Chem. Phys.* **125**, 084302 (2006).
4. D. Roca-Sanjuán, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. Rubio. *J. Chem. Phys.* **129**, 095104 (2008).
5. J. Leszczynski (Ed.). *Computational Molecular Biology*, Elsevier, Amsterdam (1999).
6. L. A. Ericsson (Ed.). *Theoretical Biochemistry. Processes and Properties in Biological Systems*, Elsevier, Amsterdam (2001).
7. G. Olaso-González, D. Roca-Sanjuán, L. Serrano-Andrés, M. Merchán. *J. Chem. Phys.* **125**, 231102 (2006).
8. D. Roca-Sanjuán, G. Olaso-González, I. González-Ramírez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 10768 (2008).
9. J. J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *J. Phys. Chem. B* **112**, 14002 (2008).
10. M. P. Fülischer, L. Serrano-Andrés, B. O. Roos. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 6168 (1997).
11. M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. A. Robb, L. Blancafort. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1820 (2005).
12. S. Perun, A. L. Sobolewski, W. Domcke. *J. Phys. Chem. A* **110**, 13238 (2006).
13. H. Chen, S. H. Li. *J. Chem. Phys.* **124**, 154315 (2006).
14. C. M. Marian. *J. Phys. Chem. A* **111**, 1545 (2007).
15. K. A. Kistler, S. Matsika. *J. Phys. Chem. A* **111**, 2650 (2007).
16. M. Barbatti, H. Lischka. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 6831 (2008).
17. A. Warshel, M. Levitt. *J. Mol. Biol.* **103**, 227 (1976).
18. H. M. Senn, W. Thiel. “Atomistic approaches in modern biology: From quantum chemistry to molecular simulations”, in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 268, M. Reiher (Ed.), p. 173, Springer, Berlin (2007).
19. H. Lin, D. G. Truhlar. *Theor. Chem. Acc.* **117**, 185 (2007).
20. A. Sinicropi, T. Andruniow, L. De Vico, N. Ferre, M. Olivucci. *Pure Appl. Chem.* **77**, 977 (2005).
21. A. R. Dinner, G. M. Blackburn, M. Karplus. *Nature* **413**, 752 (2001).
22. P. Lin, V. K. Batra, L. C. Pedersen, W. A. Beard, S. H. Wilson, L. G. Pedersen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 5670 (2008).
23. F. Masson, T. Laino, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, J. Hutter. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3443 (2008).
24. T. Kubar, M. Elstner. *J. Phys. Chem. B* **112**, 8788 (2008).
25. G. Groenhof, L. V. Schäfer, M. Boggio-Pasqua, M. Goette, H. Grubmüller, M. A. Robb. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6812 (2007).
26. K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B. O. Roos. *J. Chem. Phys.* **96**, 1218 (1992).
27. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, B. O. Roos. *J. Chem. Phys.* **98**, 3151 (1993).
28. B. O. Roos, K. Andersson, M. P. Fülischer, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán. *Adv. Chem. Phys.* **93**, 219 (1996).
29. M. Merchán, L. Serrano-Andrés. “Ab initio methods for excited states”, in *Computational Photochemistry*, M. Olivucci (Ed.), Elsevier, Amsterdam (2005).

30. L. Serrano-Andrés, M. Merchán. "Photostability and photoreactivity", in *Biomolecules: Quantum Chemistry of Nucleic Acid Base Monomers and Dimers*, in *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids. A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*, J. Leszczynski, M. Shukla (Eds.), Springer, New York (2008).
31. G. Karlström, R. Lindh, P.-Å. Malmqvist, B. O. Roos, U. Ryde, V. Veryazov, P.-O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrady, L. Seijo. *Comput. Mater. Sci.* **28**, 222 (2003).
32. V. Veryazov, P.-O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B. O. Roos. *Int. J. Quantum Chem.* **100**, 626 (2004).
33. TINKER, Software Tools for Molecular Design, version 4.2. J. W. Ponder, F. M. Richards. *J. Comp. Chem.* **8**, 1016 (1987).
34. L. Serrano-Andrés, M. P. Fülischer, B. O. Roos, M. Merchán. *J. Phys. Chem.* **100**, 6484 (1996).
35. J. Finley, P.-Å. Malmqvist, B. O. Roos, L. Serrano-Andrés. *Chem. Phys. Lett.* **288**, 299 (1998).
36. L. Serrano-Andrés, N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist. *J. Chem. Phys.* **108**, 7202 (1998).
37. A. C. Borin, L. Serrano-Andrés. *Chem. Phys.* **262**, 253 (2000).
38. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, R. Lindh. *J. Chem. Phys.* **122**, 104107 (2005).
39. M. Schreiber, M. R. Silva, S. P. A. Sauer, W. Thiel. *J. Chem. Phys.* **128**, 134110 (2008).
40. D. Bakowies, W. Thiel. *J. Phys. Chem.* **100**, 10580 (1996).
41. U. C. Singh, P. A. Kollman. *J. Comput. Chem.* **7**, 718 (1986).
42. J. P. Wang, P. Cieplack, P. A. Kollman. *J. Comput. Chem.* **21**, 1049 (2000).
43. N. Ferré, J. G. Ángyán. *Chem. Phys. Lett.* **356**, 331 (2002).
44. T. Vreven, K. Morokuma, Ö. Farkas, H. B. Schlegel, M. J. Frisch. *J. Comput. Chem.* **24**, 760 (2003).
45. P. B. Coto, A. Strambi, N. Ferré, M. Olivucci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17154 (2006).
46. A. Strambi, P. B. Coto, L. M. Frutos, N. Ferré, M. Olivucci. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 3382 (2008).
47. P. B. Coto, S. Martí, M. Oliva, M. Olivucci, M. Merchán, J. Andrés. *J. Phys. Chem. B* **112**, 7153 (2008).
48. See MOLCAS webpage: <<http://www.teokem.lu.se/molcas>>.
49. M. Rubio, D. Roca-Sanjuán, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *J. Phys. Chem. B* **110**, 10234 (2006).
50. D. Roca-Sanjuán, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *Chem. Phys.* **349**, 188 (2008).
51. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, D. Roca-Sanjuán, G. Olaso-González, M. Rubio. "Bioexcimers as precursors of charge transfer and reactivity in photobiology", in *Computational Methods in Science and Engineering. Theory and Computation: Old Problems and New Challenges*, T. Simos, G. Maroulis (Eds.), American Institute of Physics, Greece (2007).
52. G. Ghigo, B. O. Roos, P.-Å. Malmqvist. *Chem. Phys. Lett.* **396**, 142 (2004).
53. M. Rubio, D. Roca-Sanjuán, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *J. Phys. Chem. B* **113**, 2451 (2009).
54. M. Yan, D. Becker, S. Summerfield, P. Renke, M. D. Sevilla. *J. Phys. Chem.* **96**, 1983 (1992).
55. X. Yang, X.-B. Wang, E. R. Vorpagel, L.-S. Wang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17588 (2004).
56. R. Beukers, J. Ijlstra, W. Berends. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **77**, 729 (1958).
57. R. Beukers, A. P. M. Eker, P. H. M. Lohman. *DNA Repair* **7**, 530 (2008).
58. J. Cadet, P. Vigny. In *Bioorganic Photochemistry*, H. Morrison (Ed.), John Wiley, New York (1990).
59. T. Douki, J. Cadet. *Biochemistry* **40**, 2495 (2001).
60. W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Soller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernández, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler. *Science* **315**, 625 (2007).
61. J. J. Serrano-Pérez, I. González-Ramírez, P. B. Coto, M. Merchán, L. Serrano-Andrés. *J. Phys. Chem. B* **112**, 14096 (2008).
62. E. L. Rachofsky, R. Osman, J. B. A. Ross. *Biochemistry* **40**, 946 (2001).
63. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A. C. Borin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 8691 (2006).
64. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A. C. Borin. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2473 (2008).

65. M. Klessinger, J. Michl. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH, New York (1995).
66. M. Olivucci (Ed.). *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam (2005).
67. L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A. C. Borin. *Chem.—Eur. J.* **12**, 6559 (2006).
68. D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer. *J. Biol. Chem.* **244**, 1228 (1969).
69. S. Canuto, K. Coutinho. *Adv. Quantum Chem.* **28**, 89 (1997).
70. K. Coutinho, S. Canuto. *J. Chem. Phys.* **113**, 9132 (2000).
71. K. Coutinho, S. Canuto, M. C. Zerner. *J. Chem. Phys.* **112**, 9874 (2000).
72. K. Coutinho, S. Canuto. A Monte Carlo Program for Molecular Liquid Simulation. University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil (2000).
73. V. Ludwig, M. S. do Amaral, Z. M. da Costa, A. C. Borin, S. Canuto, L. Serrano-Andrés. *Chem. Phys. Lett.* **463**, 201 (2008).
74. E. C. Lim. *J. Phys. Chem.* **90**, 6770 (1986).

**"The Role of Adenine Excimers in the Photophysics of
Oligonucleotides".**

G. Olaso-González, M. Merchán, and L. Serrano-Andrés

Journal of the American Chemical Society, 131, 4368-4677 (2009)

The Role of Adenine Excimers in the Photophysics of Oligonucleotides

Gloria Olaso-González, Manuela Merchán, and Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received October 27, 2008; E-mail: Luis.Serrano@uv.es

Abstract: Energies and structures of different arrangements of the stacked adenine homodimer have been computed at the ab initio CASPT2 level of theory in isolation and in an aqueous environment. Adenine dimers are shown to form excimer singlet states with different degrees of stacking and interaction. A model for a 2-fold decay dynamics of adenine oligomers can be supported in which, after initial excitation in the middle UV range, unstacked or slightly stacked pairs of nucleobases will relax by an ultrafast internal conversion to the ground state, localizing the excitation in the monomer and through the corresponding conical intersection with the ground state. On the other hand, long-lifetime intrastrand stacked excimer singlet states will be formed in different conformations, including neutral and charge transfer dimers, which originate the red-shifted emission observed in the oligonucleotide chains and that will evolve toward the same monomer decay channel after surmounting an energy barrier. By computing the transient absorption spectra for the different structures considered and their relative stability in vacuo and in water, it is concluded that in the adenine homodimers the maximum-overlap face-to-face orientations are the most stable excimer conformations observed in experiment.

Introduction

Because of the growing concern about the role of solar UV light on human health, the study of DNA's behavior against such type of radiation is an area of increasing research.^{1–6} The excited-state nature of DNA and its nucleobase multimers is complex and depends on conformation and base sequence.^{3,7–13} The absorption spectrum of DNA closely resembles that of the building-block monomers. The low-lying excited states of nucleic acid base (NAB) monomers are accessible by middle UV absorption, near 5 eV,^{3–5,12} and have extremely short lifetimes, in the sub-picosecond regime, due to the presence of ultrafast internal conversions channels toward the ground state,

displaying just a very weak emission ($\tau_f = 10^{-4}$) measured in polar solvents.^{3,9,11} In the multimers, however, the fluorescence spectrum is characterized by having an additional longer-decay component, red-shifted with respect to that of the constituent nucleotides. The slow relaxation channels have been measured in a variety of oligonucleotides by different techniques, such as time- and wavelength-resolved fluorescence^{11,14} and femto-second excited-state absorption (fs-ESA),^{7,11,15,16} although the nature of the decay is still under debate.^{15,17} The origin of the long-decay channels is nowadays attributed to the existence of excimer or exciplex states of pairs of π -stacked nucleobases (homodimer or heterodimer, respectively), a concept that was first used by Eisinger et al.¹³ to describe the observed red-shifted emission as being an excimer fluorescence, and has been firmly established at a theoretical ab initio level.¹⁸

The most recent accounts^{15,16} suggest that after initial radiative population of delocalized exciton states on the NAB multimers, the system evolves in an ultrafast manner to either a fluorescent excimer/exciplex state or a localized excited-state of the NAB monomer, depending on the larger or smaller degree of stacking, respectively. From the long-lived excimer/exciplex state, the system is expected to decay to the ground-state slowly ($\tau > 10$ ps), while the relaxation along the monomer path should

- (1) Callis, P. R. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34*, 329–357.
- (2) Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioorganic Photochemistry*; Morrison, H., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1990; Vol. 1, pp 1–272.
- (3) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977–2019.
- (4) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691–8696.
- (5) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 6559–6571.
- (6) Roca-Sanjuán, D.; Olaso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10768–10779.
- (7) Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 11182–11188.
- (8) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B. *Nature* **2005**, *436*, 1141–1144.
- (9) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625–629.
- (10) Holman, M. R.; Ito, T.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6–7.
- (11) Kwok, W.-M.; Ma, C.; Phillips, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11894–11905.
- (12) Eisinger, J.; Shulman, R. G. *Science* **1968**, *161*, 1311–1319.
- (13) Eisinger, J.; Guéron, M.; Shulman, R. G.; Yamane, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1966**, *55*, 1015–1020.

- (14) Plessow, R.; Brockhinke, A.; Eimer, W.; Kohse-Höinghaus, K. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3695–3704.
- (15) Crespo-Hernández, C. E.; De La Harpe, K.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10844–10845.
- (16) Takaya, T.; Su, C.; De La Harpe, K.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 10285–10290.
- (17) Miannay, F.-A.; Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14574–14575.
- (18) Olaso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 231102.

be ultrafast ($\tau < 2$ ps), as known in the isolated systems.^{3,19} It has been claimed that the excimer/excplex state has a charge transfer (CT) nature and that there exists a correlation between the state lifetime and the driving force for charge recombination.¹⁶ The formation and quenching of bonded exciplex CT states has been also described between pyridine and cyanoaromatic electron acceptors as a new form of photochemical reaction.²⁰ The fate of the excited state will be strongly dependent on the extent of charge reorganization between the monomers and the relative energetic position of the CT and non-CT excimer states, information that can be obtained from theory. In the case of DNA, dynamics validation of the model only relies on a theoretical time-dependent density functional theory (TD-DFT) report of adenine and 9-methyladenine dimers and trimers in which the CT states were obtained as the low-lying excimer states in solution.²¹ The results of the TD-DFT methodology in calculations that simultaneously involve CT and non-CT excited states must always be taken with great caution because of the well-known tendency of TD-DFT toward severe underestimation of CT excitation energies.^{22–25} Particularly in this case, a recently published study²⁶ suggests that the mentioned TD-DFT report underestimated the CT excitation energies by near 1 eV. It is clear that there is a need of having theoretical studies at higher levels of theory. In the present paper we will focus our interest on the analysis of the excited electronic states responsible for the spectroscopic properties for different adenine (9H-adenine, A) dimer arrangements in vacuo and in an aqueous environment. The relative positions and binding energies of the excimer states, excitation energies, and oscillator strengths for transient absorption spectroscopy, and an overall model for the deactivation dynamics of the homodimer, shall be offered. The results, obtained by an accurate quantum-chemical ab initio method, namely the complete active space self-consistent-field second-order perturbation theory (CASPT2),^{27–29} employing high-quality ANO-type basis sets,³⁰ and using the Polarizable Continuum Model (PCM)^{31,32} for solvation effects, are expected to provide the

Table 1. Energies of the Low-Lying Singlet $\pi\pi^*$ Excited States in the 9H-Adenine Monomer Computed at the Ground-State Geometry with Different Basis Sets and Active Spaces

basis set	active space (e ⁻ /MO)	CASPT2 energies (eV)	
6-31G(d,p) ^a	16/13	S ₁	5.16
		S ₂	5.35
6-31G(d) ^b	10/9	S ₁	5.10
		S ₂	5.45
ANO-L C,N[4s3p1d]/H[2s]+1s1p1d ^c	10/10	S ₁	5.13
		S ₂	5.20
ANO-S C,N[3s2p1d]/H[2s1p]	6/6	S ₁	5.25
		S ₂	5.42

^a Values taken from refs 4 and 5. ^b The standard Gaussian-d exponent 0.8 has been replaced by the more diffuse exponent 0.25 in the basis set. See ref 42. ^c Values taken from ref 41.

grounds to establish more complete models to understand DNA relaxation dynamics.

Methods and Computational Details

Characterization of the lowest singlet states of the adenine homodimer in different arrangements has been carried out by using the CASPT2 method as implemented in the MOLCAS 6.3 software.^{33,34} In order to minimize weakly interacting intruder states, the imaginary level-shift technique (0.2 au) was employed.³⁵ The basis set of Atomic Natural Orbital (ANO-S) type with the primitive set C,N(10s6p3d)/H(7s3p),³⁶ contracted to C,N[3s2p1d]/H[2s1p], was used throughout. The CASSCF state interaction (CASSI) method^{37,38} was used to calculate the transition dipole moments. In the expression for the oscillator strength, the CASSCF transition moment and the energy difference obtained in the CASPT2 computation were employed. Considering our interest in the calculation of $\pi\pi^*$ states of the homodimer, the active space for the CASSCF wave functions comprises a total of 12 electrons distributed along 12 π molecular orbitals (MOs), that is CASSCF(12/12), that correspond to 6 MOs of each adenine. Other states, such as $n\pi^*$, will be much higher in energy (because of hydrogen-bond interactions of different types in the DNA strand) and will play a minor role.^{39,40} In order to select the proper basis set and active space, CASPT2 calibration calculations were performed on the low-lying singlet states of the adenine monomer using the optimized CASSCF (11,12)/6-31G(d,p) ground-state geometry obtained by Serrano-Andrés et al.⁵ Table 1 compiles the results of modifying basis sets and active spaces. In particular, the use of the more restricted (6,6) active space for adenine still provides results that are in agreement with the values obtained earlier employing larger active spaces.^{5,41}

For the study of the adenine homodimer, different molecular arrangements were studied in vacuo and in water, employing in

- (19) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. Photostability and Photoreactivity in Biomolecules: Quantum Chemistry of Nucleic Acid Base Monomers and Dimers in Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis; Shukla, M. K.; Leszczynski, J., Eds.; Springer: The Netherlands, 2008; pp 435–472.
- (20) Wang, Y.; Haze, O.; Dinnozenzo, J. P.; Farid, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6970–6981.
- (21) Santoro, F.; Barone, V.; Improta, R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 9931–9936.
- (22) Tozer, D. J.; Amos, R. D.; Handy, N. C.; Roos, B. O.; Serrano-Andrés, L. *Mol. Phys.* **1999**, *97*, 859–868.
- (23) Tozer, D. J. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 12697.
- (24) Drew, A.; Weisman, J. L.; Head-Gordon, M. *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 2943.
- (25) Lange, A.; Herbert, J. M. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 1680–1690.
- (26) Lange, A. W.; Rohrdanz, M. A.; Herbert, J. M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6304–6308.
- (27) Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218–1226.
- (28) Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülischer, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219–331.
- (29) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. In *Computational Photochemistry*; Olivucci, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2005; pp 35–91.
- (30) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2005**, *729*, 99–108.
- (31) Cossi, M.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 4708–4717.
- (32) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3094.

- (33) Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Varyazov, V.; Widmark, P.-O.; Cossi, M.; Schimmelpennig, B.; Neogady, P.; Seijo, L. *Comput. Mater. Sci.* **2003**, *28*, 222–239.
- (34) Varyazov, V.; Widmark, P.-O.; Serrano-Andrés, L.; Lindh, R.; Roos, B. O. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *100*, 626–635.
- (35) Forsberg, N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196–204.
- (36) Pierloot, K.; Dumez, B.; Widmark, P.-O.; Roos, B. O. *Theor. Chim. Acta* **1995**, *90*, 87–114.
- (37) Malmqvist, P.-Å. *Int. J. Quantum Chem.* **1986**, *30*, 479–494.
- (38) Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 189–194.
- (39) Ritzke, H.-H.; Hobza, P.; Nachtigallova, D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1672–1675.
- (40) Serrano-Andrés, L.; Fülischer, M. P.; Karlström, G. *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *65*, 167–181.
- (41) Fülischer, M. P.; Serrano-Andrés, L.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6168–6176.
- (42) Roca-Sanjuán, D.; Rubio, M.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 084302.

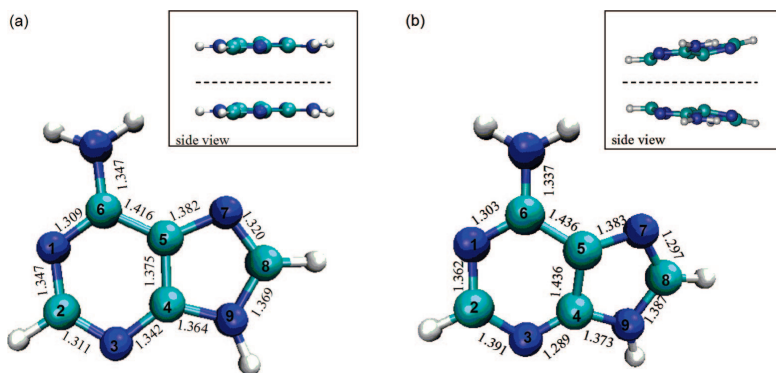


Figure 1. Labeling for the adenine molecule. Structure a corresponds to the ground-state equilibrium geometry of the monomer computed by Serrano-Andrés et al.⁵ and b to the adenine dimer at the optimized $^1(A^*A)_{\text{exc}}$ S_1 state. Main bond distances are displayed in angstroms. The inset of part a illustrates the parallel face-to-face arrangement of the adenine dimer, whereas the inset of part b illustrates the orientation in the optimized $^1(A^*A)_{\text{exc}}$ state face-to-face minimum.

the latter case the PCM model^{31,32} as implemented in the MOLCAS package.^{33,34} A reaction field approach uses a polarizable dielectric continuum outside a properly shape-adapted cavity to account for the most relevant solvation effects, in an aqueous medium here, and is computed in a multiconfigurational self-consistent manner at the CASSCF level and added to the Hamiltonian as a perturbation, defining the CASPT2/PCM approach. The employed model (see Supporting Information) is considered sufficient to incorporate the main solvation effects on the ground and $\pi\pi^*$ excited states of the adenine dimer.

At this level of theory, different sets of calculations were performed with six different molecular arrangements of the adenine homodimer: a face-to-face symmetric orientation using ground-state optimized monomers, the dimer locally excited state $^1(\text{LE})$ inspired in the homologous cytosine homodimer;⁶ the B-DNA A-dimer arrangement, also using ground-state optimized monomers (B-DNA); an excited-state optimized face-to-face excimer, $^1(A^*A)_{\text{exc}}$; two B-DNA orientations including individually optimized cationic and anionic A monomers, ($^5A_{\text{cat}}A_{\text{an}}$)³⁵ and ($^5A_{\text{an}}A_{\text{cat}}$)³⁵, and finally an adapted TD-DFT CT excited-state optimized minimum from ref 21 ($^1(A^*A)_{\text{opt}}$, see below). A different number of roots, seven unless indicated, were used in the average procedure of the CASSCF method to account for the change of order between the CASSCF and the CASPT2 solutions. Except when mentioned, no symmetry restrictions have been used in the calculations. In some cases, as indicated, at specific geometries of the S_1 state, 30 singlet roots were computed at the CASPT2 level in order to explore the measured transient excited-state absorption. As shown previously,^{6,18,43} inclusion of the basis set superposition error (BSSE) is crucial to accurately describe the binding energies (E_b) and relative position of the excimer states. Here the effect was taken into account by using the counterpoise correction (CP)⁴⁴ (see Supporting Information), and the corresponding energies, the only ones used in the discussion, will be named BSSE-corrected or CP-corrected (e.g., CP-corrected binding energy, CP- E_b). Additional computational details and the employed geometries can be found in the Supporting Information.

Results and Discussion

Femtosecond excited-state absorption (fs-ESA) experiments^{7,8,16} carried out on a variety of synthetic DNA oligonucleotides in aqueous solution, for instance (dA)₁₈, obtained multiexponential

decays including relaxation lifetimes between 10 and 100 ps that were attributed to decay from singlet excimers. It was suggested that, after pump absorption at 266 nm, a high yield of the absorbed photons generates excimers whose transient decays at the probe pulse 250 nm (used to reveal ground-state reconstitution) in lock step with the signal at 570 nm (used for probing the excited state) at times greater than 10 ps repopulating the ground state. An additional time-resolved study¹¹ on (dA)₂₀ provided evidence for temporal evolution from three distinct states, the first of them characterized by ultrafast relaxation with a ~ 0.39 ps of decay time, assigned to a monomer-like relaxation, and the second and third ones displaying relatively long-lived states with ~ 4.3 ps and ~ 182 ps lifetimes, respectively, suggested to be originated from excimers. In order to determine the nature and relative position of the different excimer states of the A homodimer in the gas phase and solution, different molecular arrangements of the stacked dimer have been studied at the CASPT2 and CASPT2/PCM level of theory.

A. The Lowest Singlet State in the Parallel Excimer: $^1(\text{LE})$. As a first step toward the characterization of the low-lying singlet excimers of adenine, the potential energy curves (PECs) with respect to the intermolecular mass-center separation (R) of two adenine molecules kept at the ground-state equilibrium geometry have been built at the CASPT2 level. The selected orientation is a symmetric face-to-face parallel arrangement of the A-dimer (see Figure 1), which leads to the maximum overlap and interaction between the π systems of the monomers. Although this homodimer displays spatial C_s symmetry, we use no symmetry restrictions (C_1 symmetry) in the computation of the electronic state energies to avoid the problems related to wave function symmetry breaking.⁴⁵

Hereafter, relative energies will be referred to two ground-state isolated adenine molecules. In the asymptotic limit S_1 and S_2 become degenerate. They are related to the equivalent situations $A + A^*$ and $A^* + A$, where A and A^* represent the ground-state adenine and its lowest singlet excited state, respectively. Thus, the absorption $S_0 \rightarrow S_1$ calculated with the monomers separated 20 au corresponds to the monomer

(43) Olaso-González, G.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24734–24739.

(44) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65–73.

(45) Merchán, M.; Pou-AméRigo, R.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *252*, 405–414.

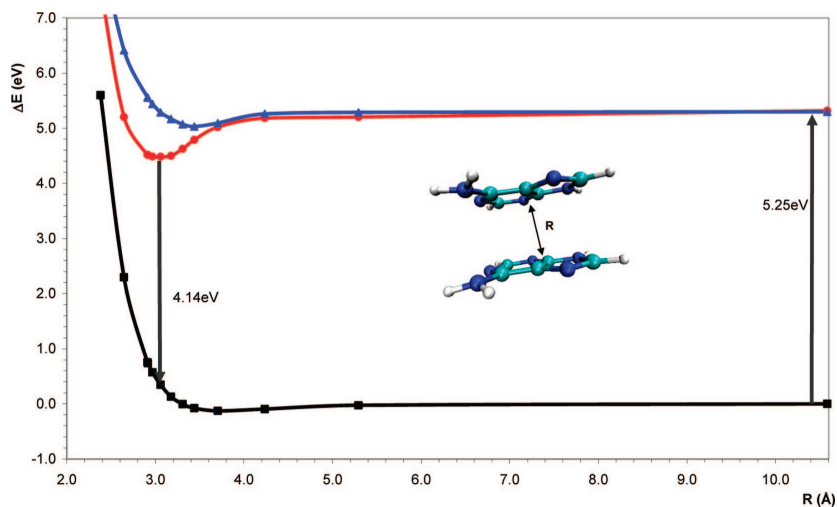


Figure 2. BSSE-corrected CASPT2 potential energy curves built with respect to the intermolecular distance (R) of two face-to-face π -stacked adenine molecules. The curves correspond (in increasing energy order) to the singlet S_0 , S_1 , and S_2 states.

absorption, and it is here computed at 5.25 eV in agreement with previous findings, as can be seen in Table 1. When the two molecules are constrained to be parallel, the PEC for the ground state at the CASPT2 (12/12) level is weakly bound (see Figure 2) having a binding energy of 0.13 eV with a minimum at the intermolecular distance of 3.704 Å. We have a well-defined minimum for S_1 at 3.059 Å with a binding energy (CP- E_b) of 0.83 eV. The S_2 electronic state is bound with a binding energy of 0.27 eV at an intermonomer distance of 3.440 Å. At that local S_1 minimum, hereafter ${}^1(\text{LE})$, the computed vertical emission energy, 4.14 eV, is 0.3–0.4 eV lower than the measured monomer fluorescence,^{5,46–50} and it can be related to the red-shifted fluorescence observed in adenine oligonucleotides,¹¹ supporting the excimer origin of such emission, whose energy and quantum yield will depend on the secondary structure of the single-stranded polymer.⁷ The pronounced S_2 – S_1 gap points out an efficient coupling between the two states, as previously noted for related systems.³⁹ At this point, the existence of adenine excimers is predicted, and it can be regarded as an intrinsic property of the A-dimer, as determined for other pyrimidine NABs dimers.^{6,18,19,51,52}

Figure 2 contains the PECs for the face-to-face symmetric display. The correction of the BSSE is essential for the accurate calculation of the binding energies and to account for the relative position of the different excimer states, even if the vertical

energy values are barely affected. The BSSE-uncorrected A-dimer PECs have been included in the Supporting Information. The most important difference is that the electronic states lose a high percentage of binding character when the BSSE is taken into consideration. Actually, S_0 and S_2 have well defined minima in the uncorrected PECs, and S_1 has a binding energy of 2.17 eV, 1.34 eV larger than for the CP corrected curve, which also decreases the intermolecular distance for the S_1 minimum in 0.144 Å. In fact, the S_0 state becomes unbound at the ${}^1(\text{LE})$ structure, lying at 0.25 eV from the reference isolated systems.

B. The Relaxed Singlet Excimer State: ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$. Another conformation for the homodimer has been obtained by performing a geometry optimization of the lowest singlet state of the adenine dimer, initially performed within the constraints of the C_s symmetry, in which the lowest-energy state at the CASPT2 level corresponds to the first root of A'' symmetry. The same 12/12 active space has been employed, distributed in six π -active MOs in each of the irreducible representations a' and a . At the optimized geometry, the electronic singlet states have been computed without symmetry restrictions. The relaxed singlet excimer ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$, whose CASSCF optimized geometry is represented in Figures 1 and 3, has a binding energy (CP- E_b) of 1.23 eV, and it is stabilized 0.40 eV from the ${}^1(\text{LE})$ excimer structure. The interaction between the two moieties is the highest because the system remains fully stacked and the intermonomer distance decreases, in particular between the C_5 – C_5' atoms. The interaction between the two moieties also produces the elongation of the C_4 – C_5 (C_4' – C_5') monomer bond, which loses the double bond character. The S_2 state at the ${}^1(\text{A}^*\text{A})_{\text{exc}}$ geometry has a CP- E_b of just 0.01 eV, whereas the S_2 – S_1 splitting is 1.74 eV, considerably larger than in the other situations studied. That reflects a strong coupling between the states. The vertical transitions toward the ground state are computed to be 2.65 and 4.37 eV for S_1 and S_2 , respectively, and are strongly red-shifted as compared to the lowest vertical singlet–singlet transition of the adenine monomer in solution (4.5 eV).⁵ As in the ${}^1(\text{LE})$

(46) Plützer, C.; Nir, E.; de Vries, M. S.; Kleinermanns, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 5466–5469.

(47) Kim, N. J.; Jeong, G.; Kim, Y. S.; Park, Y. D. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 10051–10055.

(48) Lührs, D. C.; Viallon, J.; Fischer, I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 1827–1831.

(49) Nir, E.; Plützer, C.; Kleinermanns, K.; de Vries, M. S. *Eur. Phys. J. D* **2002**, *20*, 317–329.

(50) Kim, N. J.; Kang, H.; Park, Y. D.; Kim, S. K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2802–2805.

(51) Serrano-Pérez, J. J.; González-Ramírez, I.; Coto, P. B.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14096–14098.

(52) González-Ramírez, I.; Climent, T.; Serrano-Pérez, J. J.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Pure Appl. Chem.* **2009**, in press.

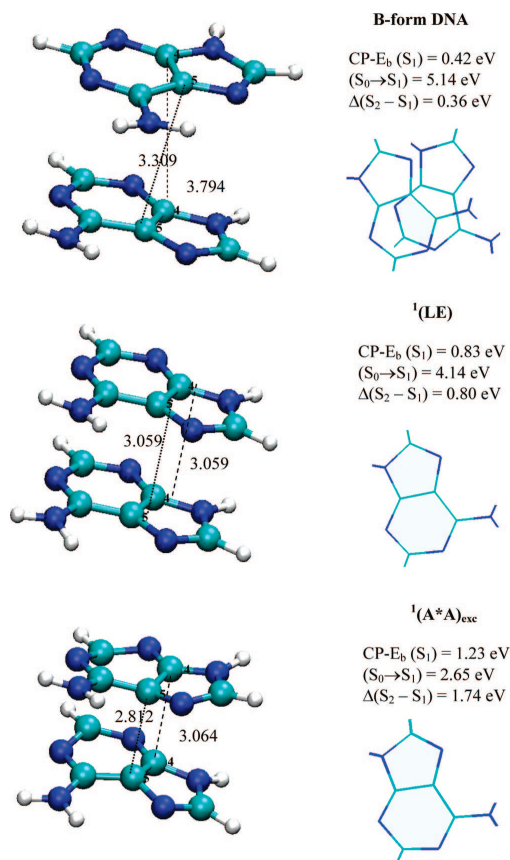


Figure 3. Structures for two adenine molecules: (a) at the ground-state B-form DNA; (b) at the S_1 locally excited state $^1(LE)$ -type structure in a symmetric face-to-face orientation; (c) at the optimized minimum of S_1 (also face-to-face orientation; see text). The computed CASPT2 binding energies ($CP-E_b$) for S_1 , and the vertical transition energy ($S_0 \rightarrow S_1$), together with the splitting for the two lowest excited states, $\Delta(S_2 - S_1)$, are also included. Interatomic distances in angstroms. On the right is shown the overlap between the two moieties in the different structures.

conformation, the ground state is clearly unbound, displaying a relative energy of 1.37 eV above the reference isolated molecules. The dissociative character of the ground states speaks in favor of the arrangement as a source of unstructured red-shifted emission.

C. The Lowest Singlet State in the B-Type DNA Conformation. The low-lying singlet states of the adenine dimer have been also studied in a conformation in which the relative orientation of the ground-state optimized monomers uses the standard parameters of the B-form of DNA.⁵³ This model is mainly characterized by a twist angle of 36° between the two members of the dimer. Figure 3 compiles the relative orientations and the CASPT2 energy bindings, vertical excitations, and excited state splitting for different arrangements of the adenine homodimer.

As can be readily seen from the molecular drawing, the ground-state stacking in the B-form is somewhat different from the symmetric face-to-face (or “sandwich”-like) geometries required for producing the $^1(LE)$ and optimized $^1(A^*A)_{exc}$ energy minima, conceived to maximize the stacking interaction. In the ground-state B-form DNA, the interatomic distances $R(C_4-C_4')$ and $R(C_5-C_5')$ are about 3.309 and 3.794 Å, respectively, both larger than those in $^1(LE)$, at 3.059 Å, whereas the dihedral angle $\angle C_4-C_5-C_5'-C_4'$, varies from 36° in B-DNA to 0° in $^1(LE)$ and $^1(A^*A)_{exc}$. The lowest singlet excited state in the B-form has a binding energy ($CP-E_b$) of 0.42 eV, being therefore 0.41 and 0.81 eV less stable than the $^1(LE)$ and $^1(A^*A)_{exc}$ forms, respectively. The S_2-S_1 splitting is also smaller for the B-DNA arrangement, reflecting a weaker coupling between the states. The vertical transitions in the B-DNA dimer, 5.14 eV (S_1) and 5.50 eV (S_2), are slightly blue-shifted as compared to the lowest vertical singlet–singlet transition of $^1(LE)$. At the same level of theory, the ground state in the B-form is computed to be slightly bound, displaying a corrected binding energy, $CP-E_b$, of 0.34 eV.

D. Charge Transfer Singlet States. Solvation Effects. The final conformations of the adenine excimer that have been explored concern the location of the intermonomer charge transfer singlet states. In order to find the most favorable structure for this type of state we have used several arrangements. Ground-state geometries corresponding to the adenine cation (A_{cat}) and anion (A_{an}) obtained from previous CASSCF(12/10; $\pi\pi^*$)/ANO-L C,N[4s3p1d]/H[2s1p] calculations^{42,54} were first employed. Using these moieties, two structures with the B-form arrangement have been built: $^5A_{cat}A_{an}^{3'}$, in which the A_{cat} monomer is situated in the position that corresponds to the $5'$ extreme of a hypothetical strand of DNA whereas the A_{an} monomer is in the $3'$ extreme, and $^5A_{an}A_{cat}^{3'}$, in which the position of the monomers is inverted. As described later, an additional geometry was employed, hereafter (A^+A^-)_{opt}, adapted from that optimized for the lowest CT state of the 9-methyladenine dimer by Santoro et al.²¹ at the TD-DFT/PCM/PBE0/6-31G(d) level of calculation. Figure 4 displays the three employed arrangements, whereas Table 2 compiles the vertical excitation energies, relative positions, and nature of the computed singlet excited states for the isolated system and within an aqueous environment.

The calculations performed on the isolated adenine dimers at the CASPT2 level and including correction of the BSSE show CT states that were the fourth ($^5A_{cat}A_{an}^{3'}$) and sixth root ($^5A_{an}A_{cat}^{3'}$) at the two employed conformations. In the latter arrangement the CT state, with a 59% of CT character, is too high in energy to be competitive with the low-lying neutral singlet excited states. For the $^5A_{cat}A_{an}^{3'}$ arrangement, in which we will focus from now on, the lowest CT state (with 80% of CT character) is located at 4.95 eV from the reference system, two isolated adenine molecules, and displays a binding energy of 0.30 eV, even smaller than that found for the lowest excimer state in the B-DNA arrangement. Also, the CT state is almost 1 eV higher than the lowest excimer state $^1(A^*A)_{exc}$, as will be discussed later, and it is practically degenerated with other states where the nature of the electronic transition is delocalized or of intermonomer character. In order to analyze the role of a solvated environment in the relative location of the excimer

(53) Lu, X.-J.; Olson, W. K. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5108–5121.

(54) Roca-Sanjuán, D.; Rubio, M.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*, 095104.

(55) Gagliardi, L.; Lindh, R.; Karlström, G. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 4494.

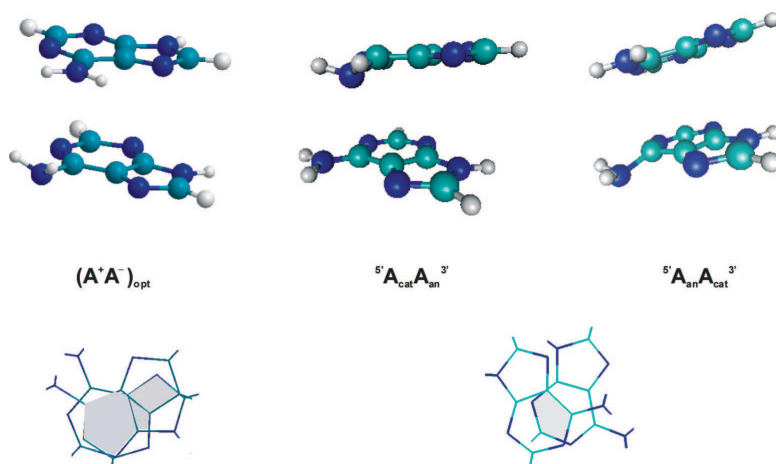


Figure 4. Structures of the studied anionic-cationic arrangement of the adenine dimer and overlap between the two stacked monomers. Whereas the geometry $(A^+A^-)_{opt}$ was adapted from ref 21 (see text), the ground-state optimized geometries for the corresponding anion and cation monomer have been used to build a dimer oriented at a B-DNA conformation. The bottom views show the overlap between the two moieties in the different structures.

Table 2. CASPT2 BSSE-Corrected Vertical (VE) and Relative (to two ground-state isolated monomers, RE) Energies (ΔE /eV) for the Low-Lying Singlet States in the $(A^+A^-)_{opt}$, ${}^5A_{cat}A_{an}{}^{3-}$, and ${}^5A_{an}A_{cat}{}^{3+}$ Structures^a

state	$(A^+A^-)_{opt}{}^b$					${}^5A_{cat}A_{an}{}^{3-}$					${}^5A_{an}A_{cat}{}^{3+}$		
	ΔE		ΔE		CT ^d nature, %	ΔE		ΔE		CT ^d nature, %	ΔE gas phase		
	gas phase	water	gas phase	water		gas phase	water	VE ^c	RE		CT ^d nature, %		
S ₁	4.42	4.30	4.64	4.26		4.62	4.95	4.31	4.67	80	4.32	4.67	
S ₂	4.60	4.34	4.67	4.29		4.58	4.91				4.61	4.96	
S ₃	4.71	4.38	4.70	4.33		4.61	4.94				4.90	5.25	
S ₄	4.94	4.61	4.77	4.39	34	4.68	5.01				5.49	5.84	
S ₅	5.18	4.85	4.99	4.61	45	5.81	6.14				5.57	5.92	59

^a Also included are results in water at the CASPT2/PCM level and weights of the CT character for the corresponding states. ^b Adapted from ref 21 optimized at the TDDFT level. ^c The ground state is located -0.33 (vapor) and -0.38 eV (water) $(A^+A^-)_{opt}$, 0.33 (vapor) and 0.36 eV (water) $({}^5A_{cat}A_{an}{}^{3-})$, and 0.35 eV $({}^5A_{an}A_{cat}{}^{3+})$ below or above the reference energy (two isolated monomers). ^d Based on LoProp population analysis.⁵⁵ Neutral states have negligible CT character in all cases.

states, we have also performed a number of calculations modeling the solvation effect of an aqueous media by means of the reaction field CASPT2/PCM approach. As observed in Table 2, the CT excimer state stabilizes its energy both vertically and relatively to the separated monomers, in this case down to 4.67 eV, becoming the lowest excited singlet state at such conformation. If compared with the ${}^1(A^*A)_{exc}$, which is placed at 4.02 eV in the gas phase, the CT state is still well above the face-to-face optimized excimer in the adenine homodimer. The ${}^1(A^*A)_{exc}$ S₁ state minimum is computed at 3.95 eV in the aqueous environment, slightly stabilized from the gas-phase value and, in any case, much more stable than the CT state.

Those $A_{cat}A_{an}$ structures were displayed in a B-DNA-type arrangement, which is characterized by having a small overlap of the stacked moieties (see Figures 3 and 4). As the binding energy and relative position of the excimer states strongly depend on the degree of stacking and overlap, we performed additional calculations on a structure with a slightly larger overlap and also optimal for getting CT-type states at low energies (see Figure 4). The geometry we adopted, $(A^+A^-)_{opt}$, was adapted from that optimized for the lowest CT state of the 9-methyladenine dimer by Santoro et al.²¹ at the TD-DFT/PCM/PBE0/6-31G(d) level of calculation. The methyl groups were

replaced by hydrogen atoms with NH bond lengths of 1.00 Å. As described,²¹ the geometries of each one of the moieties resemble those of the anion and cation of the monomer. Independently of the relative position at which the TD-DFT method places the CT states (typically it yields too low excitation energies^{22–26}), a reasonable account of the geometrical parameters can be expected. In any case, we carried out the calculations to analyze different arrangements which might lead to stabilize CT states. Here (cf. Table 2) the lowest CT state at the $(A^+A^-)_{opt}$ geometry was located in the gas phase at higher energies (~ 0.3 eV) than the non-CT states, and only when the solvent is included does it stabilize to become much closer, at 4.39 eV. This relative position is nearly 0.3 eV lower than the value obtained in other conformations. As compared with the CT states found in the other arrangements, the transfer of the charge from one to the other monomer was not so pronounced (34%) in the CASSCF(12/12) wave function. We can therefore conclude that certainly this structure has provided more stable CT excimer states, but they still lie higher than the strongly interacting ${}^1(A^*A)_{exc}$ conformation, even in a polar solvent like water, where the vertical excitation and relative energy of the ${}^1(A^*A)_{exc}$ S₁ minimum lie at 2.58 and 3.95 eV, respectively. This conclusion can be expected to be generally

Table 3. CASPT2 Energy Differences ($\Delta E/eV$) and Oscillator Strengths (f) of the Most Relevant Transitions from the Ground and Singlet Excited States of the Adenine Dimer at Different Conformations^a

	B-form		$(A^+A^-)_{opt}^b$		${}^1(LE)$		${}^1(A^*A)_{exc}$				
	ΔE	f	ΔE	f	ΔE	f	ΔE	f			
Ground-State Absorption/Emission											
$S_0 \rightarrow S_1$	5.15	0.037	$S_0 \rightarrow S_1$	4.42	0.254	$S_0 \rightarrow S_1$	4.14	0.0001	$S_0 \rightarrow S_1$	2.65	0.011
$S_0 \rightarrow S_2$	5.50	0.072	$S_0 \rightarrow S_2$	4.60	0.009	$S_0 \rightarrow S_2$	4.94	$<10^{-4}$	$S_0 \rightarrow S_2$	4.37	0.028
Excited-State Absorption ^c											
$S_1 \rightarrow S_4$	0.43	0.0015	$S_1 \rightarrow S_5$	0.93	0.0157	$S_1 \rightarrow S_3$	0.92	0.026	$S_1 \rightarrow S_5$	2.18	0.029
$S_1 \rightarrow S_6$	1.03	0.0007	$S_4 \rightarrow S_5$	0.39	0.0221	$S_1 \rightarrow S_{12}$	2.33	0.182	$S_1 \rightarrow S_6$	2.24	0.224
$S_2 \rightarrow S_5$	0.75	0.0187	$S_5 \rightarrow S_{15}^{CT}$	1.72	0.0369	$S_1 \rightarrow S_{13}$	2.34	0.061	$S_1 \rightarrow S_7$	2.52	0.021
$S_2 \rightarrow S_7$	1.13	0.0131	$S_{10}^{CT} \rightarrow S_{17}^{CT}$	1.02	0.0217	$S_1 \rightarrow S_{18}$	2.88	0.046	$S_1 \rightarrow S_8$	2.60	0.114
$S_2 \rightarrow S_8$	1.32	0.0003	$S_{12} \rightarrow S_{21}^{CT}$	1.06	0.0278	$S_2 \rightarrow S_{12}$	2.09	0.136	$S_1 \rightarrow S_{11}$	2.85	0.133
$S_2 \rightarrow S_{12}$	1.94	0.0015	$S_{14} \rightarrow S_{16}$	0.39	0.0233	$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.054	$S_2 \rightarrow S_{16}$	2.28	0.005
$S_2 \rightarrow S_{13}$	2.10	0.0198	$S_{14} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.97	0.0637	$S_4 \rightarrow S_{15}$	1.75	0.122	$S_2 \rightarrow S_{17}$	2.43	0.134
$S_2 \rightarrow S_{14}$	2.12	0.0126	$S_{16} \rightarrow S_{20}$	0.40	0.0270	$S_5 \rightarrow S_{18}$	1.81	0.131	$S_3 \rightarrow S_{10}$	1.02	0.060
$S_4 \rightarrow S_{19}$	1.95	0.0107	$S_{16} \rightarrow S_{21}^{CT}$	0.57	0.0392	$S_6 \rightarrow S_{17}$	1.70	0.146	$S_3 \rightarrow S_{15}$	2.11	0.027

^a Relative energies of the respective ground states from that of the two separated monomers: -0.34 eV (B-form), -0.33 eV $(A^+A^-)_{opt}$, 0.25 eV ${}^1(LE)$, 1.37 eV ${}^1(A^*A)_{exc}$. ^b Geometry adapted from ref 21 (see text). ^c Only nine transitions with the highest oscillator strengths are shown.

valid for nucleobase homodimers, whereas for heterodimers the strongly stacked neutral states and the CT states could be more competitive.

E. Adenine Dimer Transient Absorption. Crespo-Hernández et al.⁷ recorded the femtosecond transient absorption signal for the DNA oligonucleotide $(dA)_{18}$ in aqueous solution. According to their findings an excited state is rapidly formed after initial excitation that can be assigned to a singlet excimer. Absorption is measured for this state at 570 nm (2.18 eV), which decays in times larger than 10 ps, repopulating the ground state that, in turn, is detected by monitoring its typical strong absorption at 250 nm (4.96 eV). We have computed the transient absorption spectrum for the lowest singlet states in four different conformations. The energies for those transitions with the largest oscillator strengths as well as the energy of the transitions $S_0\Delta S_1$ and $S_0\Delta S_2$ are collected in Table 3. Because of the limitations in the size of the active space, high-lying states may not be accurately represented. The goal of these calculations is, however, to identify species for intense transient absorption near the observed 2.18 eV at the different arrangements. Only singlet excited valence $\pi\pi^*$ states are of interest in that context.

After initial absorption at 266 nm (4.66 eV), probably to produce a delocalized exciton-type situation,⁵⁶ the oligomer strand, which can be assumed in average in a B-form conformation, will evolve toward different excimer-like structures, whose formation yield will strongly depend on the dynamics and flexibility of the strand. Most of the observed excited-state transient absorption will take place at favorable S_1 minima conformations. From the four structures studied here, B-DNA, $(A^+A^-)_{opt}$, ${}^1(LE)$, and ${}^1(A^*A)_{exc}$, the two latter seem to better support the fs-ESA experiment and are good candidates to be assigned as responsible for the red-shifted fluorescence. Both conformations, that highly increase the stability of the lowest singlet excited state, have strong absorptions from the state S_1 to higher states with energies between 2.09–2.33 eV. On the contrary, at the B-form and $(A^+A^-)_{opt}$ structures no strong transient absorption is found near the 2.18 eV experimental signal (strong transient absorption are also reported at higher energies), even when the $(A^+A^-)_{opt}$ conformation displays a reasonable large overlap of the stacked π structures (see Figure 4) which could be expected to enhance the intensity of the absorption bands.^{7,11} According to these findings, the signal

monitored at 570 nm in the transient absorption experiment could be caused by the electronic transition from the S_1 state of the adenine dimer in the favored ${}^1(LE)$ or ${}^1(A^*A)_{exc}$ structures, far from the other conformations, indicating that a relaxation, ultrafast, as suggested,¹⁶ of the dimer structure takes place after the excitation of the DNA with the pump laser and before the excitation with the probe laser. If the two structures are taken as limits for the relaxation process, the fluorescence energy range could be expected between 4.14–2.65 eV, perfectly covering the observed domain, 310–550 nm (4.0–2.3 eV).¹¹ On the other hand, the repopulation of the ground state is monitored thanks to its absorption at 250 nm (4.96 eV), which is close to the $S_0 \rightarrow S_1$ transition to the dimer B-form or to the monomer, and it may take place in a much slower regime, as discussed in the next section. In summary, even if other conformations of the dimer cannot be ruled out as contributors to the transient absorption, those related to the face-to-face arrangement seem to better qualify as preferential structures for the homodimer excimer.

F. Adenine Excimer Deactivation Process. The described CASPT2 calculations on the adenine homodimer enable us to propose the model displayed in Figure 5 for the decay dynamics of oligomers of stacked adenine molecules. It can be assumed that at the moment of the absorption the system acquires an exciton-type excited form which rapidly will evolve toward the formation of favorable excimer states in the lowest singlet excited state. Long-lived signals in dinucleotides are indistinguishable from ones in longer homo-adenine sequences, indicating that a common excimer state spanning two stacked bases is formed in all systems.¹⁶ The initial excitation (250 nm, 4.96 eV in the fs-ESA experiments^{7,11}) is then expected to take place between the computed 5.25 eV of the S_1 monomer absorption and that corresponding to the major B-DNA structure (5.14 eV, vertically, and 4.80 eV, adiabatically). As previously proposed,^{15,16} from this moment two main decay pathways can be envisaged, and the predominance of one or the other will depend on the balance between the forces that lead to a strong interaction of the stacked nucleobases and the mechanical forces involved in the inherent flexibility of the oligomer (DNA) strands. The system might then either adopt two basic types of conformation differing in the structure of the stacking. More stacked arrangements of the excimer (in which the overlap of the π structures and the corresponding

(56) Marguet, S.; Markovitsi, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5780–5781.

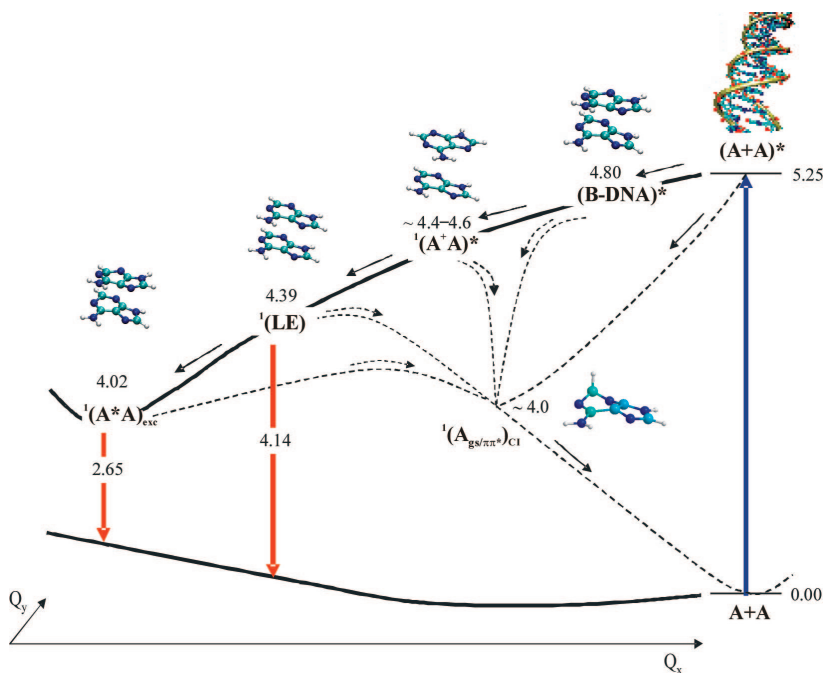


Figure 5. Scheme proposed, based on actual CASPT2 results, for the decay path of the lowest singlet excited state (S_1) of the adenine dimer involving several conformations of the excimer and the adenine monomer conical intersection ($gs/\pi\pi^*$)_{CI}. The values of the relative energies are in eV. This is a scheme of energy levels. Evolution on the S_1 hypersurface from the initially photoinduced structures toward the different excimer arrangements will not require passing sequentially through each one of the represented conformations. The Q_x coordinate is mainly related to the average intermolecular distance of the two moieties, whereas Q_y is associated to the remaining degrees of freedom in the monomer and the dimer.

binding interaction increase) might decay in an ultrafast manner toward more favorable interacting excimer structures. On the other hand, in cases with minor stacking (minor overlap and binding) or basically unstacked bases, the dimer can localize its population in one of the moieties and undergo an ultrafast decay to the ground state through the well-known conical intersection of the monomer, ($gs/\pi\pi^*$)_{CI}, located at the CASPT2 level near 4.0 eV (see Figure 5).^{4,5} This relaxation path for the unstacked nucleobases has been found dominant in the decay dynamics of dinucleotides after excitation at 267 nm (4.96 eV); therefore, it reflects the behavior of the dynamics in the blue transient region¹¹ and can be assigned with a lifetime ~ 2 ps as the rate-limiting step of vibrational energy transfer to the environment.¹⁶ Notice that Figure 5 has to be understood as a scheme of energy levels. Evolution on the S_1 hypersurface from the initially photoinduced structures toward the different excimer arrangements will not require passing sequentially through each one of the represented conformations.

Thanks to the inherent flexibility of DNA that allows large-scale nuclear motions and the favorable interactions that lower the excited-state energy, the degree of overlap and stacking of the excimers can increase and the dimer can evolve toward more stable situations. It has been hypothesized¹⁶ that the dimer reaches a charge separated excimer conformation (A^+A^-)^{*} from which most part of the excimer emission is produced. A correlation has been found for distinct heterodinucleotides between the measured lifetimes case of the adenine homodimer.

We have found that the CT states are not the most stable excimer conformations, even in aqueous solutions, as discussed in previous sections. This fact does not imply that they cannot be reached in important amounts, because the evolution of the system and the yield of formation of the different arrangements in the excimer state depend also of the capability of the strand to adopt a favorable position for proper stacking. Moreover, the situation may be quite different in NAB heterodimers, not only because of the degree of overlap and stacking can be expected to be much lower but also because the charge recombination force will be more favorable than in homodimers, in particular for pairs of purine and pyridine bases, which easily compensate for their better donor and acceptor characters, respectively. In the homodimers, however, we have found that the face-to-face conformations (twisted 36° from the B-DNA form⁵³), which maximize the overlap of the π clouds, give rise to much more stable excimer situations, and it can be expected that they can be reached in noticeable quantities. The good correspondence of the computed and the experimental transient absorption spectrum described in subsection E also support such conclusion. Those conformations, in particular $^1(A^*A)_{exc}$, are analogous to those acquired by the cytosine⁴³ and thymine⁵¹ homodimers and that are precursors of the formation of the cyclobutane pyrimidine dimers, whose yields of formation have been found in significant amounts.^{9,57} As found in a recent CASPT2 study,⁵¹ these structures play a different role in the

(57) Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495–2501.

thymine and the cytosine homodimers. Even when the same type of excimer interaction is what favors the formation of the CI in the excited state, the thymine excimers are probably just intermediate short-lived conformations leading to a lower-lying CI structure and a corresponding ultrafast (1 ps⁹) and high quantum yield TT cyclodimer formation.⁵⁷ On the other hand, for the cytosine dimer they represent structures more stable than the CI, decreasing the yield and enlarging the state lifetime in the formation of CC, as found in experiment.⁵⁷ In the A homodimer, the absence of cyclodimer formation should be made to consider ¹(A*A)_{exc} as long-lived conformations, such as for the cytosine homodimer. In the case of adenine, the excimer emission energies can be expected to be within the range 4.14 eV, vertical from ¹(LE) down to 2.65 eV, vertical from ¹(A*A)_{exc} within the domain of the suggested excimer emission (4.0–2.3 eV),¹¹ and considerably red-shifted with respect to the monomer fluorescence (4.5–4.8 eV).^{5,46–50}

Once the excimer structure has been reached, the decay toward the ground-state should be much slower. The main channel for internal conversion in the adenine homodimer is the conical intersection of the monomer, (gs/ππ*)_{CI}, placed near 4.0 eV, that is almost isoenergetic with the most stable excimer structure ¹(A*A)_{exc}. As the excimer is a minimum in the potential energy surface cut on S₁, a barrier can be predicted in the decay path toward the CI, which can be attributed to the process of releasing the stacking interaction (by increasing the intermonomer distance as the main coordinate modulating the extent of binding character in the excimer) and localization of the excitation in one of the monomers. Such types of barriers, with different heights, can be expected in all paths connecting the excimer surface with the CI funnel. It is therefore plausible to attribute the lifetime measured from 103 to 182 ps in different adenine oligomers^{7,11,16} to the deactivation of the singlet excimer to the ground state, and also to support the idea of several decay channels for different excimer minima controlling the dynamics of the visible ESA region,¹¹ among them the decay by charge recombination. The results obtained for the system in water do not change the overall scheme, even when the relative stabilization of the CT states is larger (~0.2–0.3 eV) than that undergone by the non-CT states (<0.1 eV) (cf. Table 2 and text). In the polar environment and within the oligonucleotide strand it is however possible that the participation of the CT states increases.

For other NABs heterodimers the decay lifetimes have been reported ranging from 10 to 100 ps.¹⁶ Recent fs-ESA experiments performed in strands of alternating (d(GC)_n) and partially nonalternating (d(C₄G₄), d(C₅T₄G₅), d(C₅A₄G₅)) oligomers¹⁵ show how the latter decay much more slowly, what can be clearly attributed to the predominance of homodimer stacking, a promoter of stronger interaction, and lower-lying excimer states with larger lifetimes. The importance of the CT excimers can be expected to decrease in these cases. Finally, it is worth remembering that especially in pyrimidine dimers, new channels for deactivation will be open toward the formation of dipyrimidine adducts like those described recently for the production of cyclobutane cytosine and thymine homodimers.^{6,51} In the case of the cytosine dimer the corresponding conical intersection was computed at 3.5 eV, competitive with the monomer CI, at 3.6 eV, and slightly higher than the ¹(C*C)_{exc} excimer state at 3.3 eV. For thymine, on the contrary, the CI leading to the formation of the adduct was found near 3.3 eV, much lower than the ¹(T*T)_{exc} excimer state at 3.6 eV and the monomer CI at 3.9

eV, rationalizing in this way the higher formation yield found in thymine than in cytosine adducts.^{6,51} At least for those systems involving pyrimidine nucleobases additional paths for deactivation will take place via the triplet manifold, and their importance will rely on the degree of spin–orbit coupling.⁶

Summary and Conclusions

The major goal of the present research is understanding the role that adenine excimers play in the photophysics and photochemistry of adenine oligonucleotides. Our calculations on the adenine homodimer, together with our previous studies on the nucleobases pyrimidine homodimers,^{6,51} support the idea that the long-lived excited states seen in DNA model systems are of excimer (exciplex) type, that is, formed by stacks of two nucleobases, and that they are the origin of the red-shifted fluorescence observed in different oligonucleotides.^{3,11–14} The flexibility of DNA is crucial for the formation of the excimer because the degree of coupling between the two moieties, and therefore the stability of the excimer conformation, will rely on the accessible orientation in the DNA strand. We have presented here two extreme cases, the B-form DNA structure where the overlap for the two adenine monomers is limited, and the ¹(A*A)_{exc} excimer where the interaction is maximum. Intermediate to those two structures we have located charge transfer excimer states whose importance and yield of formation is expected to vary in the sequence of nucleotides depending on the driving force controlling the charge separation between the pair of bases. Such driving force is not expected to largely increase from that of the nucleobase in the biological environment where the nucleotide is surrounded with counterions.⁵⁸ The evolution of the system can be understood from an initial bifurcation between stacked and unstacked nucleobase pairs, which may decay in an ultrafast manner (in a sub-picosecond regime) toward the formation of excimer states or the ground state, respectively, the latter channel being open through the presence of the conical intersection between the S₁ and S₀ states of the monomer, (gs/ππ*)_{CI}. The formed excimer states will, on the other hand, display weak fluorescence and much slower decay times (from tenths to hundred of ps) to the ground state once the barrier to reach the CI of the monomer has been surmounted, a barrier that will be basically related to the energy required to separate the interacting moieties. Additional channels for deactivation will be accessible for pyrimidine dimers with the formation of nucleobase adducts like the cyclobutane pyrimidine dimers through a corresponding conical intersection or singlet–triplet crossing.^{6,51}

It is clear therefore that DNA dynamics (see ref 59 for a recent review), its photophysics and photochemistry, will be controlled to a large extent by the formation of excimers/exciplexes, that is, nucleobase excited dimers, and also that the yield in which these excited dimers will be reached will strongly depend on the conformational properties of the DNA strand and the possibility of generating reactive orientations. Intrastrand stacking interactions seem in this way more relevant than interstrand proton/hydrogen interactions to explain the relaxation dynamics of DNA, which in this way presents slow decay pathways not existent in the monomer

(58) Rubio, M.; Roca-Sanjuán, D.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. J. *Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 10234–10235.

(59) Middleton, C. T.; De La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernández, C.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217–239.

nucleobases. The relevance of the different excimer/exciple complex conformations (face-to-face, charge transfer) in the photochemistry of the different sequence of nucleobases will have to be studied in the future from a theoretical viewpoint, in particular in the formation of exciplexes.

Acknowledgment. Financial support is acknowledged from projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience of the Spanish MEC/FEDER.

Supporting Information Available: Additional details on the basis set superposition error correction, BSSE-uncorrected curves, solvation model, and Cartesian coordinates of all the structures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA808280J

**"Electrostatic Control of the Photoisomerization Efficiency and
Optical Properties in Visual Pigments: on the Role of
Counterion Quenching".**

**G. Tomasello, G. Olaso-González, P. Altoè, M. Stenta, L.
Serrano-Andrés, M. Merchán, G. Orlandi, A. Bottoni, and M.
Garavelli**

Journal of the American Chemical Society, 131, 5172-5186 (2009)

Electrostatic Control of the Photoisomerization Efficiency and Optical Properties in Visual Pigments: On the Role of Counterion Quenching

Gaia Tomasello,[†] Gloria Olaso-González,[‡] Piero Altoè,[†] Marco Stenta,[†] Luis Serrano-Andrés,[‡] Manuela Merchán,^{*,‡} Giorgio Orlandi,[†] Andrea Bottoni,[†] and Marco Garavelli^{*,†}

Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", Università di Bologna, via Selmi 2, Bologna I-40126, Italy, and Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, ES-46071 Valencia, Spain

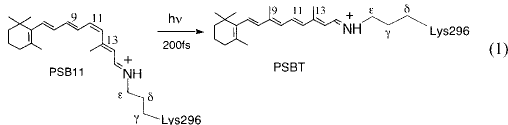
Received October 28, 2008; E-mail: Manuela.Merchan@uv.es; marco.garavelli@unibo.it

Abstract: Hybrid QM(CASPT2//CASSCF/6–31G*)/MM(Amber) computations have been used to map the photoisomerization path of the retinal chromophore in Rhodopsin and explore the reasons behind the photoactivity efficiency and spectral control in the visual pigments. It is shown that while the electrostatic environment plays a central role in properly tuning the optical properties of the chromophore, it is also critical in biasing the ultrafast photochemical event: it controls the slope of the photoisomerization channel as well as the accessibility of the S₁/S₀ crossing space triggering the ultrafast decay. The roles of the E113 counterion, the E181 residue, and the other amino acids of the protein pocket are explicitly analyzed: it appears that counterion quenching by the protein environment plays a key role in setting up the chromophore's optical properties and its photochemical efficiency. A unified scenario is presented that discloses the relationship between spectroscopic and mechanistic properties in rhodopsins and allows us to draw a solid mechanism for spectral tuning in color vision pigments: a tunable counterion shielding appears as the elective mechanism for L→M spectral modulation, while a retinal conformational control must dictate S absorption. Finally, it is suggested that this model may contribute to shed new light into mutations-related vision deficiencies that opens innovative perspectives for experimental biomolecular investigations in this field.

1. Introduction

The protonated Schiff base of the 11-*cis* retinal (PSB11) is the chromophore of visual pigments.^{1–6} These include rhodopsin (Rh) that peaks at 498 nm⁷ and is used in twilight vision and the human three color vision pigments that peak at 425 nm (S-cone or blue), 530 nm (M-cone or green), and 560 nm (L-cone or red).^{7,8} The biological activity of rhodopsins is triggered by the

ultrafast (200 fs in Rh, see eq 1) light-induced *cis*→*trans* isomerization of the corresponding retinal chromophores that, in turn, induces a conformational change in the protein on longer time scales.^{1,5} This ultrashort photochemical step is usually referred to as the primary event of the protein photocycle.



We have previously reported^{9–14} the results of *ab initio* CASPT2//CASSCF minimum energy path (MEP) mapping for the photoisomerization *in vacuo* of reduced models of the retinal

[†] Università di Bologna.

[‡] Universitat de València.

- (1) Kandori, H.; Shichida, Y.; Yoshizawa, T. *Biochemistry (Moscow)* **2001**, *66*, 1197.
- (2) Needleman, R. Bacteriorhodopsin and Rhodopsin. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; Horspool, W. M., Song, P.-S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1995; pp 1508–1515.
- (3) Ottolenghi, M.; Sheves, M. *Isr. J. Chem.* **1995**, *35*, U3.
- (4) Wald, G. *Science* **1968**, *162*, 230.
- (5) Mathies, R.; Lugtenburg, J. The Primary Photoreaction of Rhodopsin. In *Molecular Mechanism of Vision*; Stavenga, D. G., DeGrip, W. J., Pugh, E. N. J., Eds.; Elsevier Science Press: New York, 2000; Vol. 3, pp 55–90.
- (6) Yoshizawa, T.; Kuwata, O. Vision: Photochemistry. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; Horspool, W. M., Song, P.-S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1995; pp 1493–1499.
- (7) Wald, G.; Brown, P. K. *Science* **1958**, *127*, 222.
- (8) McBee, J. K.; Palczewski, K.; Baehr, W.; Pepperberg, D. R. Confronting Complexity: The Interlink of Phototransduction and Retinoid Metabolism in Vertebrate Retina. In *Progress in Retinal and Eye Research*; Osborn, N. N., Chader, G. J., Eds.; Elsevier: U.K., 2001; Vol. 20, p 469.

- (9) Garavelli, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Vreven, T.; Klein, S.; Celani, P.; Robb, M. A. *Faraday Discuss.* **1998**, *110*, 51.
- (10) González-Luque, R.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Merchán, M.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9379.
- (11) Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12509.
- (12) De Vico, L.; Page, C. S.; Garavelli, M.; Bernardi, F.; Basosi, R.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4124.
- (13) Garavelli, M.; Vreven, T.; Celani, P.; Bernardi, F.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1285.
- (14) Garavelli, M.; Celani, P.; Bernardi, F.; Robb, M. A.; Olivucci, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6891.

chromophore, and very recently, the results for the real (i.e., unreduced) PSB11 chromophore have been presented.¹⁵ It has been shown that the reaction mechanism is characterized by a *two-mode* photoisomerization path (first stretching then one-bond-flip (OBF)^{16,17} torsion of the reacting double bond) that develops entirely on the spectroscopic (charge transfer) state S_1 . This path is essentially barrierless and drives the system into a central double bond twisted S_1/S_0 conical intersection (CI) funnel whose geometry and electronic structure are consistent with those of a twisted intramolecular charge transfer (TICT) state.^{10,12,13} This point triggers the ultrafast decay to the ground state and prompts an efficient photoproduct formation.

While the aforementioned results disclose the intrinsic photoisomerization ability of the retinal chromophore, environmental factors (such as the ones involved in the solvent or protein) are known to affect both its spectroscopy and photochemistry.¹⁸ For instance, the absorption maximum in Rh, 498 nm, appears to be red-shifted with respect to the one observed in solution (440 nm), and the protein structure itself plays a role in the spectral tuning of the pigments as revealed by the three (S, M, and L) color vision pigments (in this context, the spectral effects of the substitution of one or more amino acids have been widely investigated experimentally).^{8,19,20} Second, while in the protein the photoreaction is finalized in 200 fs with a high (ca. 67%) quantum yield (QY)^{21,22} under stereoselective control (i.e., only the *all-trans* (PSBT) photoproduct is produced), the isolated chromophore in solution (e.g., methanol or hexane) features a biexponential excited-state decay dynamics with a dominant (almost 20-fold longer) 2 ps component,^{21,23,24} the stereoselectivity is lost, and the QY decreases (ca. 25%).^{21,25} Consistently, an excited-state energy barrier has been observed for PSBT in solvent,²³ while no barriers are expected for Rh due to the subpicosecond nature of the process,^{9,11} arising questions on the origin of the protein catalytic effect that makes this event one of the fastest photochemical reactions observed so far in nature.

It is apparent that both steric and electrostatic interactions between the chromophore and the surrounding protein pocket must play a key role in tuning/controlling the photochemical and photophysical behavior of the system. The reasons behind the optical properties and catalytic effect of Rh have been widely investigated in the past both experimentally and computationally. Those works reveal that different cooperative effects are responsible for the increased efficiency and photoisomerization rate observed in the visual pigment. For instance, previous

experimental works by Mathies and co-workers²⁶ have shown that intramolecular steric interactions between the retinal C_{10} -hydrogen and the C_{13} -methyl do significantly affect the efficiency (i.e., QY and rate) of the photoisomerization process. Consistently with this view, Buss and co-workers²⁷ have recently shown that the ground-state twists of the $C_{11}=C_{12}$ and the $C_{12}-C_{13}$ bonds (which are mainly due to interaction with the Rh protein pocket) help to effectively and rapidly transfer stretch energy into torsion energy and thus populate efficiently the isomerization coordinate. Furthermore, recent reports on crystal structures of Rh^{28,29} have pointed out the close proximity of Cys-187 with the retinal C_{12} -hydrogen, suggesting how such an interaction could lead to enhanced isomerization upon photoexcitation. Besides steric interactions, also electrostatic effects are expected to play a major role in photoisomerization catalysis as the photoactive state S_1 has a charge transfer nature and its energy is expected to depend on interactions with surrounding charged residues and polar groups. The same holds (for the same reasoning) for the TICT S_1/S_0 CI funnel and, more generally, for the S_1/S_0 crossing seam. In fact, its position is dictated by external charges that may displace the S_1/S_0 crossing seam out of the ideal photoisomerization channel or can even remove it.^{18,30} Anyway, while steric effects on the photoisomerization have been deeply analyzed, studies on electrostatic effects appear to be mainly focused on static spectral properties (i.e., vertical excitations) rather than on the efficiency of the photochemical reaction, and to the best of our knowledge no precise and systematic analysis of these effects on the photoisomerization ability of the chromophore in the visual pigments is available to date. For example, a static as well as dynamical molecular level description of the primary photoisomerization event in Rh has been recently reported by Olivucci and co-workers^{31–33} using Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM)³⁴ computations at the multiconfigurational (CASSCF)/correlated energy (CASPT2) resolution. This is the reference simulation to date on Rh photoreaction. Nevertheless, the study does not focus on or analyze the reasons behind Rh photoisomerization efficiency, such as environment electrostatic effects. Among these, the interaction with the formal E113 counterion and nearby charged/polar residues must be carefully analyzed as they are likely to be the principal contributors of these effects. Interestingly, the protonation state of the E181 residue (that is located right above the photoactive central double bond of the chromophore)^{28,29,35} has been recently reconsidered: while previous two-photon absorption³⁶ and mutation experiments^{37,38} seemed to

- (15) Cembran, A.; González-Luque, R.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Garavelli, M. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 173.
 (16) Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; Benjamin-Cummings: Menlo Park, CA, 1991.
 (17) Gilbert, A.; Baggott, J. *Essentials of Molecular Photochemistry*; Blackwell Science: Oxford, 1991.
 (18) Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16018.
 (19) Nathans, J.; Piantanida, T. P.; Eddy, R. L.; Shows, T. B.; Hogness, D. S. *Science* **1986**, *232*, 203.
 (20) Kochendoerfer, G. G.; Lin, S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 300.
 (21) Hamm, P.; Zurek, M.; Roschinger, T.; Patzelt, H.; Oesterheld, D.; Zinth, W. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *263*, 613.
 (22) Kandori, H.; Sasabe, H.; Nakanishi, K.; Yoshizawa, T.; Mizukami, T.; Shichida, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1002.
 (23) Logunov, S. L.; Song, L.; ElSayed, M. A. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18586.
 (24) Kandori, H.; Katsuya, Y.; Ito, M.; Sasabe, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2669.
 (25) Freedman, K. A.; Becker, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1245.

- (26) Kochendoerfer, G. G.; Verdegem, P. J. E.; vanderHoef, I.; Lugtenburg, J.; Mathies, R. A. *Biochemistry* **1996**, *35*, 16230.
 (27) Sugihara, M.; Hufen, J.; Buss, V. *Biochemistry* **2006**, *45*, 801.
 (28) Teller, D. C.; Okada, T.; Behnke, C. A.; Palczewski, K.; Stenkamp, R. E. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7761.
 (29) Okada, T.; Sugihara, M.; Bondar, A. N.; Elstner, M.; Buss, V. *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 571.
 (30) Cembran, A.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 6255.
 (31) Andruniów, T.; Ferré, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 17908.
 (32) Migani, A.; Sinicropi, A.; Ferre, N.; Cembran, A.; Garavelli, M.; Olivucci, M. *Faraday Discuss.* **2004**, *127*, 179.
 (33) Frutos, L. M.; Andruniów, T.; Santoro, F.; Ferre, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 7764.
 (34) Lin, H.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *117*, 185.
 (35) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M. *Science* **2000**, *289*, 739.
 (36) Birge, R. R.; Murray, P. P.; Pierce, B. M.; Akita, H.; Balogh-Nair, V.; Finsden, L. A.; Nakanishi, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 4117.

suggest a neutral binding site and assigned it to a neutral (i.e., protonated) species, recent experimental^{39–41} and computational studies⁴² suggest a deprotonated (i.e., negatively charged) 181 residue. Implications of this nearby negative charge on the photoisomerization efficiency and stereoselectivity have been suggested.^{18,30,41} Among others, these still unresolved issues represent a stimulus for the present QM/MM investigation, although here a more systematic study of all (both close and far) residues playing a role on these effects is considered.

As mentioned above, Rh absorption peaks at 498 nm.⁷ This is a well established result, whereas uncertainties exist for the absorption values of higher energy states. The Rh absorption spectrum recorded by Ebrey and Honig⁴³ displays, in addition to the dominant 498 nm component, a second smaller maximum at a shorter wavelength peaking at ~340 nm. This should refer to a less absorbing higher energy state with an oscillator strength that is roughly one-third of S_1 , as the inspection of the spectrum approximately reveals. Two-photon absorption experiments by Birge and co-workers³⁶ on Rh (containing a 11-cis-locked retinal analogue to prevent bleaching) suggest an S_2 (covalent dark A_g -like) state that is only 2000 cm^{-1} above S_1 (which would lead to a vertical 63 kcal/mol (i.e., 453 nm) energy value for this state). If this were the case, the higher energy 340 nm band observed by Ebrey and Honig would originate from a state higher than S_2 . Anyway, based on the absorption values recorded for isolated retinal chromophores in the gas phase (that place the signatures of the S_2 state at much higher energies), Andersen and co-workers⁴⁴ have very recently reassigned the observed 2000 cm^{-1} two-photon absorption band to a vibrational feature of the bright lowest energy S_1 state spectrum, thus suggesting that S_2 does correspond indeed to the 340 nm band.

In recent computational investigations, both Buss⁴⁵ and Olivucci³¹ successfully reproduced Rh absorption by applying the same approach (with the former value in remarkable good agreement with the experimental data): multireference perturbation level (CASSCF(12,12)/CASPT2) calculations on the chromophore put in the bath of the protein point charges. Anyway, the protein embedded retinal structure employed to compute spectroscopic properties was optimized according to a DFT-based and CASSCF method, respectively. Interestingly, the reasons leading to reproduction of the correct absorption value are contrasting and striking differences in the two cases. In the

former, the Rh electrostatic environment is shown to have only a very minor effect on the absorption properties of the chromophore/couterion (E113) couple (that alone does almost reproduce the correct S_1 energy found in the protein), while in the latter this effect is major as it quenches (i.e., counterbalance) almost fully the electrostatic effect of the counterion, basically recovering the absorption energy computed for the isolated distorted (i.e., optimized within the protein) chromophore (that alone does already almost reproduce the value observed in the protein). Additionally, Buss reproduces fairly well (66.7 kcal/mol)⁴⁵ the lower energy value reported by Birge for S_2 (63 kcal/mol),³⁶ while for the same (i.e., covalent A_g -like) S_2 state Olivucci replicates satisfactorily (87.5 kcal/mol)³¹ the 340 nm (84 kcal/mol) absorption feature observed by Ebrey and Honig.⁴³ While those results were both obtained considering a neutral Glu-181 residue, more recently Bravaya et al. (yet applying another perturbative QM/MM approach) successfully reproduced Rh absorption (as well as the gas and solution values)⁴⁶ using a charged E181; shielding of the counterion by the protein field was also predicted in this case. Additionally, recent SAC-CI QM/MM computations⁴⁷ also nicely predicted S_1 excitation (using a neutral E181), but no shielding emerged. Finally, Altun et al.⁴⁸ have very recently reproduced Rh absorption as well (and that of its mutants) employing a DFT/TD-DFT QM/MM procedure: E181 was still considered neutral, and the counterion was predicted to produce a much smaller blue shift (from 4 to 6 kcal/mol only) than in all previous studies and to be unquenched by the protein (i.e., the net effect of the other amino acids is negligible). It is apparent that all those contrasting findings call for a major reinvestigation of Rh spectroscopic properties. This is far from being just a simple academic issue, as it involves disclosure of the role played by protein electrostatic effects in spectral tuning.

In this paper, the primary photochemical event of Rh and the singlet manifold characterizing this process are explored by *ab initio* multiconfigurational perturbation theory calculations (CASPT2/CASSCF) via adopting a novel (recently developed by our group) hybrid QM/MM procedure accounting for electrostatic embedding at the QM level.⁴⁹ The most recent and best-resolved crystallographic structure available for Rh is employed,²⁹ and the protein embedded photoisomerization path is mapped. While the structure of the photoisomerization coordinate in Rh is not the focus of this study (as it has been documented and discussed in detail elsewhere),^{31–33} herein we provide information on the effects that the protein electrostatic environment may exercise on the (i) optical (i.e., spectral tuning) and (ii) photoreactivity properties of rhodopsins. For this purpose, the effect of both close and distant residues is explicitly accounted for and analyzed. While we do not want to reject or question other effects that have been previously recognized in photoisomerization catalysis, here we provide computational evidence for a mechanism of electrostatic control in the photoactivity of visual pigments that have not been recognized before. A thoughtful discussion of all the most recent experimental/computational findings compared to the presented results is shown, which supports this new view. Finally, a unified model

- (37) Yan, E. C. Y.; Kazmi, M. A.; De, S.; Chang, B. S. W.; Seibert, C.; Marin, E. P.; Mathies, R. A.; Sakmar, T. P. *Biochemistry* **2002**, *41*, 3620.
- (38) Yan, E. C. Y.; Kazmi, M. A.; Ganim, Z.; Hou, J. M.; Pan, D. H.; Chang, B. S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 9262.
- (39) Lewis, J. W.; Szundi, I.; Kazmi, M. A.; Sakmar, T. P.; Klinger, D. S. *Biochemistry* **2004**, *43*, 12614.
- (40) Terakita, A.; Yamashita, T.; Shichida, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 14263.
- (41) Ludeke, S.; Beck, R.; Yan, E. C. Y.; Sakmar, T. P.; Siebert, F.; Vogel, R. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 345.
- (42) Rohrig, U. F.; Guidoni, L.; Rothlisberger, U. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 223A.
- (43) Ebrey, T. G.; Honig, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1972**, *69*, 1897.
- (44) Nielsen, I. B.; Lammich, L.; Andersen, L. H. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, 018304. Although this work refers to bR 2-photon spectra, a parallel reasoning holds for Rh too, due to the similarity of the two spectra: Rh and bR give very similar outcomes in two-photon experiments; namely a very low energy S_2 signature (very close to S_1) has been assigned both in Rh and bR in the 2-photon experiments, which has been questioned by Andersen and coworkers. In conclusion, the assignment of the S_2 feature in Rh is still far from being unbiased and fully solved.
- (45) Sekharan, S.; Sugihara, M.; Buss, V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 269.

- (46) Bravaya, K.; Bochenkova, A.; Granovsky, A.; Nemulkin, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13035.
- (47) Fujimoto, K.; Hayashi, S.; Hasegawa, J.; Nakatsui, H. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 605.
- (48) Altun, A.; Yokoyama, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6814.
- (49) Altoè, P.; Stenta, M.; Bottoni, A.; Garavelli, M. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 219.

is drawn that discloses the relationship between spectroscopic and mechanistic properties in Rh and related (blue, green, and red) color vision pigments. This leads to formulating a solid mechanism for spectral tuning in color vision pigments. It is anticipated here that these findings may open novel scenarios in the rationale of mutations-dependent vision deficiencies.

2. Computational Details

All computations are performed using a new hybrid QM/MM³⁴ potential recently developed by our group.⁴⁹ Details of this hybrid approach are presented elsewhere (see also the Supporting Information). Briefly, the method is based on a hydrogen link-atom scheme.⁵⁰ QM and MM layers interact in the following way: (i) all QM atoms feel the electrostatic potential of all MM point charges (i.e., an electrostatic embedding scheme has been adopted); (ii) all the bonding (i.e., stretching, bending, and torsion) and the Van der Waals QM/MM cross terms are described by the standard MM potential; and (iii) electrostatic interactions involving MM atoms are all accounted for classically. In this case, the QM–MM frontier is placed at the C_β–C_γ bond of the Lys-296 side chain (see eq 1). The QM region (i.e., the chromophore atoms) is treated by ab initio CASSCF/6–31G* computations using the Gaussian03⁵¹ suite of programs (a complete active space of 12 π -electrons in 12 π -orbitals (12e/12o) is employed to describe the CASSCF wave function), while the AMBER8⁵² software and the ff99 force field⁵² is used for the MM region (i.e., the opsin) and its charges. CASSCF/AMBER QM/MM computations are accomplished using the COBRAMM interface,⁴⁹ implemented by our group, that links Gaussian03⁵¹ and AMBER8⁵² packages.

Protein chain (the monomer A) of the recently crystallized and best-resolved X-ray structure available for bovine Rh (PDB code: 1U19, resolution = 2.2 Å),²⁹ which has no missing amino acids, is used for the protein framework. Hydrogen atoms are added by means of the H++ software.⁵³ In general, all titratable groups are carefully reconsidered, and through an accurate analysis the following choice is adopted: the Glu-113 counterion is taken charged, Glu-122 is neutral, Glu-181 is considered both charged and neutral in two different protein setups (Rh_{181(-)}} and Rh_{181H}}, respectively), all other glutamate residues are charged, lysine residues are protonated, Asp-83 is protonated, and three (Hip-65, Hip-100, Hip-278) of the six histidine residues are protonated.

The protein framework is kept fixed during all QM/MM geometry optimizations (we assumed that it has no time to change during the ultrafast (200 fs) time scale of the primary photoinduced event), while all QM atoms and MM atoms comprising the Lys-296 side chain (C_βH₂, C_γH₂, C_δH₂) and the two water molecules (W1 and W2, that are described by TIP3P) are left free to relax.

An S₀–S_n *n*-root state average CASSCF wave function (equally weighting all the *n* roots) is always used for geometry optimizations on the S_n state, while a single-state wave function is used for ground-state optimizations. A relaxed scan (with the central dihedral angle fixed at specified values) is used to trace the photoisomerization channel in the protein, while fully unconstrained optimizations are employed to locate all the critical points.

To account for correlation energy, both CASPT2⁵⁴ and MS-CASPT2^{55,56} single-point computations are performed on the

Table 1. CASPT2 Relative Energies (ΔE , kcal/mol) for the Lowest Three Singlet States of Two Different Protein Setups (Rh_{181(-)}} and Rh_{181H}})^a

protein structure	chromophore state (electronic nature)	ΔE	$f_{S_0-S_n}$	wavefunction ^b (coefficient)
Rh _{181(-)}}	S ₀ (A _g -like)	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)
	S ₁ (B _u -like)	57.6	0.74	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.63)
	S ₂ (A _g -like)	82.0	0.27	(6a) ⁰ (7a) ² (0.11) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.19)
Rh _{181H}}	S ₀ (A _g -like)	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)
	S ₁ (B _u -like)	53.6	0.75	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.64)
	S ₂ (A _g -like)	81.6	0.28	(6a) ⁰ (7a) ² (0.10) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.18)

^a Oscillator strengths for ground state excitations ($f_{S_0-S_n}$) and wavefunction characterization are also reported. ^b 6a and 7a represent the HOMO and LUMO π orbitals, respectively.

optimized points in the bath of the protein (AMBER) point charges, by using the MOLCAS-6.0 package.⁵⁷ Unless otherwise stated, a three-root state average wave function is employed. To minimize the influence of weakly interacting intruder states at the second-order level, the so-called imaginary level shift technique is used (imaginary shift value = 0.2).¹⁰ QM(CASPT2)/MM energies are taken as the reference values throughout the work, while MS-CASPT2 corrections are considered only when a multistate problem appears (this happens only in one specific situation as will be discussed in the text below); see also Supporting Information for details. The CASSCF state interaction (CASSI) method⁵⁸ is used (as implemented in MOLCAS-6.0⁵⁷) to calculate the transition dipole moments. Oscillator strengths (*f*) are computed using CASSCF transition moments and CASPT2 corrected energies.

The charge distribution along the chromophore chain is evaluated according to state-averaged CASSCF wave functions by Mulliken charge analysis and is used to characterize the electronic nature (i.e., ionic vs covalent) of the investigated states.

A Reverse Fingerprint (RFP) analysis is employed on the investigated residues to highlight their electrostatic effects on the excitation energy: this is done by switching off specifically the charges of the investigated residue (while leaving on all the other charges of the protein environment) and recording the CASPT2 (blue or red) shift in the chromophore S₁ excitation energy with respect to the reference Rh value (that is represented by the zero line in the corresponding figure; see below).

3. Results and Discussion

3.1. The Glu181 Issue: Neutral or Protonated. Inspired by the recent works^{39–42} that have readdressed the charge state of the Glu-181 residue in Rh (considered neutral so far), the chromophore structure has been optimized into both a neutral (Rh_{181H}}) and negatively charged (Rh_{181(-)}}) protein binding pocket, corresponding to a neutral (i.e., protonated) or a charged (i.e., deprotonated) Glu-181 residue, respectively. Table 1 reports CASPT2 vertical energies computed for the S₁ (ionic/charge-transfer B_u-like) and S₂ (covalent A_g-like) states of the chromophore optimized in the ground state of the two different setups together with their oscillator strengths and wave function characterization. Interestingly, while Rh_{181H}} leads to an S₁ energy (53.6 kcal/mol) that is slightly underestimated with respect to the observed absorption value (peaking at 57.4 kcal/mol, i.e. 498 nm), Rh_{181(-)}} reproduces remarkably well this energy (57.6 kcal/mol). On the other hand, S₂ appears unaffected by the

(56) Serrano-Andres, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104107.

(57) Andersson, K. *MOLCAS*, 6.0; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, 2004.

(58) Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *155*, 189.

- (50) Singh, U. C.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 718.
 (51) Frisch, M. J. *Gaussian 03*, revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
 (52) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668.
 (53) Gordon, J. C.; Myers, J. B.; Foltz, T.; Shoja, V.; Heath, L. S.; Onufriev, A. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 368.
 (54) Andersson, K.; Malmqvist, P. A.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
 (55) Malmqvist, P. A.; Roos, B. O.; Serrano-Andres, L. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *288*, 299.

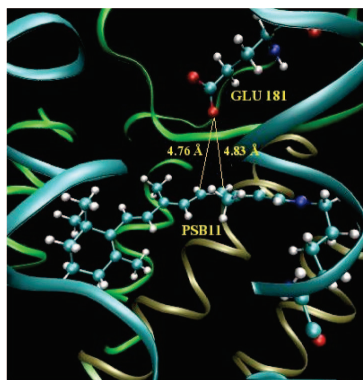


Figure 1. Retinal binding pocket in Rh drawn from its crystallographic structure.²⁹ It is apparent that Glu-181 is placed right above the central $C_{11}=C_{12}$ double bond of the chromophore, in a symmetric position with respect to its β -ionone tail and protonated Schiff base head.

electrostatic environment, leading to an energy value that is ca. 82 kcal/mol in both cases. This is consistent with S_2 possessing the same electronic nature as S_0 (covalent A_g -like; i.e., they have a similar electronic density distribution), leading to an S_0-S_2 energy gap that is barely affected by external electrostatic effects. This value and its computed oscillator strength (0.3, see Table 1) nicely agree with the secondary (less intense) higher energy absorption feature observed in Rh at 340 nm (84 kcal/mol) by Ebrej and Honig.⁴³ Note also that it greatly differs from the other experimental value (by two-photon absorption) observed by Birge and co-workers³⁶ that is much closer to the value computed by Buss.⁴⁵ Nonetheless, the covalent S_2 state assignment from two-photon experiments has been recently questioned⁴⁴ so that uncertainties still exist on the S_2 absorption energy in rhodopsin-type proteins. It is worth noting that this may be very valuable information since it would provide an outstanding test for QM/MM approaches, as it appears that very different energies are predicted for this state in Rh according to the different computational approaches employed.

Although this spectroscopic scenario is in qualitative agreement with the one reported by Olivucci and co-workers,³¹ the quantitative agreement with the experiments appear to be significantly improved. Furthermore, an electrostatic environment (with a charged Glu-181) that is different than the one conventionally used has been considered here (as also done in a recent work by Bravaya et al.⁴⁶).

While a charged Glu-181 residue is consistent with the changes observed in the spectrum of some 181-mutated Rh (e.g., E181Q and E181D),³⁹ it is in contrast with other mutations^{37,38} that revealed a very minor effect on the S_1 absorption energy due to 181 substitution and that were taken as a proof for a neutral Glu-181. It is apparent that absorbance measurements on Rh mutants do not give a clear-cut answer about whether E181 is ionized in the dark. This is not surprising as this residue is placed right above the central $C_{11}=C_{12}$ double bond of retinal (i.e., in a symmetric position with respect to the PSB head and the β -ionone tail of the chromophore that supports charge translocation upon photoexcitation to S_1 ; see Figure 1), which makes S_1 rather insensitive to its protonation state, as recent computational investigations indeed reveal.^{18,30,46} This has also been pointed out recently by Kliger and co-workers.³⁹ Consistently, it must be noted that the computed effect of Glu-181

ionization on S_1 absorption, although not negligible (ca. 3 kcal/mol), is very much less than the one expected in general for a nearby charged residue (e.g., the effect of the Glu-113 counterion residue (ca. 0.6 eV) reported and discussed below). As its protonation state has much less impact on Rh absorbance than generally assumed, mutation experiments must be carefully analyzed. A number of other experimental/computational evidence have been very recently collected that suggest a charged Glu-181, specifically: (i) Glu-181 acts as the counterion in invertebrate rhodopsins;^{30,59} (ii) Glu-181 must be ionized to stabilize the late photointermediates (e.g., MI) and make efficient the photoactivation cycle of visual pigments (the so-called Glu-113/Glu-181 counterion switch model);^{37,38,60,61} (iii) Glu-181 is deprotonated (together with the primary counterion) in the mouse short-wavelength sensitive visual pigment (MUV);^{60,61} (iv) Glu-181 is the counterion in parpapinopsin that shares with Rh a great sequence identity;⁵⁹ (v) FTIR spectroscopy studies⁴¹ and MD simulations⁴² of Rh are consistent with a negatively charged Glu-181 in the ground state. Taken all together and jointly with the present results, these findings suggest a deprotonated 181 residue and an overall negatively charged binding pocket.

To disclose the possible effects that the protonation state of Glu-181 may have on the chromophore photoisomerization ability, the photoisomerization channel is computed for both Rh_{181H} and $Rh_{181(-)}$, and the two paths are reported and compared in Figure 2. Since Glu-181 is positioned near the center of the chromophore, no significant effects are foreseen on the photoisomerization process for the same reasons discussed above. Consistently, Figure 2 shows that the photoreaction efficiency is the same regardless of its protonation state: both the slope and the CI funnel are unaffected. These results seem to question the possible involvement of the Glu-181 residue in assisting the primary photochemical event, invoking its role "only" in the stabilization of the later photocycle intermediates and the promotion of Rh photoactivation (as according to the counterion switch model).^{37,38,60,61} In this respect, and according to the presented results, both Rh_{181H} and $Rh_{181(-)}$ can be safely utilized to properly study the primary photoisomerization event and its mechanism. Additionally, it must be said that our results cannot be considered as conclusive proof for the Glu-181 protonation state, as the accuracy of the methodology is not sufficient to make a certain statement. The intrinsic accuracy of CASPT2 is on the order of 0.1 eV, and the basis set used may have some impact as well. The point charge approximation used to simulate the protein electrostatic force field (including the counterion effect) and the lack of protein polarizability may be further sources of approximation. A more focused computational analysis involving different approaches and tools, such as protein relaxation and dynamics, would be better suited to disclose this issue. Anyway, since $Rh_{181(-)}$ does reproduce remarkably well the spectroscopic properties observed in Rh, it agrees with some of the most recent experimental findings on this topic (as discussed above), and since the results presented in this paper are unaffected by the protonation state of Glu-181, we will consider this setup thereafter for Rh.

(59) Terakita, A.; Koyanagi, M.; Tsukamoto, H.; Yamashita, T.; Miyata, T.; Shichida, Y. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 284.

(60) Kusnetsov, A. K.; Dukkkipati, A.; Babu, K. R.; Ramos, L.; Knox, B. E.; Birge, R. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 941.

(61) Ramos, L. S.; Chen, M. H.; Knox, B. E.; Birge, R. R. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5330.

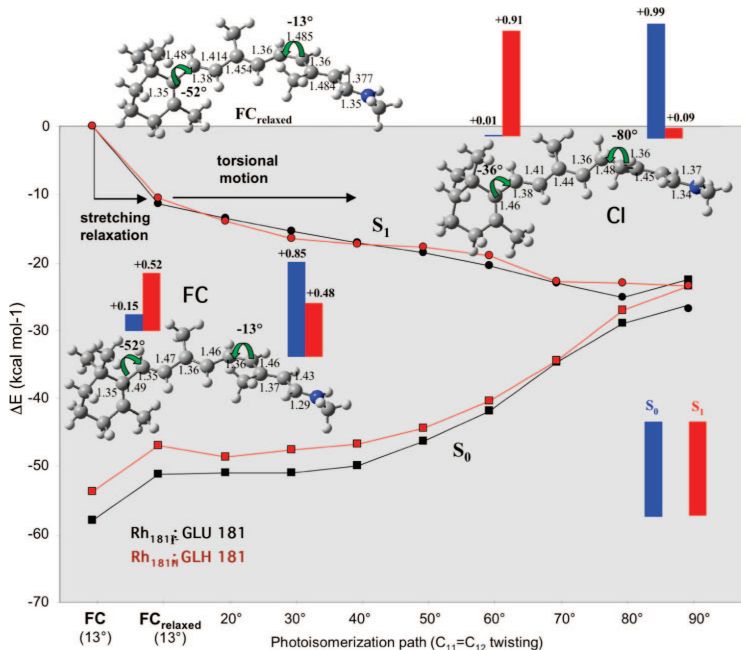


Figure 2. CASPT2 corrected S_0 and S_1 energy profiles along the QM(CASSCF)/MM relaxed scan on S_1 tracing the photoisomerization process in the two different Rh setups, from the Franck–Condon (FC) point to the twisted conical intersection funnel (CI), through a point (FC_{relaxed}) where only skeletal bond stretchings have been relaxed (i.e., dihedral angles have been frozen here). Bar diagrams display the fractional positive charge on each chromophore half with respect to the rotating central bond. Molecular parameters are reported in Å and degrees.

It is worth noting that previous QM/MM studies on Rh photoisomerization^{31,33} surprisingly showed the existence of an intermediate (i.e., a minimum) on S_1 that seems apparently to contrast with the ultrafast photoisomerization observed in Rh. Although this fact does not appear to disfavor retinal subpicosecond photoisomerization dynamics (but this result is based on just a single MD simulation at 0 K),³³ in this work (starting from the best-resolved X-ray structure of Rh),²⁹ we partially revise this picture as we find a fully barrierless path with no excited-state intermediate and obtain a static description of the mechanism whose energies are more coherent with experimental observations. Obviously, the photoisomerization mechanism is the same as that documented before,^{9,11} i.e., a complex reaction coordinate²⁹ is involved, differing from the simple OBF mode: that is, cooperative/concurrent twisting motions of adjacent C–C bonds result in a space saving mechanism that resembles (although aborted and developed only asynchronously and transiently) the bicycle pedal model proposed a few decades ago by Warshel in his pioneering computational studies^{62,63} that already successfully predicted, by semiempirical molecular dynamics simulations, the correct 200 fs time scale for the photoisomerization process in Rh. Notably, the computed direction of twisting is in agreement with the sign of the initial $C_{11}=C_{12}$ twist which has been previously derived^{27,31,64} in Rh.

3.2. Counterion and the Other Polar/Charged Residues: Counterion Quenching by the Protein Pocket. In this section we will decompose the protein electrostatic effects eventually building up the absorption energy observed in Rh. This analysis

appears to be relevant for spectral tuning but turns out to be crucial also for the photoisomerization efficiency, as it will be discussed further below.

3.2.1. Optical Properties. Table 2 shows how the S_1 (ionic, single excitation B_u -like) and S_2 (covalent, double excitation A_g -like) absorption properties change upon increasing the complexity of the system, i.e. from the isolated chromophore (PSB11_{dist}) to the full protein (Rh₁₈₁₍₋₎), passing through the ion-pair (PSB11_{dist}–E113) system and shells of increasing size (i.e., comprising all the residues within a specified radius around the chromophore: Rh_{r=2.0Å}, Rh_{r=2.2Å}, Rh_{r=2.5Å}, Rh_{r=3.0Å}, Rh_{r=3.5Å}). Note that the chromophore structure is always the distorted one (PSB11_{dist}) optimized in the protein. This analysis allows us to progressively identify the protein residues that finally lead to the recorded Rh absorption. Scheme 1 summarizes these results graphically. As expected (see the discussion in the previous section), S_2 is much less affected by external charges and its energy remains substantially unchanged, while S_1 is very much sensitive to the electrostatic environment. Not surprisingly, the major effect on S_1 comes from the counterion (E113): an S_1 vertical absorption energy of 74.7 (CASPT2) and 65.7 (MS-CASPT2) kcal/mol is predicted in the PSB11_{dist}–E113 couple that is significantly blue-shifted (by ca. 25(CASPT2)/15(MS-CASPT2) kcal/mol) with respect to the value calculated in the bare chromophore PSB11_{dist} (50.3 kcal/mol). The 15 kcal/mol (MS-CASPT2) blue shift effect is in quantitative agreement with

(62) Warshel, A. *Nature* **1976**, *260*, 679.

(63) Warshel, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1978**, *75*, 5250.

(64) Buss, V.; Kolster, K.; Terstegen, F.; Vahrenhorst, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1893.

Table 2. CASPT2 Relative Energies (ΔE , kcal/mol) for the Lowest Three Singlet States, Oscillator Strengths for Ground State Excitations ($f_{S_0 \rightarrow S_i}$) and Structure Characterization (List of Comprised Residues) for Systems of Increasing Size and Complexity^a

structure	chromophore state (electronic nature)	ΔE	$f_{S_0 \rightarrow S_i}$	wave function ^b (coefficient)	residues
PSB11 _{dist}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.78)	
	S ₁	50.3	0.78	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.65)	
	S ₂	79.3	0.23	(6a) ⁰ (7a) ² (0.15) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.13)	
PSB11 _{dist} -E113	S ₀	0.0 ^c (0.0)	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Glu-113
	S ₁	65.7 ^c (75.7)	0.86	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.54)	
	S ₂	95.2 ^c (74.7)	0.11	(6a) ⁰ (7a) ² (0.23) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.18)	
Rh _{r=2.0Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Glu-113, Ala-295, Lys-296, Thr-297
	S ₁	67.2	0.62	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.47)	
	S ₂	77.4	0.35	(6a) ⁰ (7a) ² (0.19) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.40)	
Rh _{r=2.2Å}	S ₀	0.0	0.0	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Rh _{r=2.0Å} + Trp-265, Tyr-268, Met-207, Phe-212, Gly-121, Gln-122, Phe-293
	S ₁	66.4	0.60	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.49)	
	S ₂	77.6	0.37	(6a) ⁰ (7a) ² (0.20) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.39)	
Rh _{r=2.5Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)	Rh _{r=2.2Å} + Phe-91, Gly-114, Cyx-187, Ile-189, Phe-261, Ala-292, Ser-298
	S ₁	69.0	0.66	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.49)	
	S ₂	77.0	0.31	(6a) ⁰ (7a) ² (0.20) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.39)	
Rh _{r=3.0Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.76)	Rh _{r=2.5Å} + Ala-299, Met-44, Leu-47, Thr-94, Ala-117, Thr-118, Leu-125, Gly-188, Tyr-191, Phe-208, His-211, Phe-294
	S ₁	62.2	0.43	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.57)	
	S ₂	79.6	0.46	(6a) ⁰ (7a) ² (0.18) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.32)	
Rh _{r=3.5Å}	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.76)	Rh _{r=3.0Å} + Wat-358, Tyr-43, Tyr-178, Ser-186, Wat-354
	S ₁	58.7	0.49	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.61)	
	S ₂	80.9	0.48	(6a) ⁰ (7a) ² (0.17) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.27)	
Rh	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)	full protein (all residues)
	S ₁	57.6	0.74	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.63)	
	S ₂	82.0	0.27	(6a) ⁰ (7a) ² (0.11) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.19)	

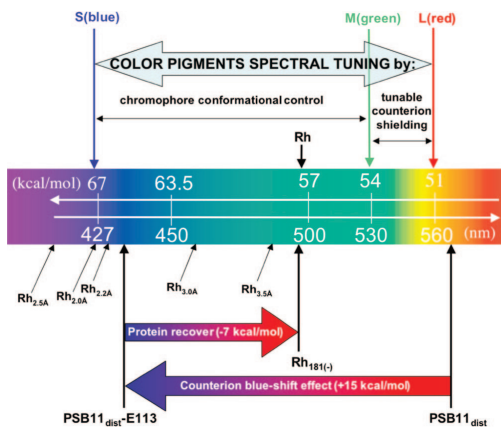
^a The isolated chromophore (PSB11_{dia}), the ion pair (PSB11_{dist}-E113), protein shells of increasing size (i.e. comprising all the residues within a specified radius r around the chromophore: Rh_{r=2.0Å}, Rh_{r=2.2Å}, Rh_{r=2.5Å}, Rh_{r=3.0Å}, Rh_{r=3.5Å}), and the full protein (Rh). The chromophore structure is always the distorted one (PSB11_{dist}) optimized in the protein. ^b 6a and 7a represent the HOMO and LUMO π orbitals, respectively. ^c Multi-State CASPT2 results: S₁ and S₂ are degenerate at the CASPT2 level (values in brackets).

that calculated by Buss and co-workers⁴⁵ that is the computational reference on this topic up to now. Olivucci,³¹ Bravaya,⁴⁶ and Nakatsuji⁴⁷ all predict a larger (>1 eV) value (which matches our CASPT2 value), while (quite surprisingly) DFT/TD-DFT ONIOM-based QM/MM computations on Rh very recently reported by Altun et al.⁴⁸ predict a much smaller blue shift effect (<0.5 eV) for the counterion that goes against all the other reported values.

Interestingly, CASPT2 and MS-CASPT2 energies are quite different in our case. In fact, while degeneration appears at CASPT2 for the ion pair between S₁ and S₂, this is removed after MS-CASPT2 corrections (see Table 2); i.e., a multistate problem emerges raising doubts on the real S₁/S₂ degeneracy and thus on the validity of the CASPT2 results. Indeed, we think that the MS-CASPT2 results are more accurate than the CASPT2 ones in this case. The arguments and the data supporting this statement are reported in detail in the Supporting Information. Here we just state that MS-CASPT2 replicates in

general CASPT2 results for the structures investigated in this work (thus revealing that MS is a reliable approach in this case) but for the S₁/S₂ degenerate case occurring in the ion pair, where MS-CASPT2 returns energies that deviate significantly from the CASPT2 ones. Still, MS results are more reasonable: (i) they better fit literature data from other correlated methods,^{46,47} as well as the results on the ion pair reported by Buss;⁴⁵ (ii) MS-CASPT2 S₁ Abs energy in the ion pair (430 nm) matches nicely the experimental energies for PSB11 in apolar solvent (440–460 nm) where analogous ion-pair systems should exist (on the other hand, standard CASPT2 results give an unrealistic much more blue-shifted value (380 nm, see Table 2) that has no experimental counterpart); (iii) a validation test has been performed at the ion pair by computing CASPT2 energies with an ANO type basis set (that is a better, although more expensive, choice than 6–31G* for (MS)CASPT2 computations), thus allowing a more accurate estimate of the correlation energy: remarkably, standard CASPT2/ANO-based computations return

Scheme 1



energies in agreement with the present MS/6–31G* results. This suggests that MS-CASPT2 should be the choice for the ion pair. Thus, we will consider the MS-CASPT2 values as the reference ones (i.e., the most accurate result) in this case, while standard CASPT2 results will be considered in all the other situations (see Computational Details and Supporting Information for a more in-depth discussion on this topic).

Interestingly, both the CASPT2 (74.7 kcal/mol) and MS-CASPT2 corrected (65.7 kcal/mol) values for S_1 in PSB11_{dist}-E113 (see Table 2) are far higher than the one simulated/observed in Rh (57.6/57.4 kcal/mol). It is apparent that a quenching by the protein of the electrostatic effect due to the counterion is needed to recover the correct absorption energy. The shielding effect that the protein dielectric exercises on E113 must not be full, as we need to recover only ca. 50% (i.e., ca. 7 kcal/mol) of the counterion blue shift; see Scheme 1. Remarkably, Table 2 shows that most of the residues responsible for this effect must be found nearby the retinal chromophore between the 2.5 and 3.5 Å shell, as it is from 2.5 to 3.5 Å that the counterion is mostly quenched and Rh absorption is recovered (see Scheme 1). Thus, these results reveal that only a limited number of actors (14 amino acids overall, see Table 2) are potentially involved in counterion quenching. To highlight the effect of these residues, an RFP analysis (see Computational Details) is performed on each of them and, for completeness, also on the Glu-113 counterion. The blue or red shift in the chromophore S_1 excitation energies with respect to the reference Rh value (that is represented by the zero line) is displayed in Figure 3 for each investigated residue.⁶⁵

Very interestingly, Figure 3 shows that there is not a specific residue that is responsible alone for the 113 quenching, as this appears more as a cooperative effect of a rather limited number of polar residues surrounding the chromophore, namely Ser-186 (2.6), Thr-118 (1.6), Ala-117 (1.3), His-211 (1.0), Tyr-

191 (0.7), and Tyr-43 (0.6) (the shielding effect in kcal/mol is reported in brackets); see Figure 3. These are the only residues (that are comprised between the 2.5 and 3.5 Å shell) that produce a significant backward red shift of the absorption maximum and provide alone almost all the shielding power of the protein. Figure 4 shows the position of these residues around the chromophore and the associated charges (in a colors code: from blue/negative to red/positive), and it provides a rationale for their effects. It is apparent that all the shielding residues display a significant positive (negative) charge close to the N-head (C-tail) of the chromophore that therefore produces a red shift in the absorption by destabilizing the ground state and stabilizing the excited state (the other way round occurs for blue shifting residues); see Scheme 2. Thus, the protein is designed here to produce a net effect that partially shields the primary Glu-113 counterion.

Fairly enough, it must be said that other surrounding polar groups (that are not comprised in the residues analyzed above) affect spectral properties, as they lead to a significant red/blue shift absorption as well. For instance, Glu-181, Glu-122, Tyr-192, Tyr-268, 292, 90, 261, 265, and 269 have been already recognized as important in dictating/affecting spectral tuning and optical properties. Specifically, Glu-181 and Glu-122 are charged/highly polar nearby amino acids; Tyr-192 and 268 are very close to the chromophore²⁹ and intervene in the H-bonded network;⁶⁶ amino acid change at site 292 in the C-terminus (transmembrane VII) causes a variable level of λ_{max} -absorption shift in different visual pigments⁶⁷ (it has been recently found that far distant amino acids are also able to modulate the absorption maximum of rhodopsins too);⁶⁸ sites 90, 261, 265, and 269 correspond to “key residues” for spectral tuning in color vision (i.e., cone pigments).^{69,70} Although some of these residues produce a significant change in the absorption energy (see again Figure 3 for a RFP analysis of these groups), their net electrostatic effect is negligible: it is only for the residues in the 2.5–3.5 Å shell that electrostatic effects add-up in a constructive manner, so that the primary counterion gets shielded. This is the first time such an effect has been recognized, and experimentalists are now encouraged to target these residues in their studies (e.g., by mutation experiments) to prove and quantify their effects. More important, mutations involving residues that are crucial for spectral modulation and shielding efficiency could be responsible for vision pathologies related to Rh malfunctions, which is a further stimulus for experimental efforts in this direction. This issue will be discussed and studied in-depth in section 3.4 below.

In conclusion, we predict for Rh a situation of partial (ca. 50%) quenching of the 113 counterion, that falls between the two extreme scenarios presented by Buss/Morokuma/Nakatsuji^{45,47,48} (no quenching, i.e., Rh absorbs as the ion-pair system) and Olivucci³¹ (complete shielding, i.e., Rh absorbs as the distorted retinal in vacuo). This appears in line with recent QM/MM studies by Bravaya et al.⁴⁶ Interestingly, it is worth noting that we formally used the same approach as used by Buss⁴⁵ and Olivucci³¹ (namely CASSCF(12,12)/CASPT2 energy calculations on the

(65) Notably, both reverse (Figure 3) and direct (Table 2) analyses do roughly agree for the E113 effect, the difference in the two results being due to the different polarization that the QM environment experiences in the two approaches: in the first we do have the full electrostatic environment of the protein but not the residue under investigation, while in the second we have only the electrostatic effects of the investigated residues.

(66) Yan, E. C. Y.; Ganim, Z.; Kazmi, M. A.; Chang, B. S. W.; Sakmar, T. P.; Mathies, R. A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10867.
 (67) Fasick, J. I.; Lee, N.; Oprean, D. D. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11593.
 (68) Yoshitsugu, M.; Shibata, M.; Ikeda, D.; Furutani, Y.; Kandori, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3923.
 (69) Lin, S. W.; Kochendoerfer, G. G.; Carroll, H. S.; Wang, D.; Mathies, R. A.; Sakmar, T. P. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 24583.
 (70) Coto, P. B.; Strambi, A.; Ferre, N.; Olivucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17154.

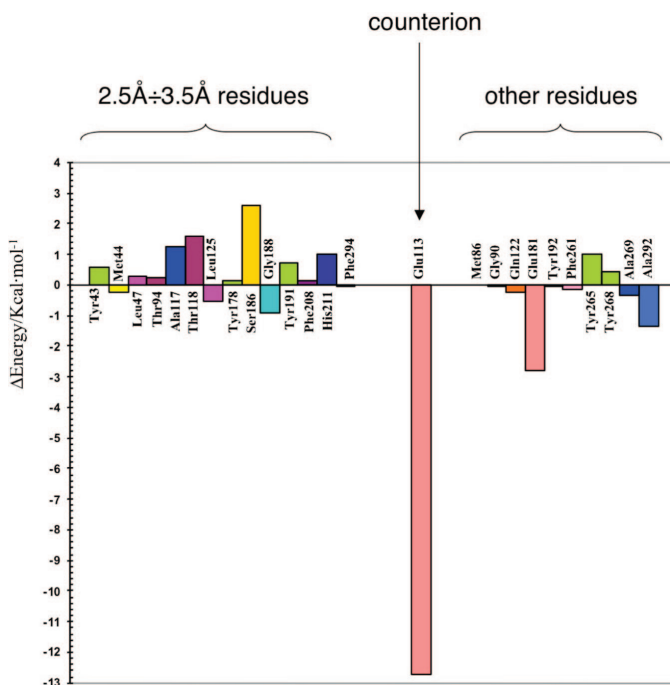


Figure 3. Reverse Fingerprint (RFP) analysis of the 14 rhodopsin residues comprised within a 2.5–3.5 Å radius around the chromophore, the counterion, and other residues recognized relevant for spectral tuning in the visual pigments. All the reported values refer to CASPT2 corrected energies.

chromophore put in the bath of the protein point charges). Anyway, Buss's calculations (leading to a negligible protein red-shift effect) are done on top of a chromophore structure optimized via a DFT-based method, while Olivucci's results and ours (both leading to a high red-shift effect that significantly compensates the counterion) are produced using a CASSCF optimized retinal (this was done to be as consistent and homogeneous as possible with respect to the CASPT2 approach employed for computing correlated energies and electronic transition properties). We are convinced this argument holds the key for the different computational outcomes, as DFT-based methods yield a chromophore structure with underestimated bond length alternation and overemphasized positive charge delocalization that is very different than the CASSCF one. This leads to a different response of the chromophore to the surrounding charges and the protein dielectric in general that may account (at least partially) for the observed discrepancies.

3.2.2. Photoactivity Effects. Tuning the Slope of the Photoisomerization Channel. The counterion dependent destabilization of the S_1 energy that has been recognized at the FC point is foreseen all along the points of the S_1 path. Moreover, we expect this effect not to be identical but to increase steadily along the path as the charge transfer character of the S_1 (B_u -like) state is increasing upon rotation,¹⁵ reaching a maximum at the twisted funnel point where a net charge transfer occurs (see bar diagrams in Figure 2): this is the point where external electrostatic effects on the S_1 energy are expected to be the highest. Thus, it is apparent that the electrostatic effects can also play a role in the photoisomerization process, as the slope of the channel and the location/existence of the twisted conical

intersection funnel and crossing seam can change. To quantify these effects the energy of the MEP computed in Rh has been reevaluated in two different electrostatic conditions, i.e., into a protein environment where all external charges have been switched off ($Rh_{\text{no-charges}}$) and where only the counterion charge has been explicitly considered (Rh_{113}). So doing, all protein steric constraints have been preserved, although electrostatic effects have been zeroed ($Rh_{\text{no-charges}}$) or limited only to Glu-113 (Rh_{113}), respectively. Thus, while the former reproduces the scenario for a fully quenched counterion, the latter displays the limiting situation of a fully unquenched counterion.

Figure 5 summarizes these results by comparing the path and key points calculated for $Rh_{\text{no-charges}}$ (see Figure 5a), Rh (see Figure 5b), and Rh_{113} (see Figure 5c), while Table 3 reports the corresponding energies. The shielding effect that the protein dielectric exercises on the counterion (that results into a red shift in the S_1 energy with respect to the ion pair) weights ca. 7 kcal/mol at the FC point that, as shown in the previous section, is ca. 50% of the overall counterion blue-shift effect at FC (that ranges from 14.4 to 15.4 kcal/mol depending on the calculation level adopted; see Scheme 1 and Figure 5c). On the other hand, the overall counterion blue-shift effect is estimated to be ca. 34 kcal/mol at the twisted structure (see Table 3 and Figure 5c). Notably, this is roughly twice the value calculated at the FC point as we have a net (half) charge transfer at the CI (FC). As anticipated above, this is the trend expected for S_1 : counterion destabilization on S_1 energies increases upon increasing the charge transfer character of S_1 , i.e., upon rotation. Calculations show (see Table 3 and Figure 5b and 5c) that counterion shielding in Rh recovers ca. 23 kcal/mol at the CI_{Rh} .

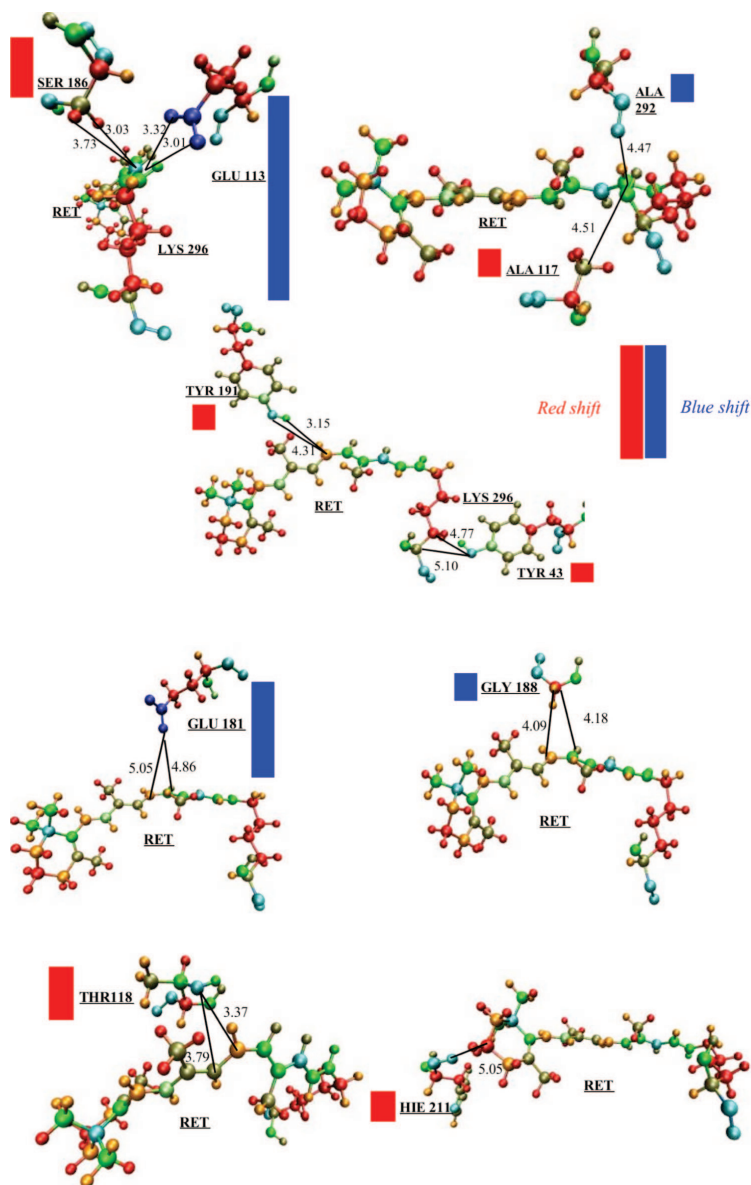
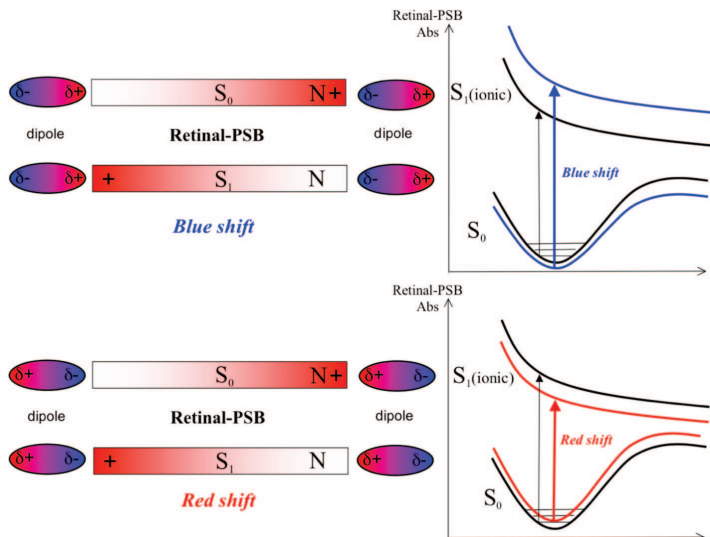


Figure 4. Displacement around the chromophore of the residues mostly relevant for counterion shielding and corresponding charges analysis. The color spectrum from blue to red displays negative to positive partial charges on the atoms, respectively. Bar blue/red diagrams display the blue/red shift effect for each residue as shown also in Figure 3.

Another consequence of these effects is that the slope of the photoisomerization channel becomes dramatically decreased in Rh_{113} (as it increases the destabilization of the counterion along the path; see Figure 5c). Eventually, a barrier emerges along the path and an excited-state intermediate appears (M^{00n}_{113}) preventing an efficient twisting. More interesting, the CI funnel disappears and a twisted point (TP_{113}) with a large S_1/S_0 energy

gap separation (ca. 21 kcal/mol; see Figure 5c) replaces it. Thus, it is apparent that the crossing seam has been removed (or displaced to much higher energies that are not of (photo)chemical relevance). To further investigate this issue and unambiguously define this mechanistic picture, we have fully optimized (into the protein and in the field of the counterion charges alone, i.e., Rh_{113}) both the excited-state intermediate (M^{00n}_{113}) and the

Scheme 2. Blue/Red Shift Effect on the Absorption of the Chromophore Due to the Nearby Dipoles of the Residues^a

^a Positive/negative charges are displayed in red/blue, while the linear polyenic chain of the chromophore is represented as a horizontal bar.

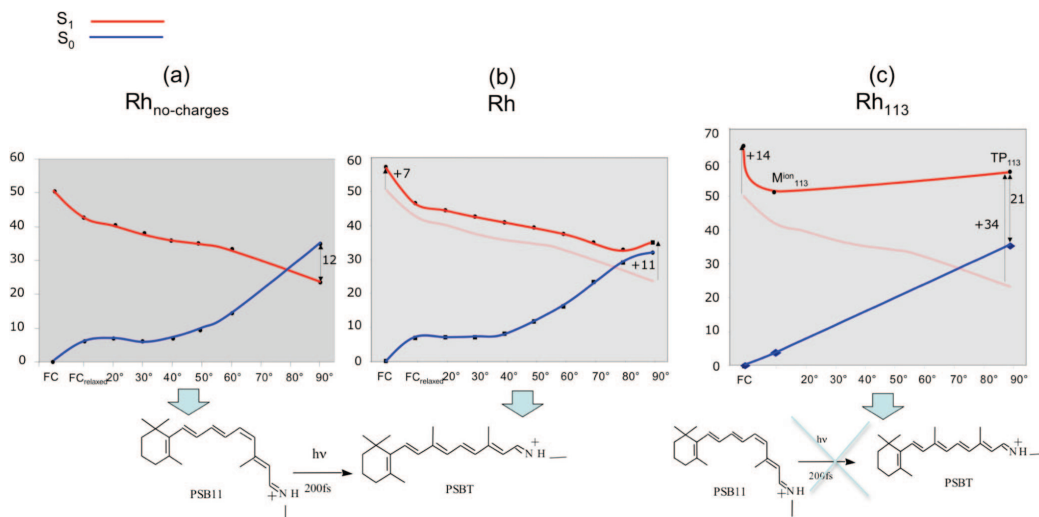


Figure 5. The S_1 and S_0 energy profiles (kcal/mol) along the S_1 photoisomerization MEP computed in Rh (b) have been reevaluated in the protein without charges (a) or only with the counterion charge (c). The profile displayed in (a) is also reported as a shaded line in (b) and (c). CASPT2 energies are reported in (a) and (b), while MS-CASPT2 values are reported in (c).

twisted structure of the chromophore (TP₁₁₃). These results (that are shown in the Supporting Information) confirm the mechanistic picture shown in Figure 5c. It is apparent that the 21 kcal/mol S_1/S_0 energy gap found at TP₁₁₃ prevents any efficient (and ultrafast) internal conversion process in Rh₁₁₃. Interestingly, this energy gap is the *minimum* energy that the protein dielectric must recover (by shielding the counterion) to generate a conical intersection funnel and trigger an efficient (i.e., ultrafast) photoisomerization process. Although this quenching does not

appear full, it is significant and is estimated to be ca. 60% (i.e., 21 kcal/mol) of the overall counterion blue-shift effect at the twisted structure (i.e., 34 kcal/mol): *this is the least shielding that we need to have photoactive visual pigments*. Remarkably, this is almost identical to the shielding that is estimated in Rh at the twisted point (23 kcal/mol) and that is needed to recover S_1/S_0 degeneration and generate a twisted conical intersection.

It can be concluded that *the quenching of the counterion by the protein (by at least a 60% shielding factor in the twisted*

Table 3. CASPT2 Relative Energies (ΔE , kcal/mol) for the Lowest Three Singlet States, Oscillator Strengths for Ground State Excitations ($f_{S_0-S_1}$) and Wavefunction Characterization at the Franck–Condon (FC) and Twisted Structures of the Rhodopsin Photoisomerization Path Computed in the Protein with Three Different Electrostatic Environments: No Charges (Rh_{no-charges}), All Charges (Rh), Only the Counterion Charge (Rh₁₁₃)

environment	structure	chromophore state (electronic nature)	ΔE	$f_{S_0-S_1}$	wave function ^a
Rh _{no-charges}	FC point	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.78)
		S ₁	50.3	0.78	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.65)
		S ₂	79.3	0.23	(6a) ⁰ (7a) ² (0.15)
	twisted structure (twisted PSB11 found in CI _{Rh})	S ₀	23.1	0.00	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.13)
		S ₁	35.1	0.003562	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.74)
		S ₂	86.9	0.000623	(6a) ¹ (8a) ¹ (0.30) (5a) ¹ (6a) ¹ (8a) ² (0.74)
Rh	FC point	S ₀	0.0	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.77)
		S ₁	57.6	0.74	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.63)
		S ₂	82.0	0.27	(6a) ⁰ (7a) ² (0.11)
	twisted structure (CI _{Rh})	S ₀	32.5	0.00	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.19)
		S ₁	34.5	0.00001316	(6a) ² (7a) ⁰ (0.82)
		S ₂	84.8	0.00000875	(6a) ¹ (8a) ¹ (0.31) (5a) ¹ (6a) ¹ (0.34)
Rh ₁₁₃	FC point	S ₀	0.0 ^b (0.0)	0.0	(6a) ² (7a) ⁰ (0.75)
		S ₁	65.7 ^b (75.7)	0.13566	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.54)
		S ₂	95.2 ^b (74.7)	0.74604	(6a) ⁰ (7a) ² (0.23)
	twisted structure (TP ₁₁₃)	S ₀	35.7 ^b (32.6)	0.000127	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.18) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.70)
		S ₁	59.8 ^b (57.1)	0.000578	(6a) ² (7a) ⁰ (0.79)
		S ₂	88.3 ^b (84.7)	0.03199	(5a) ¹ (6a) ¹ (7a) ² (0.33) (6a) ¹ (8a) ¹ (0.12)
	M ^{ion} ₁₁₃	S ₀	4.3 ^b	0.00	(6a) ² (7a) ⁰ (0.64)
		S ₁	51.2 ^b	0.7182	(6a) ¹ (7a) ¹ (0.53)
		S ₂	78.4 ^b	0.006818	(6a) ⁰ (7a) ² (0.21) (6a) ¹ (7a) ¹ (0.14)

^a 6a and 7a represent the delocalized HOMO and LUMO π molecular orbitals at the FC point, respectively. At the twisted structure π orbitals localize on each semifragment, with 6a that is localized on the N containing half and 7a that is localized on the β -ionone containing half. Consequently, at the twisted structure the closed shell (6a)² (7a)⁰ configuration describes the charge transfer state (that is diabatically connected to S₁/(6a)¹ (7a)¹ in the FC point), while the open shell (6a)¹ (7a)¹ configuration describes a diradical state (that is diabatically connected to S₀/(6a)² (7a)⁰ in the FC point).

^b Multistate CASPT2 results: corresponding CASPT2 values are in brackets, when reported.

structure) is a prerequisite to have an efficient and ultrafast photoisomerization in visual pigments: it recovers a barrierless path and a twisted CI funnel. Thus, besides providing a tool for spectral tuning that regulates absorption energies, counterion quenching is also mechanistically fundamental since it promotes photoisomerization catalysis that would be otherwise depressed if the counterion were unshielded.

Interestingly, a consequence of the above reasoning is that if we produced a mutated Rh with an altered (i.e., smaller) counterion shielding power, the photoreactivity of the pigment would be impaired and fluorescence (e.g., from the M^{ion}₁₁₃ intermediate) may become a competitive process. Experimental investigations in this direction (by site directed mutations of those residues recognized here as responsible of the shielding efficiency such as Ser-186, Thr-118, Ala-117, Hie-211, Tyr-191, Tyr-43, Tyr-265) would be welcome as this would provide the way to switch from a photoisomerizable to a fluorescent device.

3.3. Spectral Tuning Mechanism in Color Vision. Several factors have been recognized (alone or concurrently) as possible candidates for color tuning in visual pigments: retinal twist, protein electrostatic field, interaction with the counterion (i.e., H-bonding and charge transfer), and protein polarization (different number of aromatic residues near the chromophore).

Notably, the 435 to 570 nm range of S₁ excitation wavelengths spanned by the vacuo(PSB11_{dist})/ion-pair(PSB11_{dist}–113E) systems covers the appropriate range for the color pigments S (425nm), M (530 nm), and L (560 nm); see Scheme 1. This suggests the working hypothesis that such a spectral modulation could be achieved in principle by tuning the shielding effect of the 113 counterion from a fully quenched (vacuo-like) system (that reproduces the red absorption of the L-cone pigment) to the unquenched ion pair (that absorbs in the blue as the S-cone pigment), through an intermediate state absorbing in the green (M-cone pigment) where the counterion is only partially quenched. As a result, a tunable shielding of the counterion could appear as a suitable tool for regulating color absorptions. In light of the mechanistic results presented above, it is apparent that the absorption of the blue (S-cone) pigment cannot be achieved by a fully unquenched 113 residue: this would produce the correct blue absorption found in the ion pair, but it would lead to an inefficient photoreaction. In fact, we have proved that the counterion must be significantly shielded to have a photoactive pigment: at least a 60% shielding factor must be operative at the twisted structure. This means that also other mechanisms must cooperate to recover the ca. 10 kcal/mol needed to reach the high absorption energy of the blue pigment (from 57 kcal/mol in Rh to 67 kcal/mol in S), as the counterion

shielding cannot be further reduced. We have suggested in previous works⁷¹ that the β -ionone handle may be also used as a regulatory tool for absorption energies. In fact, a fully twisted β -ionone ring should produce a blue-shifted retinal absorption, as the chromophore conjugation has been reduced. Interestingly, recent experimental investigations on a Rh with an acyclic retinal analogue (i.e., lacking the β -ionone ring) show that this absorbs at 460 nm,⁷² corresponding to a ca. 5 kcal/mol blue shift of the Rh wild-type absorption. This is also the shift that is expected in a chromophore with a fully deconjugated β -ionone ring. Anyway, this is only half the energy that we need to recover S-pigment absorption. Thus, it is apparent that this effect alone is not sufficient and that a further deconjugation of the chromophore (triggered by steric interactions with the protein pocket) is necessary. That is achieved for example by twisting about one (or more) of its internal double bonds (such as the C₈–C₉ single bond), thus leading to a higher energy absorbing chromophore. Remarkably, recent experimental works on a Rh-containing retinal analogue with only four conjugated double bonds (i.e., a 7,8-dihydro retinal has been used)⁷³ show that this chromophore already absorbs at blue energies (435 nm), as found in the S-cone pigment and, more importantly, preserves the photoisomerization ability and the photoactivity of the blue-cone analogue so far obtained. Thus, if the protein binding pocket of this pigment is designed to force the retinal chromophore into a conformation with a highly distorted structure (e.g., fully twisted about the C₈–C₉ single bond), a blue absorption should be already observed without the need for other effects. On the other hand, a complete (partial) shielding of the counterion by the protein dielectric appears as the most viable way to produce alone the lower energy absorbing L (M) pigment: this would preserve the photoactivity of the pigment itself as counterion shielding would be higher than 60%. Scheme 1 summarizes these results.

Interestingly, this reasoning agrees with the similarity in the structure of the L and M opsins (they share over 96% amino acid sequence identity and their higher homology correlates with the smaller absorption shift and has evolutionary reasons) and the different structure observed in the S pigment (only 43% identity with L and M),^{74,75} as here the binding pocket must be differently designed so that a highly twisted chromophore is hosted (which causes the very different sequence identity). Additionally, this spectral tuning mechanism validates the tentative structures for the L, M, and S pigments that have been very recently generated using homology modeling techniques:⁷⁶ while the chromophore structure appears very similar in both the L and M pigments, its conformational twisting plays a major role in the S-pigment, as retinal appears much more distorted in this environment, interestingly due to one exchange amino acid relative to L/M. On the other hand, dipolar side chains are shown to play a large role in the opsin shift from red to green.

A detailed analysis of the color tuning mechanism has been also reported very recently by Fujimoto et al.⁷⁷

Finally, it must be pointed out that the above reasoning is far from being conclusive and experimentally proven, as a univocally accepted mechanism is not yet available for cone pigment spectral tuning and contradictory results (both experimental and computational) exist: the last words on this issue will not probably be written until resolved structures for the color-cone pigments (and the blue-cone in particular) become available. Experimental evidence exists that has been used to support a contrasting, pure electrostatically driven, spectral tuning mechanism. Reference 20 shows that nine concurrent point mutations exist that turn Rhodopsin into a blue-cone analogue mutant chimera. Those mutations seem to produce an electrostatic effect only, as retinal does not appear to be locally perturbed and its structure seems preserved according to resonance Raman vibrational spectra. It is also true that the blue-cone analogue photoactivity is disrupted; i.e., it is not able to activate transducin anymore. Why this occurs is not yet clear: isomerization seems to occur, but no clear statement on this point can be made based on the available spectroscopic evidence, and in any case no data are available for both the photoisomerization QY and its rate that can be both highly affected by those mutations (the only clear thing is that formation of meta-II species is prevented). Thus, all these issues are still largely elusive. On the other hand, recorded vibrational features (HOOP modes) that are unchanged in the different cone pigments are taken as a clue for a similar and unchanged chromophore structure. Although vibrational signatures are of great help in elucidating the structures of the targeted molecule, also great care and caution must be used in interpreting these results, as these features may turn out to be quite elusive in revealing the exact conformation of the chromophore, in particular when the structural difference is located about a C–C single bond that is quite far from the vibration center (e.g., twisting about the C₈–C₉ single bond, as suggested here, vs the C₁₁H–C₁₂H HOOP). A clear example of that is provided by the still debated structure of the phytochrome chromophore: a *ZZZssa* structure is assumed on the basis of vibrational spectroscopic arguments, but this is still widely under discussion, as good spectroscopic arguments for this and the other conformation of the C₄–C₅ bond (*ZZZssa*) have been presented. This situation resembles the one discussed in the paper for the protonation state of the 181 residue: while spectroscopic data for E181 point mutations have been previously used to define its neutral state,^{37,38} it has been recently pointed out³⁹ (and this has been deeply discussed in this paper: see section 3.1) that absorbance measurements on those Rh mutants are not suitable to assess whether E181 is ionized in the dark, as this residue is placed right above the central C₁₁=C₁₂ double bond of retinal (i.e., in a symmetric position with respect to the PSB head and the β -ionone tail of the chromophore), which makes S₁ rather insensitive to its protonation state. This example tells us how previously solid conclusions based on experimental evidence have been reconsidered in light of new understandings.

In conclusion, we think that a final statement cannot yet be drawn, as some works point to a pure electrostatic tuning while others to a different (e.g., retinal twist) contributor, as in our paper. A blend of them may be likely involved, although our results clearly reveal that a pure (unquenched) counterion effect

- (71) Cembran, A.; González-Luque, R.; Altoè, P.; Merchán, M.; Bernardi, F.; Olivucci, M.; Garavelli, M. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6597.
(72) Bartl, F. J.; Fritze, O.; Ritter, E.; Herrmann, R.; Kuksa, V.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P.; Ernst, O. P. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34259.
(73) DeGrip, W. J.; Bovee-Geurts, P. H. M.; van der Hoef, I.; Lugtenburg, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13265.
(74) Nathans, J.; Thomas, D.; Hogness, D. S. *Science* **1986**, *232*, 193.
(75) Neitz, M.; Neitz, J. *Color Vision Defects. Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd: 2005.
(76) Trabianino, R. J.; Vaidehi, N.; Goddard, W. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17230.

- (77) Fujimoto, K.; Hasegawa, J.; Nakatsuji, H. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *462*, 318.

would impair the retinal photoisomerization efficiency and, ultimately, the pigment photoactivity. Under this point of view, we think that cooperation of a conformational effect must be operative.

3.4. Mutations and Vision Deficiencies. 3.4.1. Rh Related Vision Deficiencies. It has been shown above that several Rh residues appear as major players in spectral modulation (by a regulatory mechanism of the shielding effect) and their effect has been quantified in Table 2 and Figure 3. It is likely that natural mutations involving those groups may compromise more than others the optical properties and photoactivity of the photoreceptor and may be the source of vision pathologies related to Rh malfunctions. More specifically, we suggest here that *many of the mutations impairing the photoactivity of Rh do that by reducing its counterion shielding efficiency*: indeed we have seen that at least a 60% shielding power must be operative at the twisted structure to preserve the photoefficiency of the pigment. If it is reduced below that threshold, an inefficient photoisomerization that impairs Rh photoactivity should result.

Over one hundred mutations have been recognized until now to cause retinitis pigmentosa 4 (in the genetic classification of retinitis pigmentosa, the form that is due to mutations in the rhodopsin gene is referred to as retinitis pigmentosa 4).^{78,79} If we exclude those mutations that inactivate Rh by disrupting its structure and stability (or that of its photocycle intermediates) or its ability to bind G-protein, it is conceivable that the remaining ones harm Rh because they prejudice its counterion shielding power (i.e., counterion shielding gets below the 60% threshold value). Thus, as long as we deal with electrostatic effects only, we could suggest that counterion-shielding groups are the best candidates for a replacement that impairs the photoactivity efficiency of the pigment and thus render the protein inactive; additionally, this inactivating effect is expected to be as big as the deshielding power of the replacing group, thus amplifying the effect of the missense (i.e., single point) mutation. Although, as said above, effects other than the electrostatic one may likely participate to inactivate the pigment (e.g., structural effects), it is interesting to note that, of the many mutations recognized to cause retinitis pigmentosa 4, some involve the counterion-shielding groups investigated here such as, among others, Ser-186 and His-211 that are the ones with the highest shielding power (see Figure 3).

It must be pointed out that the suggestion we are putting forward is far from being conclusive and experimentally proven and is based on the assumption that our computational model is quantitatively correct. A systematic computational analysis of those genetic changes is out of the scope of this work and would be welcome, as well as new experimental investigations. Yet, the collected data on Rh make this hypothesis computationally sound. To the best of our knowledge, this is a new paradigm in Rh-related vision pathologies that experimentalists are now encouraged to investigate and address (e.g., by novel mutation experiments). If positive, these experimental proofs would provide a validation of the above model as well as open a new scenario in the rationale of eye diseases.

3.4.2. Color Pigments Related Pathologies. It is worth noting that mutations related to color blindness in humans are known

to be mostly located in the red (L) and green (M) cone pigments, while the blue (S) pigment is much less affected.⁷⁵ We suggest this is also a clue for a different color tuning mechanism in the former pigments with respect to the latter, which is based on a tunable counterion quenching and chromophore conformational control, respectively (as shown in section 3.3 and Scheme 1 above). The first is by definition very sensitive to changes in the electrostatic environment (such as the ones due to mutations) that could alter the optical response of the pigment and can involve potentially all the surrounding polar residues that are found to be important in spectral tuning. We have seen here (see Figure 3) that many residues may play such a role in Rh and all appear as good candidates for mutations leading to color vision deficiencies: less than 3 kcal/mol separates the absorption energy of the L and M pigments, and most of these residues produce spectral modulations falling in the 1–3 kcal/mol range. On the other hand, a much larger energy gap (ca. 13 kcal/mol) separates the green (M) from the blue (S) pigment absorptions, and once the retinal is accommodated into the protein pocket, it is much harder for a missense mutation to alter its optical properties and photoactivity efficiency so strongly, as these are mostly regulated by the steric dependent conformational twisting of the chromophore. It is worth stressing here that this reasoning focuses on those residues and mutations that are involved in spectral tuning only, while it neglects all those genetic changes that inactivate the photopigment by disrupting its structure or stability (which may be another source of vision deficiency).

4. Conclusions

We have provided computational evidence that electrostatic effects do strongly control both spectral and photoreactivity properties in visual pigments and that the two concepts are strictly related to each other: a unified model has been produced that discloses the key role played by counterion quenching in assisting retinal photoisomerization and setting up its optical features. Based on that, a sound mechanism for spectral tuning in color vision pigments emerges. Although this appears in disagreement with previously reported interpretations and is yet far from being conclusive, we show that it is also validated by recent experimental and molecular dynamics investigations and provides a rationale for the different structures found in the M/L pigments as compared to the S one. These results suggest a new paradigm in vision deficiencies related to Rh mutations, as night blindness may also result by an impaired counterion shielding efficiency in the mutated pigment. It is also shown that the ease in M/L malfunctions with respect to the ones found in S can be easily accounted for by considering the different mechanism for color modulation found in those pigments.

In conclusion, these results contribute to the understanding of the factors controlling spectral modulation and photoisomerization catalysis in rhodopsins and suggest that vision pathologies may be also produced by mutations that harm the counterion shielding power of the visual pigment. To the best of our knowledge, this is a novel concept in vision deficiencies that experimentalists are now encouraged to investigate and address. Finally, it has been pointed out that an intriguing consequence of the presented results is that it would be possible in principle to design modified (i.e., mutated) rhodopsins with a smaller counterion shielding power that can become fluorescent. That is, playing with the protein electrostatic field would be the way

(78) McKusick, V. A. et al. RHODOPSIN; RHO. In *OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man*; Johns Hopkins University: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/disponim.cgi?d=180380>.

(79) Okada, T.; Ernst, O. P.; Palczewski, K.; Hofmann, K. P. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 318.

to switch from photoisomerizable devices to fluorescent dyes, and the rationale for such a molecular design has been provided here.

Acknowledgment. The research reported has been supported by funds for Selected Research Topics, MURST PRIN 2005 (project: "Trasferimenti di energia e di carica a livello molecolare"), FIRB (RBAU01L2HT) and Spanish MEC-FEDER CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience projects. GOG gratefully acknowledge Ph.D. fellowships from the Spanish MEC. E4 Computer Engineering Spa is gratefully acknowledged for granted computational time and technical assistance.

Supporting Information Available: Details of the QM/MM scheme adopted in this work (section S1 and Figure S1), validation of MS-CASPT2 results (section S2, Tables S1–S7 and Figure S2), complete refs 51 and 55 (section S3), energies and coordinates of all the structures discussed in the paper (section S4). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA808424B

**"Singlet Oxygen Generation in PUVA Therapy Studied using
Electronic Structure Calculations".**

J. J. Serrano-Pérez, G. Olaso-González, M. Merchán, and L.
Serrano-Andrés,
Chemical Physics, 360, 85-96 (2009)



Singlet oxygen generation in PUVA therapy studied using electronic structure calculations

Juan José Serrano-Pérez, Gloria Olaso-González, Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés *

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2009

Accepted 22 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Phototherapy

Furocoumarins

Energy transfer

Singlet oxygen generation

PDT

ABSTRACT

The ability of furocoumarins to participate in the PUVA (Psoralen + UV-A) therapy against skin disorders and some types of cancer, is analyzed on quantum chemical grounds. The efficiency of the process relies on its capability to populate its lowest triplet excited state, and then either form adducts with thymine which interfere DNA replication or transfer its energy, generating singlet molecular oxygen damaging the cell membrane in photoactivated tissues. By determining the spin-orbit couplings, shown to be the key property, in the intersystem crossing yielding the triplet state of the furocoumarin, the electronic couplings in the triplet-triplet energy transfer process producing the singlet oxygen, and the reaction rates and lifetimes, the efficiency in the phototherapeutic action of the furocoumarin family is predicted as: khellin < 5-methoxypsoralen (5-MOP) < 8-methoxypsoralen (8-MOP) < psoralen < 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP) < 3-carbethoxypsoralen (3-CPS), the latter being the most efficient photosensitizer and singlet oxygen generator.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photomedicine applies the principles of photobiology, photochemistry, and photophysics to the diagnosis and therapy of diseases. One of the most active research areas in this field is photodynamic therapy (PDT), in which the affected living tissue is treated with a combination of a photosensitizer, activated by UV light, and molecular oxygen [1–3]. Utility of light in the medical field as a therapeutic tool traces its origin back to several thousands years, but the development of Phototherapy did not reach its heyday until the 20th century [4–6]. In particular for PDT, it was in 1976 that Weishaupt et al. [7] made a breakthrough postulating that singlet oxygen is the cytotoxic agent responsible for the photoinactivation of tumor cells. In PDT, unlike in radiation therapy, DNA is not the major target because photosensitizers tend to localize at the cell membranes. Future advances in the application of PDT rely on understanding the nature of the interaction of light, photosensitizer, and tissue [8–11].

Among the several groups of molecules with photosensitizing ability for PDT [4], we will focus the present research on furocoumarins (psoralens), a family of heterocyclic compounds protagonists of the PUVA (Psoralen + UV-A) therapy [12–15]. This technique, which is nowadays providing successful treatments against many diseases such as skin disorders (psoriasis, vitiligo) as well as some forms of cancer, is known to have a two-fold type

of therapeutic mechanism. Furocoumarins are known to exert their photosensitizing ability by reacting with thymine and forming adducts, interfering DNA replication in the affected cell [16]. Additionally, these compounds also interact with molecular oxygen in its triplet ground state ($^3\text{O}_2$) to produce singlet excited state ($^1\text{O}_2$) oxygen, a extremely reactive and cytotoxic species [17–23], together with the simultaneous generation of other radicals such as O_2^- or HO_2 [17]. These systems induce photooxidation of lipids and are considered responsible for cell membrane damaging effects, causing also the appearance of erythema and pigmentation activity in the human skin [18]. The relative contribution of one (adduct formation) or other (singlet oxygen generation) process to the effectiveness of the PUVA therapy is still unclear. It has been observed that molecular oxygen quenches the photochemical reaction between psoralens and thymine [20,24], whereas there are evidences indicating that the binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to double stranded poly-(dA-dT) inhibits the furocoumarin ability to sensitize via singlet oxygen generation [20]. In some cases, however, furocoumarins are described to produce $^1\text{O}_2$ even when complexed with or covalently bound to DNA [25]. In principle both mechanisms can be expected to be competitive, not synergic, although higher values of singlet oxygen production have been reported for complexed furocoumarins than for the free compounds for psoralen, 8-MOP, and 5-methoxypsoralen (5-MOP) [26,27].

The yield of formation and activity of singlet oxygen from the different furocoumarins has been estimated by several research groups, but no agreement has been reached due to the problems

* Corresponding author. Tel.: +34 963544427; fax: +34 963543274.
E-mail address: Luis.Serrano@uv.es (L. Serrano-Andrés).

in evaluating the generation of the species in different conditions and the simultaneous production of other oxygen radicals [17]. In the family of the most common furocoumarins (see Fig. 1) psoralen and, mainly, 3-carbethoxypsoralen (3-CPS) are typically considered the most effective producers of $^1\text{O}_2$ in aqueous solution [17,18,20,28,29]. The situation is less clear for khellin, 8-MOP, 5-MOP, and 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP) [17,18,26–31]. Previously, by using *ab initio* quantum chemical electronic structure methods, we studied the ability of furocoumarins to populate their lowest-lying triplet state and its behavior as efficient photosensitizers [32–35], as well as the mechanisms of formation of psoralen-thymine adducts [16]. In the present contribution we aim to analyze the mechanisms to generate reactive singlet oxygen by furocoumarins and, from this point of view, to estimate the best photosensitizer for photodynamic therapy.

The interaction of molecular oxygen and organic molecules is believed to be produced through the so-called excitation energy transfer (ET) mechanism between the furocoumarin in its lowest triplet long-lifetime excited state, behaving as a photosensitizer, and the molecular oxygen, initially in its triplet ground state, $^3\Sigma_g^-$. Oxygen is present in the cellular environment ready to transform into singlet oxygen $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), which is a strong electrophilic species that reacts with different compounds [36], including some components of the cellular membrane causing cell death by apoptosis [37]. The ET process is triggered by electronic coupling be-

tween a molecule in an excited state, the donor (D^*), and a molecule, the acceptor (A) or quencher within a collision complex [38–46], a mechanism that strongly depends on the interfragment distance. At large separation between the moieties (20–30 Å or even larger) the electronic coupling arises from the Coulomb interaction between electronic transitions that, under the dipole approximation, reduces to the known Förster's dipole–dipole coupling [47]. The process is actually a non-radiative transfer of excitation occurring whenever the emission spectrum of D overlaps with the absorption spectrum of A (although no intermediate photon takes part on it). It is the electric field around D^* , behaving like a field generated by a classical oscillating dipole, that causes the excitation of A [48–52]. At larger separations than Förster's, fluorescence resonance ET (with photon emission by D^* and subsequent absorption by A) becomes more efficient than excitation ET [53]. At shorter interfragment distances, however, the so-called Dexter exchange predominates, arising from the exchange integrals that account for the indistinguishability of the electrons in many-electron wave functions. This factor decreases steeply with separation [54]. If the interaction is assumed weak and overlap between D^* and A wave functions is produced, Fermi's Golden Rule for coupled transitions can be applied. Such processes have been studied theoretically in depth in recent years, in particular for singlet–singlet ET processes [55–59], which implies an exchange of electrons of the same spin but different energies, that is,

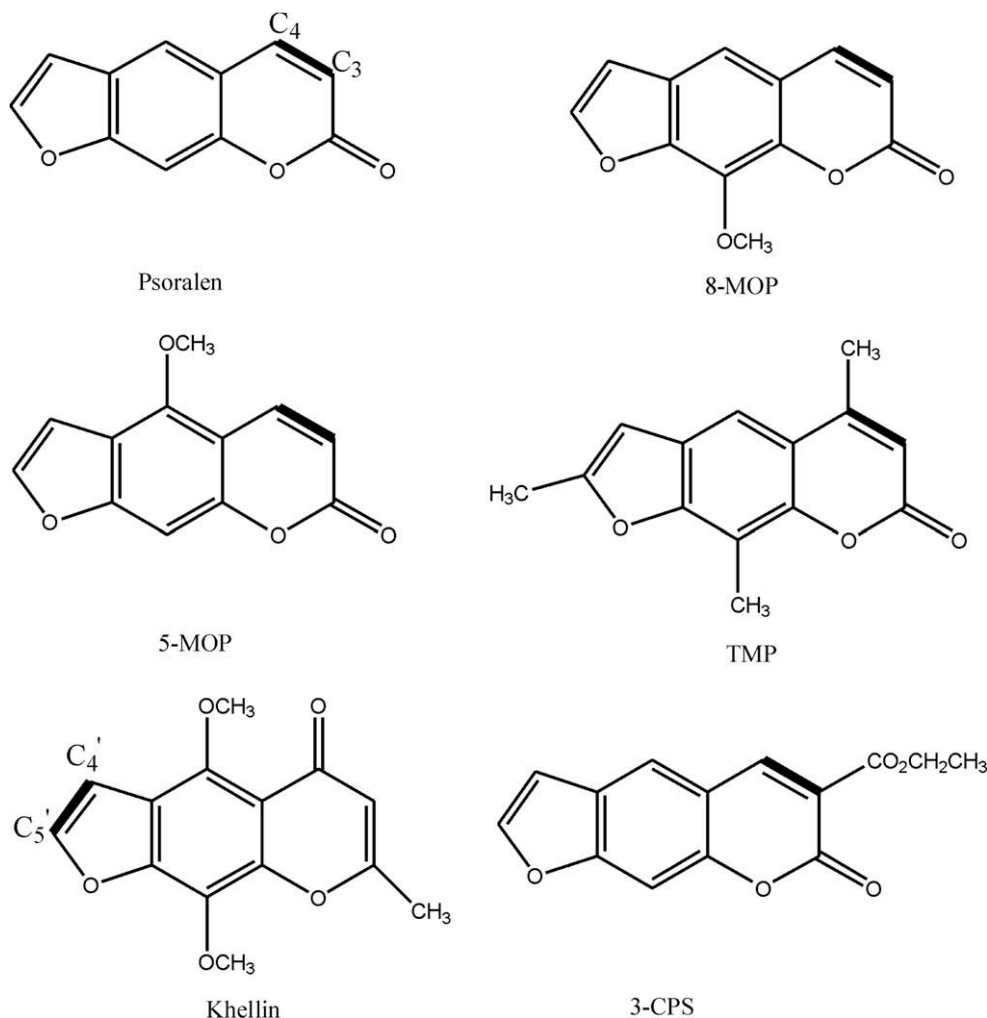


Fig. 1. Studied furocoumarins: psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP), 5-methoxypsoralen (5-MOP), 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP), khellin, and 3-carbethoxypsoralen (3-CPS). The most reactive double bond in the triplet state of the furocoumarin is highlighted in bold.

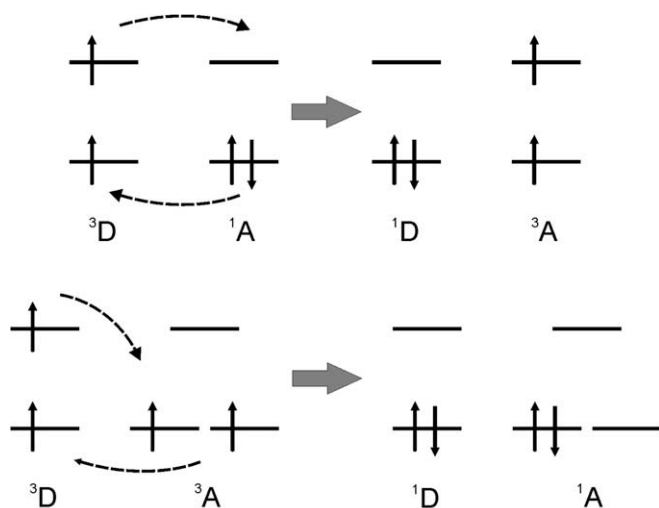


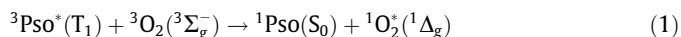
Fig. 2. Examples of TET, which can be understood as two simultaneous electron transfers between the donor (D) and the acceptor (A) with exchange of spin and energy in each fragment.

the spin state of each fragment is conserved. In PDT the actual mechanism is, on the other hand, an intermolecular triplet–triplet energy transfer (TET), that is, a process of exchanging both spin and energy between a pair or molecules or molecular fragments. This type of reactions are commonly used to efficiently populate the triplet states of many organic molecules [60–62].

TET processes can be therefore understood as two simultaneous ETs with spin exchange between the interacting fragments (see Fig. 2) [63] and it is similar to the Dexter coupling for singlet–singlet ET, in particular because, as it depends on an electron exchange mechanism, it only takes place at short donor–acceptor distances ($<10 \text{ \AA}$) [47,53]. In TET the Förster's mechanism will not contribute, because at short distances the dipole approximation breaks down and because the transitions are dipole forbidden [63]. The electronic coupling is not the only key factor that determines the efficiency of the ET process, but also the resonance condition, that is, the energy available in the donor must be at least equal or higher than that required to populate the excited state of the acceptor. If this is the case, the process is usually controlled by diffusion and described as exothermic. In the opposite situation, that is, if the energy of the acceptor is lower than that of the donor, the process becomes thermally activated and lies in the endothermic

mic region. That means that there is an energy barrier whose height will depend on the nature of the acceptor, either classical (for rigid systems) or non-classical (flexible systems which might find conformations for efficient, non-vertical TET), with a corresponding larger or smaller, respectively, decay in the process rate [64].

In particular, the TET process taking place between psoralen and molecular oxygen is:



where activated psoralen behaves as a donor in its lowest triplet state, and triplet ground state oxygen is the acceptor. The lowest excited singlet state of molecular oxygen (${}^1\Delta_g$) is located at 0.97 eV [2,65–67]. Furocoumarins (psoralen, 8-MOP, 5-MOP, khellin, TMP, and 3-CPS) have their lowest-lying triplet T_1 state energy at least 1.4 eV higher than the oxygen singlet state, what makes the TET exothermic and diffusion-controlled, with molecular oxygen behaving as a rigid, classical acceptor [64]. Fig. 3 displays a scheme of the TET process for singlet oxygen generation from a triplet photosensitized psoralen molecule.

As mentioned above, our aim is to analyze the different factors taking part in the TET mechanism between furocoumarins and molecular oxygen in order to estimate the extent of singlet oxygen generation in PUVA therapy. Two basic aspects must be taken into account. Firstly, the rates for triplet energy transfer donor–acceptor will be estimated through the magnitudes of the corresponding electronic couplings by computing the potential energy curves of the system $M\text{-O}_2$ with respect to the interfragments distance (M is the furocoumarin molecule). Calculations on model systems will be performed to determine the adequacy of the procedure and the employed geometrical arrangements. Secondly, and as the efficiency of the reaction also relies on the ability of the photosensitizer to reach its lowest triplet excited state, the triplet population rate can be roughly estimated by using the spin–orbit coupling factor for the related intersystem crossing process in the furocoumarin. Accurate *ab initio* multiconfigurational second-order perturbation theory, the CASSCF/CASPT2 method, is used to compute electronic energies and spin–orbit coupling terms.

2. Methods and computational details

Using CASSCF multiconfigurational wave functions as reference, the second-order perturbation theory through the CASPT2 method (in its original zeroth-order Hamiltonian formulation) was employed to include dynamic correlation energy in the calculation

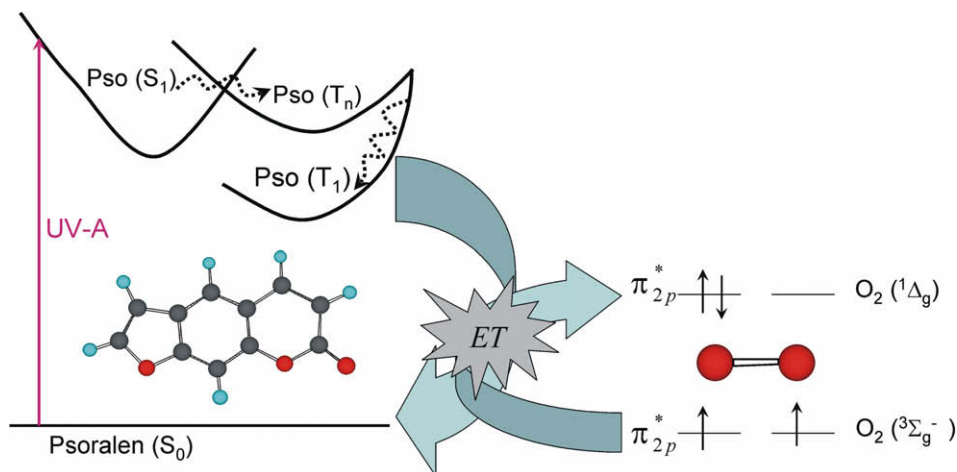


Fig. 3. Scheme of the oxygen-dependent PUVA mechanism. See text.

of the electronic excited states [68]. Such method has become particularly popular and has been successfully applied to elucidate the spectroscopy of organic and inorganic systems, including many biomolecules, yielding an advantageous ratio between the quality and the computational cost for the description of excited states in systems of relatively large molecular size [69–75]. The imaginary level-shift technique was employed in order to prevent the effect of intruder states, using a shift parameter of 0.3 au [76].

In order to analyze reaction rates for electron transfer in the organic molecule–molecular oxygen (M–O₂) photosystem we have at least to estimate the electronic coupling at some specific arrangement of the moieties. Looking for an appropriate arrangement yielding the most effective TET process is nontrivial and, in general, not even relevant, in particular in diffusion-controlled systems which may form a collision complex at short distances. It is important, however, to estimate reaction rates and lifetimes at different intermolecular distances. Furthermore, M–O₂ interaction potentials are very weak, and the potential surfaces are generally characterized by multiple shallow minima. Hence it is necessary to consider different orientations when approaching M and O₂ through a basic interfragment coordinate, here the distance *R* [77]. To find which orientation becomes the most favorable for an effective TET we have performed an initial exploration taken three molecular systems as models, studying how the relative orientation of both fragments (donor and acceptor) affects the ET process. In particular, we have studied the systems formed by two ethylene molecules (Et–Et), by the methaniminium cation and ethylene (MetN⁺–Et), and by ethylene and molecular oxygen (Et–O₂). We have computed the coupling between the states involved in the TET for the arrangements displayed in Fig. 4, named *face-to-face* (FF), used in the three cases, *side-by-side* (SS), used for Et–Et and Et–O₂, and *perpendicular* (PP), used only for Et–O₂.

The CASPT2 energies of the four lowest-lying singlet states and the three lowest-lying triplet states were obtained for Et–Et, MetN⁺–Et, and Et–O₂, at each arrangement and intermolecular distance considered. The active space used for the Et–Et and MetN⁺–Et supermolecules comprises the π orbitals and electrons, that is, 4 electrons/4 orbitals. Regarding the Et–O₂ supermolecule, 14 electrons and 10 orbitals have been employed as active space (8 of them correspond to the valence orbitals of each oxygen and 2 are the π orbitals of ethylene). The geometry for molecular oxygen in its triplet ground state was taken from experiment [78], whereas the ethylene molecule and the methaniminium cation (CH₂–

NH₂⁺) were optimized at the CASSCF level by using the π orbitals and electrons as active space. Both molecular structures were used unaltered in the different arrangements considering the general rigid character of these systems in ET processes [64]. The ANO-L one-electron basis set contracted as C,O,N[4s3p2d1f]/H[2s1p] was employed in the calculations of the Et–Et, MetN⁺–Et, and Et–O₂ model systems.

Using the information obtained from the model calculations, the supermolecule furocoumarin–O₂ was built placing the molecular oxygen at different distances with respect to the furocoumarin in a parallel FF orientation with respect to the reactive double bond (see Fig. 1). According to our previous studies [16,32–35], the furocoumarin in its long-lifetime and reactive lowest triplet state localizes the spin density in the C₃=C₄ double bond of the pyrone moiety (except for khellin). The geometries of both furocoumarin and molecular oxygen were kept fixed at the CASSCF optimized triplet excited (T₁) state structure [32–35] and the triplet ground (³Σ_g[−]) state experimental geometry [78], respectively. The active space employed in all cases (furocoumarin + O₂) was 14 electrons/11 orbitals (8/7 located in the furocoumarin and 6/4 located in O₂). The active space was validated after comparing the results with previous findings in the isolated furocoumarins [32–35] and control calculations on the oxygen molecule with larger active spaces and basis sets. The four lowest singlet states and the three lowest triplet states of the supermolecule were computed. No symmetry restrictions were imposed and the ANO-L basis set with the contraction scheme C,O[4s3p1d]/H[2s1p] was employed as in our previous studies in isolated furocoumarins [32–35].

In the weak coupling regime in which the electronic interaction is smaller than the vibrational reorganization energy, the rate for triplet–triplet energy transfer (*k*_{TET}), and the corresponding lifetime (τ_{TET}), between the donor and the acceptor can be estimated using Fermi's Golden Rule [53,63]:

$$k_{TET} = \frac{1}{\tau_{TET}} = \frac{4\pi^2}{h} |\langle \psi_i | \hat{H} | \psi_j \rangle|^2 \rho_E = \frac{4\pi^2}{h} (H')^2 \rho_E \quad (2)$$

where the matrix element of the Hamiltonian, *H'*, is the electronic part of the energy transfer (*i.e.*, the electronic coupling) and ρ_E is the density of states in the initial and final states and their spectral overlap. The inverse of the rate is the lifetime of energy transfer. To obtain the TET rates for the systems Et–Et, MetN⁺–Et, Et–O₂, and furocoumarin–O₂ we have taken values of $\rho_E = 0.1 \text{ eV}^{-1}$ and $(4\pi^2/h) = 9.55 \times 10^{15} \text{ eV}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This order of magnitude for the value of the density of states was used previously as a good estimation in systems of this size [63].

The calculation of the electronic coupling matrix element *H'* is the crucial part in the determination of ET rates and lifetimes. The extent of the coupling controls the energy transfer process, specifically the passage from one state to another and it can be taken as a measure of the efficiency of the ET process. Different procedures to estimate the ET coupling have been developed [56,58,79] based on diabatic localized dimer calculations, monomer transition densities or transition dipole moments, and a supermolecule ansatz of the dimer [53], whereas generalization of such approaches to determine TET couplings are also available [63]. From all procedures, an energy gap based method such as supermolecule dimer approach, in which the value of the coupling is obtained as half of the splitting or perturbation between the interacting states, has been shown to be convenient and accurate [53,63]. It is clear that its accuracy strongly relies on the quality of the quantum chemical method used to perform the electronic structure calculations, something guaranteed in the present study by the highly reliable and accurate CASPT2 method. Notice that the Basis Set Superposition Error (BSSE) problem does not affect the results of the coupling, which uses energy differences between states

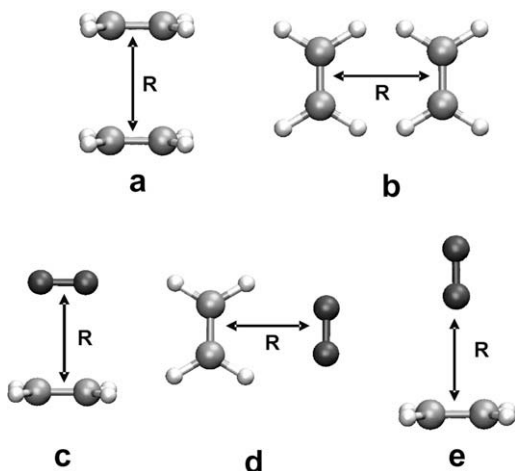


Fig. 4. Supermolecule arrangements employed for the ethylene–ethylene (Et–Et), methaniminium cation–ethylene (MetN⁺–Et), and ethylene–oxygen (Et–O₂) triplet–triplet energy transfer (TET) processes: (a) Et–Et and MetN⁺–Et face-to-face (FF), (b) Et–Et side-by-side (SS), (c) Et–O₂ FF, (d) Et–O₂ SS, and (e) Et–O₂ perpendicular (PP).

computed at the same geometry [16]. More specific details will be provided when describing the calculations on the different systems.

The whole process of generation of singlet oxygen from a photosensitized furocoumarin does not only depend on the efficiency of the TET from the triplet state of the furocoumarin, but also on the rate of formation of the triplet state itself. As shown in previous theoretical studies [32–35], in furocoumarins the crucial step to populate the triplet manifold in the gas phase is the intersystem crossing (ISC) process between the initially populated singlet $S_{\pi}(\pi\pi^*)$ state and the lowest-lying triplet $T_n(n\pi^*)$ state. The latter state evolves subsequently toward the lowest triplet $T_1(\pi\pi^*)$ state via a corresponding (and essentially barrierless and ultrafast) internal conversion (IC). In a similar manner as for Eq. (2), the estimation of the rate constant, here for nonradiative ISC (k_{ISC}), can be obtained as

$$k'_{ISC} = \frac{4\pi^2}{h} |H_{SO}|^2 \rho_E \quad (3)$$

where H_{SO} stands for the spin-orbit coupling terms for the nonradiative transition $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$. An estimated value of 200 eV^{-1} will be employed for ρ_E as used for psoralen in studies explicitly computing vibronic factors [80]. Additionally to the H_{SO} strength, the presence of energy barriers in the potential energy hypersurfaces may strongly affect the value of the rate constants, which can be corrected using the Arrhenius exponential term in the framework of the transition state theory [81–85]. As a qualitative estimation of these effects, a corrected ISC rate (k'_{ISC}) can be obtained from:

$$k'_{ISC} = k_{ISC} e^{-\Delta E/RT} \quad (4)$$

where k_{ISC} is that computed from Eq. (3), ΔE is the energy of the barrier from the initial electronic singlet to the triplet state, R is the ideal gas constant, and T the temperature (298 K). In this particular context, that is, in the calculation of rate constants that implicitly involve a collective behavior, ΔE will be estimated as the energy difference between the singlet $S_{\pi}(\pi\pi^*)$ state, populated at the Franck–Condon geometry, and the triplet $T_n(n\pi^*)$ state in the computed crossing point with the singlet state (S_{π}/T_n), considering that the energy obtained initially to populate S_{π} will be available, at least, to surmount the barrier and populate T_n . In case of excess energy, that is, negative barriers, we will consider the energy difference as zero. Spin-orbit coupling (H_{SO}) terms and energy barriers (ΔE) were determined previously for the family of furocoumarins (see Fig. 1) at the CASPT2 level [33–35]. All calculations reported here employed the Molcas 6.0 program package [86,87].

3. Results and discussion

3.1. Ethylene–ethylene triplet–triplet energy transfer

The potential energy curves of the ground and the three lowest-lying triplet excited states of the system Et–Et in two different arrangements (see Fig. 4), *SS* and *FF*, along the intermonomer distance are displayed in Fig. 5. The electronic coupling leading to the triplet–triplet energy transfer between the two lowest triplet states has been computed as half of the splitting between the states protagonist of the TET process (${}^3\text{Et} + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{Et} + {}^3\text{Et}$), that is, the two lowest triplet states of the supermolecule, according to a two-state model described elsewhere [63]. For both orientations, at large intermolecular distances these states are degenerate

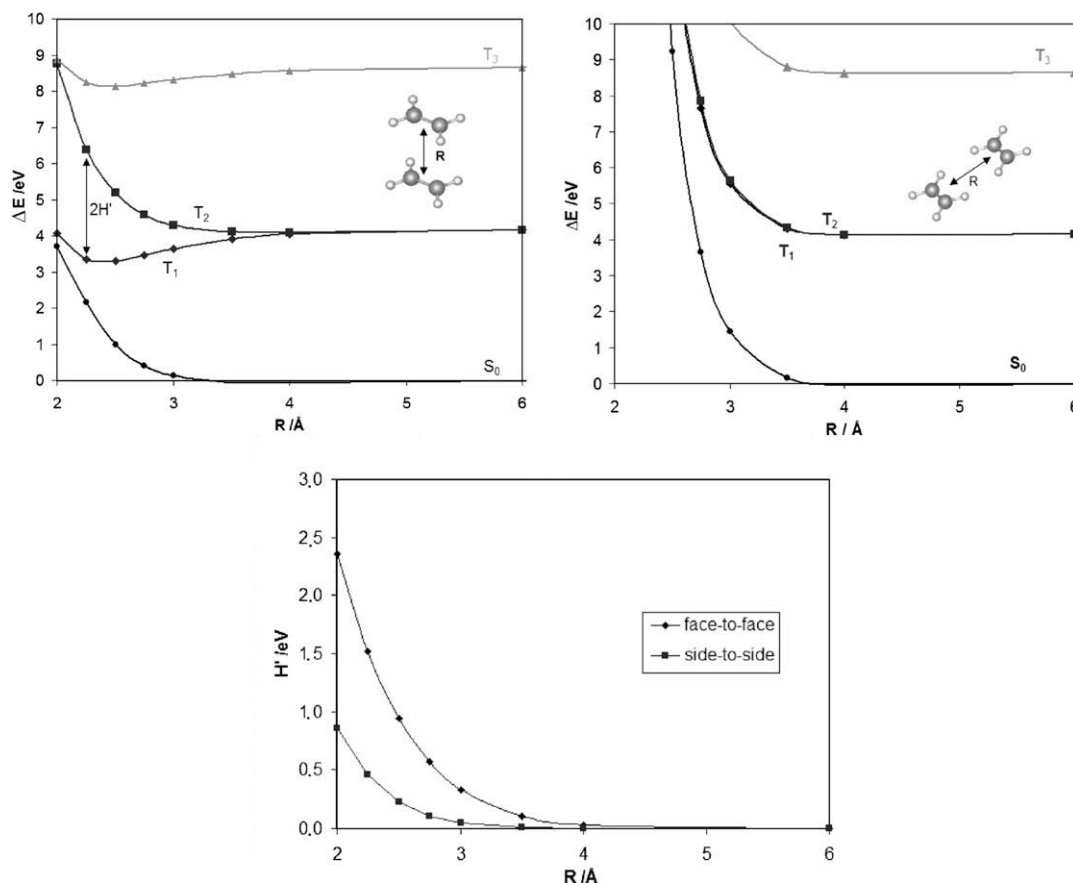


Fig. 5. CASPT2 potential energy curves of the ground and the three lowest triplet states of the Et–Et supermolecule in the face-to-face (top, left) and side-to-side (top, right) orientations. Included also (bottom) the dependence of the TET coupling (H') for the Et–Et system with the interfragment distance (R) and arrangement.

since both ethylene molecules do not interact. Once the intermolecular distance decreases, the behavior of the supermolecule is different for each arrangement. Whereas in the *FF* orientation, in which the two moieties are fully stacked, T_1 and T_2 become non-degenerated for distances smaller than 4.5 Å, pointing out a coupling between these states, in the *SS* orientation both triplet states remain extremely close in energy until distances near 3 Å.

The values for the coupling (H'), computed as half of the energy gap between the lowest triplet states at each intermonomer distance, the rate constants (k_{TET}), and the lifetimes (τ_{TET}) for the TET process are collected in Table 1. These results share the same order of magnitude as reported elsewhere [63]. In previous studies it was established that the TET coupling and the attenuation rates were mainly determined by the relative contact area with respect to the size of molecular orbitals, irrespectively of the molecular size, and were strongly depending on the orientation [63]. In the *SS* arrangement, with a much smaller orbital overlap between the fragments, the TET coupling is roughly one order of magnitude lower than in the fully stacked *FF* orientation, which can be considered the optimal overlap, and therefore to yield an upper bound for the effectiveness of the TET coupling for conjugated molecules.

3.2. Methaniminium cation–ethylene and ethylene– O_2 triplet–triplet energy transfer

In order to analyze the final furocoumarin– O_2 system, we have to move to models involving nonsymmetrical interacting moieties. The selected examples are the triplet–triplet energy transfer related with the deactivation process of the triplet state of the methaniminium cation (donor) when interacting with ethylene (acceptor), ${}^3\text{MetN}^+ + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{MetN}^+ + {}^3\text{Et}$ and the triplet state of ethylene (donor) with oxygen molecule in its triplet ground state (acceptor), ${}^3\text{Et} + {}^3\text{O}_2 \rightarrow {}^1\text{Et} + {}^1\text{O}_2$. In the former case the fragments are isoelectronic with those of the Et–Et system and the two lowest triplet states of the molecule are involved in the TET process. However, the interaction is not symmetric and the triplet states are computed at 4.35 (Et) and 4.82 eV (MetN^+) at infinite separation, where they localize on each of the moieties. Regarding the second model, the analysis of the CASSCF wave functions indicates that the states participating in the TET process are the S_1 and S_3 states of the Et– O_2 supermolecule, corresponding at infinite separation to $\text{Et}(T_1) + \text{O}_2({}^3\Sigma_g^-)$ and $\text{Et}(S_0) + \text{O}_2({}^1\Delta_g)$, respectively.

Unlike in the previous case (Et + Et), for asymmetric systems the resonance condition between the zeroth-order states is not generally fulfilled. As for electron transfer processes [88], two possibilities can be considered. First, to assume the validity of the Condon approximation, which neglects the variation of the coupling with respect to all molecular coordinates except for those which affect the main donor–acceptor separation distance [89]. A second alternative is to obtain the resonance condition and estimate the ET

couplings by including the variation of an external electric field. In practice, the field strength is scanned at the different intermolecular distances varying the geometry of the system with a selected coordinate leading to a decrease of the energy gap between the interacting states [63,90]. For diffusion-controlled processes in the exothermic region when a collision complex is formed and for classical rigid acceptors, such as molecular oxygen [64], it is unlikely that geometrical distortions at the different interfragment distances play a definite role in the magnitude of the interaction. In these cases, as seen before in similar processes [88], the Condon approximation behaves reasonably well over a large range of structural variations. We decided then to determine the value of the coupling obtained (using fixed donor–acceptor structures at different intermonomer distances) as the perturbation in the energies of the electronic states caused by dimerization [53]. This approach to compute the electronic coupling uses for symmetric fragments (as in Et–Et) half of the splitting between the corresponding state and it can be extended to nonsymmetric systems in the same fashion. The perturbation of the states by dimerization can be obtained within the adiabatic framework as half of the energy difference between the separation of the states of the monomers and the separation of the states in the supermolecule at the different interfragment distances. The procedure can be expected valid in the weakly coupling regime provided that the interacting states remain quasi-diabatic, that is, with wave functions clearly localized in each of the monomers, as it occurs in all the systems considered here at least until the intermonomer distance is made extremely short (<2.5 Å). This approach relates to those based on diabatic frameworks for studying electron transfer processes [88].

In order to compare the approximation employed to previous studies, we used the TET between the lowest triplet states in the dimer methaniminium cation–ethylene. The comparison of our values for the electronic coupling with those obtained by You et al. [63] by using half the splitting between the states in a minimum energy gap conformation (estimated from Fig. 6 in Ref. [63]) is compiled in Table 2. Both procedures yield TET couplings basically within the same order of magnitude, although our approach leads to somewhat smaller and larger values at large and short distances, respectively. However, the couplings obtained earlier using CIS as quantum chemical method [63] tend to considerably increase with the quality of the basis set, and can be expected larger with a superior one-electron basis set like the ANO-L type employed here. The Condon approach can therefore be considered quite reasonable in these systems, in particular if we stress (and this must be emphasized) that our main goal is to compare the relative strength of the interaction within the family of furocoumarins more than obtaining absolute values for the rate constants. The energy gap model described here is then considered appropriate and used in the other systems studied.

Table 1
Couplings (H'), rate constants (k_{TET}), and lifetimes (τ_{TET}) of the triplet–triplet energy transfer (TET) process between two ethylene molecules in the face-to-face and side-by-side arrangements.

R (Å)	Face-to-face			Side-by-side		
	H' (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H' (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)
10.00	0	–	–	0	–	–
8.00	5.79×10^{-6}	3.20×10^4	3.12×10^{-5}	5.07×10^{-7}	2.46×10^2	4.07×10^{-3}
6.00	1.47×10^{-4}	2.06×10^7	4.84×10^{-8}	3.57×10^{-6}	1.22×10^4	8.21×10^{-5}
4.00	2.89×10^{-2}	8.00×10^{11}	1.25×10^{-12}	2.01×10^{-3}	3.85×10^9	2.60×10^{-10}
3.50	1.01×10^{-1}	9.67×10^{12}	1.03×10^{-13}	9.48×10^{-3}	8.58×10^{10}	1.17×10^{-11}
3.00	3.28×10^{-1}	1.02×10^{14}	9.76×10^{-15}	4.62×10^{-2}	2.04×10^{12}	4.90×10^{-13}
2.75	5.66×10^{-1}	3.06×10^{14}	3.27×10^{-15}	1.03×10^{-1}	1.01×10^{13}	9.88×10^{-14}
2.50	9.43×10^{-1}	8.49×10^{14}	1.18×10^{-15}	2.25×10^{-1}	4.82×10^{13}	2.07×10^{-14}
2.25	1.516	2.19×10^{15}	4.56×10^{-16}	4.61×10^{-1}	2.03×10^{14}	4.92×10^{-15}
2.00	2.357	5.31×10^{15}	1.88×10^{-16}	8.59×10^{-1}	7.04×10^{14}	1.42×10^{-15}

Table 2

Triplet–triplet energy transfer electronic coupling terms (H') computed for the process ${}^3\text{MetN}^+ + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{MetN}^+ + {}^3\text{Et}$ at different intermonomer distances (R). Face-to-face arrangement.^a

R (Å)	H' (eV) ^b	H' (eV) ^c
5.0	6.0×10^{-4}	$\sim 5.0 \times 10^{-3}$
4.5	4.1×10^{-2}	$\sim 2.0 \times 10^{-2}$
4.0	1.6×10^{-1}	$\sim 8.0 \times 10^{-2}$
3.5	4.1×10^{-1}	$\sim 2.0 \times 10^{-1}$

^a MetN⁺ (methaniminium cation); Et (ethylene).

^b Present work. See text.

^c Estimated from Fig. 6 of Ref. [63]. CIS/6-311+G(d).

The next process studied is the TET between triplet excited ethylene and triplet ground state oxygen in the three different arrangements depicted in Figs. 4 and 6. In all cases, the energies of both states (S_1 and S_3) remain constant for intermolecular distances (R) larger than 4 Å. As expected, it is the strongly overlapping *FF* orientation which gives rise to a stronger interaction, as shown in the values of the couplings in Table 3. In general, the stacked *FF* arrangement is the most favorable orientation for the TET process to take place, in agreement with the analysis on the ethylene dimer, because it yields values for the rate constants from one to four orders of magnitude larger than for the other conformations. These results suggest that also in the furocoumarin–O₂ com-

plex the best computational strategy to look for efficient TET is to use the *FF* arrangement involving the reactive double bond of the furocoumarin in the triplet state (see Fig. 1) and the molecular oxygen at different intermolecular distances.

Comparison among the model systems in the *FF* arrangement just reveals electronic effects, as we are using the same estimate for the vibronic state density. Thus, Et–Et (displaying the maximum orbital overlap) yields couplings and rate constants nearly one order of magnitude larger than Et–O₂ (less overlap) at each distance. For instance, at 3.5 Å the process lifetimes are roughly 0.1 and 2 ps for Et–Et and Et–O₂, respectively. MetN⁺–Et gives rise, on the other hand, to couplings nearly three times larger than for the isoelectronic system Et–Et (as observed earlier [63]). In this case the orbital overlap is quite similar in both cases, and the nuclei–electrons interactions will determine the difference. In summary, the orbital overlap between the interacting donor and acceptor seems to be the key factor controlling the efficiency of the electronic coupling and therefore the TET process.

3.3. Furocoumarin–O₂ triplet–triplet energy transfer

3.3.1. Triplet–triplet energy-transfer rates and lifetimes

We turn now to the study of the TET process involving the system furocoumarin–O₂ for each one of the members of the family

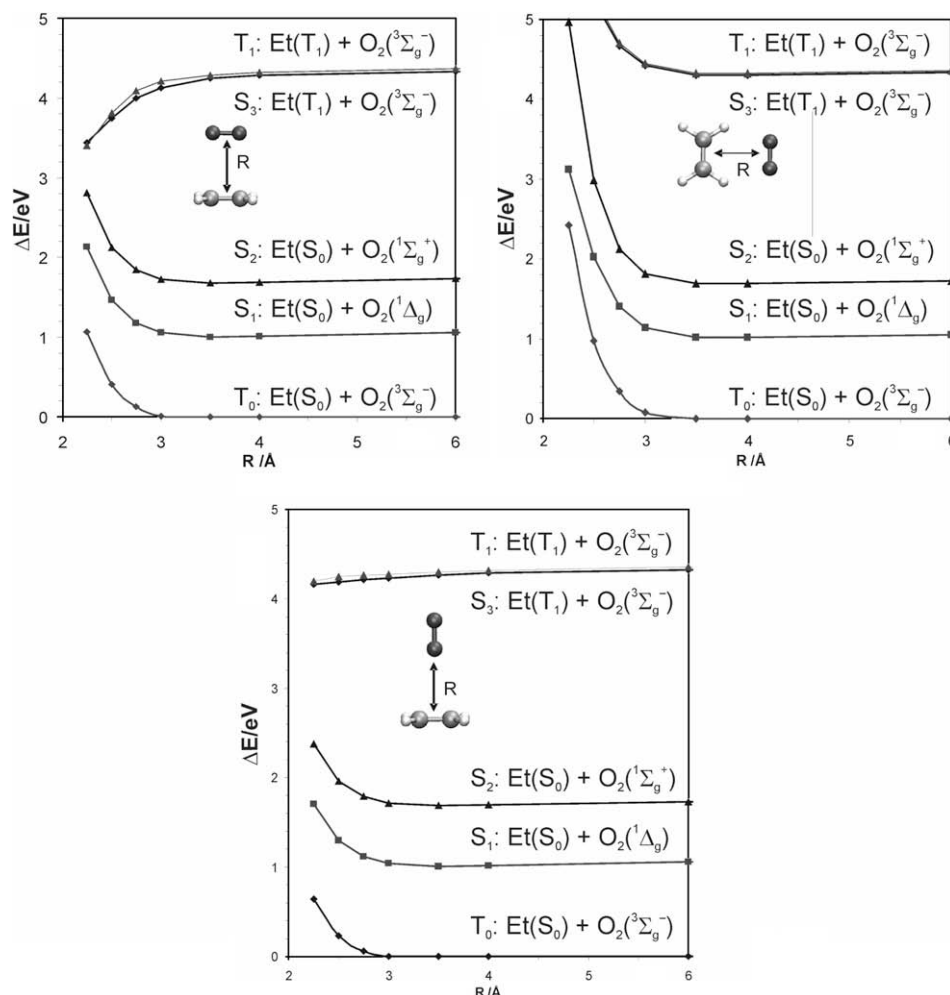


Fig. 6. CASPT2 potential energy curves of the ground and the low-lying excited states of the Et–O₂ supermolecule in the face-to-face (top, left), side-by-side (top, right) and perpendicular (bottom) arrangements.

Table 3
Couplings (H'), rate constant (k_{TET}) and lifetimes (τ_{TET}) of the triplet–triplet energy transfer (TET) process between ethylene and molecular oxygen (Et–O₂) in the face-to-face, side-by-side, and perpendicular arrangements.

R (Å)	Face-to-face			Side-by-side			Perpendicular		
	H' (eV)	k_{TET} (s ⁻¹)	τ_{TET} (s)	H' (eV)	k_{TET} (s ⁻¹)	τ_{TET} (s)	H' (eV)	k_{TET} (s ⁻¹)	τ_{TET} (s)
10.00	0	–	–	0	–	–	0	–	–
8.00	1.21×10^{-4}	1.40×10^7	7.15×10^{-8}	6.56×10^{-5}	4.11×10^6	2.43×10^{-7}	7.39×10^{-5}	5.22×10^6	1.92×10^{-7}
6.00	3.69×10^{-4}	1.30×10^8	7.69×10^{-9}	1.11×10^{-4}	1.18×10^7	8.49×10^{-8}	5.30×10^{-4}	2.69×10^8	3.72×10^{-9}
4.00	3.71×10^{-3}	1.31×10^{10}	7.62×10^{-11}	1.11×10^{-3}	1.18×10^9	8.45×10^{-10}	1.33×10^{-4}	1.68×10^7	5.96×10^{-8}
3.50	2.12×10^{-2}	4.29×10^{11}	2.33×10^{-12}	2.16×10^{-3}	4.45×10^9	2.24×10^{-10}	7.13×10^{-3}	4.85×10^{10}	2.06×10^{-11}
3.00	1.05×10^{-1}	1.06×10^{13}	9.46×10^{-14}	1.95×10^{-2}	3.61×10^{11}	2.77×10^{-12}	3.89×10^{-2}	1.44×10^{12}	6.93×10^{-13}
2.75	2.32×10^{-1}	5.16×10^{13}	1.94×10^{-14}	3.05×10^{-2}	8.87×10^{11}	1.13×10^{-12}	8.54×10^{-2}	6.96×10^{12}	1.44×10^{-13}
2.50	4.99×10^{-1}	2.38×10^{14}	4.20×10^{-15}	1.71×10^{-1}	2.80×10^{13}	3.57×10^{-14}	1.86×10^{-1}	3.32×10^{13}	3.02×10^{-14}
2.25	9.85×10^{-1}	9.26×10^{14}	1.08×10^{-15}	5.53×10^{-1}	2.92×10^{14}	3.43×10^{-15}	4.06×10^{-1}	1.57×10^{14}	6.36×10^{-15}

displayed in Fig. 1. As already stated, the furocoumarin acts as a very efficient triplet photosensitizer, because, after initial population of the lowest singlet excited state by UV-A radiation, the ISC mechanism to switch the population toward the triplet manifold is very efficient [32–35,80]. The molecule behaves as a donor in its triplet state and it is capable to transfer its energy to molecular oxygen in its triplet ground state to generate the singlet ground state furocoumarin and excited singlet oxygen (¹Δ_g, see Eq. (1)). In all cases the energy of the triplet state of the furocoumarin (computed adiabatically from 2.42 eV in khellin to 2.14 eV in 3-CPS, see Supplementary material) is much higher than the energy of the oxygen ¹Δ_g state (computed 1.09 eV, experimental 0.97 eV [4]), and the process falls clearly into the exothermic regime, expected to be controlled by diffusion. Fig. 7 displays the potential energy curves of the lowest-lying singlet and triplet states of the supermolecule psoralen–O₂ in a FF arrangement with respect to the C₃=C₄ bond of the pyrone ring (the reactive bond in the triplet state, where the spin density is basically located [32–35]) at different intermolecular distances. The states of the supermolecule protagonist of the TET are 4¹A (T₁ of psoralen and ³Σ_g⁻ of O₂) as initial energy level and 1¹A (S₀ of psoralen and ¹Δ_g of O₂) as the final outcome of the process in which both moieties have changed spin and energy. Within the present approach the electronic coupling (H') is

obtained (see Fig. 7) as half the difference $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$, where ϵ_∞ and ϵ_i are the energy gaps between the states 4¹A and 1¹A at infinite distance (at 10 Å in the current computation) and at the different interfragment distances, respectively. In this way, the coupling represents the perturbation introduced in each state due to the interaction within the dimer. It is important to notice how advantageous is that definition, because the results are in practice independent of the number of states considered. Potential energy curves for the other furocoumarin–O₂ systems are included in the Supplementary material, whereas Table 4 compiles the computed couplings, reaction rates, and lifetimes for the processes of interest. As the goal is studying the differential behavior of the furocoumarins, our attention will be focused on the relative (more than the absolute) values obtained for rate constants and lifetimes.

The inspection of the results of the electronic couplings and reaction rates in Table 4 indicates that the differences between the furocoumarins in this respect are very small. At distances larger than 3 Å, the extent of the coupling is not large and similar in all cases, leading to lifetimes in the order of the picosecond or larger, in general nearly one order of magnitude smaller than for the model systems. Including more vibrational contributions in the calculation of the rate constants would surely enlarge their absolute value. At shorter distances it is possible to identify khellin

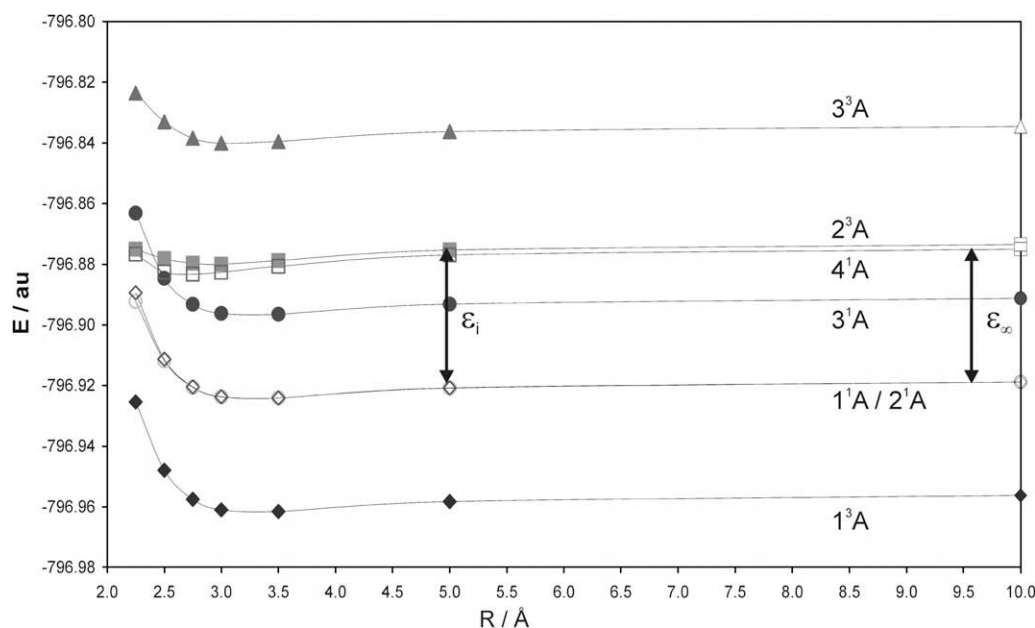


Fig. 7. Potential energy curves of the low-lying excited states of the supermolecule psoralen–molecular oxygen along the interfragment distance (R). The energy coupling H' is obtained as half of the energy difference $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$ between the initial 4¹A (T₁ of psoralen and ³Σ_g⁻ of O₂) and final 1¹A (S₀ of psoralen and ¹Δ_g of O₂) states of the supermolecule at infinite distance (ϵ_∞ , zero coupling situation) and at each of the distances (ϵ_i).

Table 4Couplings (H'), rate constants (k_{TET}), and lifetimes (τ_{TET}) of the TET process between a furocoumarin and O_2 at different interfragment distances (R). Face-to-face arrangement.

R (Å)	H' (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H' (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H' (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)
	<i>Psoralen</i>			<i>8-MOP</i>			<i>5-MOP</i>		
10.00	0.0000	—	—	0.0000	—	—	0.0000	—	—
5.00	0.0012	1.43×10^9	6.98×10^{-10}	0.0028	7.35×10^9	1.36×10^{-10}	0.0020	3.71×10^9	2.69×10^{-10}
3.50	0.0038	1.41×10^{10}	7.10×10^{-11}	0.0033	1.07×10^{10}	9.39×10^{-11}	0.0044	1.82×10^{10}	5.50×10^{-11}
3.00	0.0357	1.21×10^{12}	8.23×10^{-13}	0.0370	1.31×10^{12}	7.65×10^{-13}	0.0388	1.44×10^{12}	6.97×10^{-13}
2.75	0.0870	7.23×10^{12}	1.38×10^{-13}	0.0909	7.88×10^{12}	1.27×10^{-13}	0.0921	8.11×10^{12}	1.23×10^{-13}
2.50	0.1966	3.69×10^{13}	2.71×10^{-14}	0.2067	4.08×10^{13}	2.45×10^{-14}	0.2025	3.92×10^{13}	2.55×10^{-14}
2.25	0.3833	1.40×10^{14}	7.13×10^{-15}	0.4101	1.61×10^{14}	6.23×10^{-15}	0.3707	1.31×10^{14}	7.62×10^{-15}
	<i>Khellin</i>			<i>TMP</i>			<i>3-CPS</i>		
10.00	0.0000	—	—	0.0000	—	—	0.0000	—	—
5.00	0.0015	2.29×10^9	4.37×10^{-10}	0.0028	7.56×10^9	1.32×10^{-10}	0.0020	3.70×10^9	2.70×10^{-10}
3.50	0.0051	2.49×10^{10}	4.01×10^{-11}	0.0023	5.14×10^9	1.94×10^{-10}	0.0031	9.21×10^9	1.09×10^{-10}
3.00	0.0387	1.43×10^{12}	6.98×10^{-13}	0.0379	1.37×10^{12}	7.29×10^{-13}	0.0330	1.04×10^{12}	9.61×10^{-13}
2.75	0.0948	8.59×10^{12}	1.16×10^{-13}	0.0996	9.47×10^{12}	1.06×10^{-13}	0.0805	6.19×10^{12}	1.61×10^{-13}
2.50	0.2283	4.98×10^{13}	2.01×10^{-14}	0.2417	5.58×10^{13}	1.79×10^{-14}	0.1816	3.15×10^{13}	3.18×10^{-14}
2.25	0.5197	2.58×10^{14}	3.88×10^{-15}	0.5257	2.64×10^{14}	3.79×10^{-15}	0.3406	1.11×10^{14}	9.02×10^{-15}

and TMP as increasing the coupling with respect to the other species, in particular 3-CPS, which yields the smallest values. Below 2.5 Å, that is, in the range of the collision complex, is unlikely that the obtained values for the couplings are accurate. The states are in this case strongly perturbed and far from the quasi-diabatic picture, showing strong delocalization and configurational mixing in the CASSCF wave function, and the Condon approximation is no longer valid. Fig. 8 displays a graphical comparison for the values of the couplings for the various complexes and interfragment distances. Some small differences can be noted, producing an approximate order for the efficiency of the TET process based on the couplings and rate constants as 3-CPS < psoralen < 8-MOP < 5-MOP < khellin < TMP, with TMP and khellin yielding the largest couplings and psoralen and 3-CPS the smallest. Such differences are not large enough to make a clear distinction between the systems. In fact, the mentioned tendencies obtained are at odds with the experimental findings, most of them measured anyway in solvated phases. Despite somewhat contradictory results, 3-CPS and psoralen were reported in most cases as better singlet oxygen generators than the other furocoumarins [17–20,28,29], just opposite to the tendencies found here for the efficiency of the coupling, whereas the situation for the other systems was unclear. Even if

the present results are obtained for the isolated systems (and only strictly comparable to the gas-phase measurements) and they can be slightly modified when including solvent effects, we do not expect the changes to be of importance, as shown by control test calculations. It is then possible to safely conclude that the electronic coupling factor is not the key aspect controlling a differential efficiency in the generation of singlet oxygen by the furocoumarins. This outcome has been obtained also in other recent studies involving a common acceptor and a series of donors of similar structure. The value of the electronic coupling did not deviate substantially from an average value characteristic of the whole donor series [64]. If the electronic coupling is therefore not the control effect to modulate the differential efficiency of the TET process in molecules with similar structures like furocoumarins, we have to turn our attention to other aspect of the process such as the efficiency of the molecule as photosensitizer (that is, the population of the lowest triplet state), which is also related to the overall efficiency of the system as a phototherapeutic compound [16].

3.3.2. Intersystem crossing rates and lifetimes in furocoumarins

As described in Section 2, Eq. (3) was employed to initially compute ISC reaction rates for the population of the triplet manifold in

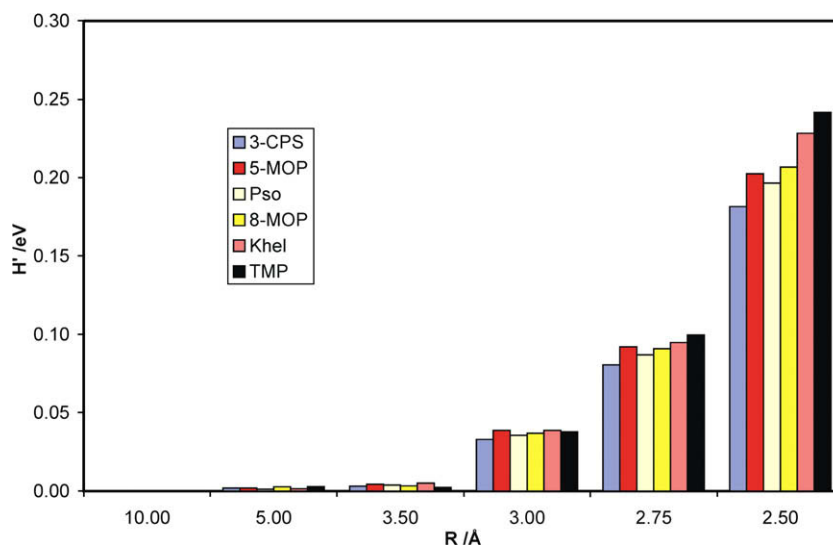


Fig. 8. Comparison between the electronic couplings (H') triggering the TET process between a furocoumarin and molecular oxygen at the different interfragment distances (R).

each of the furocoumarin molecules. In particular, and as determined previously [32–35], the ISC nonradiative process corresponds to the transfer $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$ in each furocoumarin donor, a process which will take place more efficiently in the region of the $(S_{\pi}/T_n)_X$ singlet–triplet crossing, and that subsequently will give rise to an ultrafast population of the lowest $T_n(\pi\pi^*)$ by internal conversion in the triplet manifold. The spin–orbit coupling factors (H_{SO}) between the lowest S_{π} and T_n states, computed at the crossing region structure as determined previously [32–35] and the ISC rates (k_{ISC}) are compiled in Table 5. This procedure to obtain the rates (see Eq. (3)) just represent to take into consideration the spin–orbit coupling factors to account for the efficiency of the process. Obviously, TMP, in particular, and also psoralen and 3-CPS, having the largest coupling, leads to the largest rates. However, and in order to properly account for reaction rates, it is also required to consider the energy barriers found along the process, at least in the simplified manner introduced by Eq. (4). Table 5 compiles the energy barriers computed earlier [32–35] for the process $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$ in the different systems. Unlike in previous discussions [35] in which we considered as barrier the energy difference between the minimum of the S_{π} state and the crossing point $(S_{\pi}/T_n)_X$, the present approach accounts for the excess energy available in the system from the initially populated S_{π} state (at the Franck–Condon geometry) to the crossing point (see Table 4), which seems to be more relevant in this context, where the interest focuses on rate constants. Most of the studied furocoumarins have their initially populated S_{π} state well above the crossing point energy, what leads to negative barriers. In such cases, as we consider that the system has sufficient energy to reach the ISC region and such process is in the exothermic regime, the energy barrier on Eq. (4) has been made zero. Once all factors considered, the ISC rates and lifetimes (in the nanosecond range), although similar for the different compounds, allows to establish an approximate order of efficiency of the furocoumarin: khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS, an order which slightly differs from that proposed in our previous study [35] because of the different type of energy barrier considered earlier. The present results can be compared, at least qualitatively, with those reported in the literature, which are summarized in Table 6 for simplicity.

Despite the sometimes contradictory reports of the solution experiments (see Table 6) and the absence of solvation effects in the calculation [35], the basic order of efficiency holds true in most cases. In particular, 3-CPS is confirmed as the best singlet oxygen generator because its ability to populate the triplet state, in contrast to the smallest value obtained for the coupling term in this molecule in the previous section. Comparison with experiment seems to support the approach based on spin–orbit couplings and energy barriers. Psoralen is also confirmed as good photosensitizer, whereas TMP and 8-MOP have intermediate efficiency. As

Table 5
Rate constants (k) and decay times (τ) of the radiationless intersystem crossing (ISC) process $S_{\pi} \rightarrow T_n$ in the family of the furocoumarins.

Furocoumarin	ΔE (eV) ^a	H_{SO} (cm ⁻¹) ^b	k_{ISC} (s ⁻¹) ^c	k'_{ISC} (s ⁻¹) ^d	τ'_{ISC} (ns) ^e
Psoralen	0.03	9.2	3.58×10^9	1.11×10^9	0.90
8-MOP	-0.01	4.9	1.02×10^9	1.02×10^9	0.98
5-MOP	-0.10	3.5	5.18×10^8	5.18×10^8	1.93
Khellin	-0.19	2.9	3.56×10^8	3.56×10^8	2.81
TMP	0.09	32.2	4.39×10^{10}	1.32×10^9	0.76
3-CPS	-0.24	9.2	3.58×10^9	3.58×10^9	0.28

^a Energy barriers from S_{π} (at the Franck–Condon region) to T_n (at the S_{π} – T_n crossing region) [35].

^b Spin–orbit coupling terms at the S_{π} – T_n crossing region [35].

^c ISC rate constants obtained using Eq. (3).

^d ISC rate constants obtained using Eq. (4). Negative barriers are taken as zero.

^e ISC decay times. Inverse of the rate constant as obtained using Eq. (4).

Table 6

Summary of computed and experimental estimated efficiency orders of the singlet oxygen generation process by photosensitized furocoumarins.

Efficiency of the process	Ref.
<i>Theory</i> ^a	
Khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS	Present
<i>Experiment</i>	
Khellin < 8-MOP < psoralen < 5-MOP	31
TMP \approx 5-MOP \approx 8-MOP \ll psoralen < 3-CPS	29
5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP	17
8-MOP < 5-MOP < TMP < khellin < 3-CPS	26
5-MOP < 8-MOP < psoralen < 3-CPS	27
5-MOP < TMP < 8-MOP < psoralen	28

^a The theoretical results are based on the estimated efficiency of the ISC process $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$, the crucial step to populate the lowest triplet state of the furocoumarin, $T_n(\pi\pi^*)$, and initiate the TET process.

most of the experiments show and our calculations predict, 5-MOP would be a much poorer oxygen generator. For khellin we also predict a less favorable situation, which more exhaustive experiments will have to confirm.

4. Conclusions

A theoretical analysis of the triplet–triplet energy transfer (TET) process in the complex furocoumarin–O₂ has been performed using quantum chemical methods, in particular the *ab initio* multi-configurational CASPT2 approach. In the framework of a two-state model and a weakly coupling regime, Fermi's Golden Rule has been employed to estimate TET rate constants and lifetimes. To this end, a supermolecule dimer approach and an energy-gap procedure have been used to determine the strength of the electronic coupling between the protagonist states, which in the furocoumarin–O₂ systems are the lowest triplet excited state of the former, acting as donor, and the triplet ground state of molecular oxygen, acting as acceptor. In order to test the procedure and also to determine the proper orientation of the two moieties, several model systems as ethylene–ethylene, methaniminium cation–ethylene, and ethylene–molecular oxygen have been analyzed. A face-to-face arrangement, in which the orbital overlap between the π clouds of the C=C π bonds is maximized, was selected as the most favorable orientation to efficiently boost TET. Values for electronic coupling have been computed at different intermonomer separations in which the molecular oxygen has been placed in a parallel disposition with respect to the pyrone double C=C bond of the furocoumarin (except in the case of khellin), which is the reactive bond in the triplet state of the compound.

The estimated values for the electronic couplings, TET rate constants, and lifetimes in the different furocoumarin–O₂ systems are too similar to provide clear trends to understand the differential yields of singlet oxygen formation measured in experiment. The determined rates do not follow the reported tendencies. Despite the qualitative goal intended for this type of study we can clearly conclude that the electronic coupling factor does not permit rationalizing the differential efficiency in the generation of singlet oxygen by the furocoumarins, because it is too similar for donors with similar structures. This conclusion was obtained earlier in other systems [64].

A second aspect upon which the efficiency of the overall TET process depends, such it is the population of the photosensitizing lowest triplet state in furocoumarin, has also been analyzed based on the magnitude of the reaction rates. In this case, the relevant operator is the strength of the spin–orbit coupling related to the intersystem crossing (ISC) process between the initially excited singlet state and the triplet manifold. The effect on the ISC rates

of the energy barrier required to access the triplet state has also been taken into account. The qualitative estimation of the efficiency of the ISC process leads us to suggest an order for the efficiency of the singlet oxygen generation in the different furocoumarins for PUVA therapy such as khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS. In this respect, from all compounds studied here, 3-CPS can be predicted the best photosensitizer (as singlet oxygen generator), followed by TMP and psoralen. 5-MOP and, particularly, khellin would not be, on the other hand, so efficient. The determined tendencies seem to agree with most of the experimental determinations in aqueous solution based on the production of reactive singlet oxygen. These results account for the triplet state population, and therefore are equally valid to estimate the efficiency of the TET process or the formation of furocoumarin–thymine adducts (initiated also in the triplet state of the furocoumarin), although the latter reaction may depend on many other structural factors [16]. It is therefore hardly possible to establish which type of phototherapeutic action predominates in each compound. In any case, and although determining absolute rates and lifetimes should be still considered too complex, the present results lead to validate some of the reported trends [17,27–29], and establish a promising strategy to evaluate the efficiency of different systems for the photodynamic therapy. Corresponding research for other relevant compounds is currently on the way.

Acknowledgments

The authors thank Dr. L.M. Frutos, from Universidad de Alcalá (Spain), for useful discussions. The research has been supported by projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience of the Spanish MEC/FEDER.

Appendix A. Supplementary material

Potential energy curves furocoumarin–oxygen and energies of triplet and singlet states of the furocoumarins. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemphys.2009.04.014.

References

- [1] D. Phillips, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 117.
- [2] R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19.
- [3] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66 (2002) 89.
- [4] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Advanced Chemistry Texts, Gordon & Breach Science, Amsterdam, 2000.
- [5] O. Arad, A. Gavaldá, Ó. Rey, N. Rubio, D. Sánchez-García, J.I. Borrell, J. Teixidó, S. Nonell, M. Cañete, A. Juarranz, A. Villanueva, J.C. Stockert, P.J. Díaz, *Afinidad* 59 (343) (2002).
- [6] S.K. Pushpan, S. Venkatraman, V.G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan, T.K. Chandrashekar, *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* 2 (2002) 187.
- [7] K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty, *Cancer Res.* 36 (1976) 2326.
- [8] B.C. Wilson, M.S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* 31 (1986) 327.
- [9] W-F. Cheong, S.A. Prah, A.J. Welch, *IEEE J. Quantum Electron.* 26 (1990) 2166.
- [10] B.C. Wilson, M.S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61.
- [11] M. Ochsner, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39 (1997) 1.
- [12] P.-S. Song, K.J. Tapley Jr., *Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 1177.
- [13] E. Ben-Hur, P.-S. Song, *Adv. Rad. Biol.* 11 (1984) 131.
- [14] J.E. Hearst, *Chem. Res. Toxicol.* 2 (1989) 69.
- [15] D. Averbeck, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 859.
- [16] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 14002.
- [17] P.C. Joshi, M.A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 638.
- [18] N.J. de Mol, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 815.
- [19] C.N. Knox, E.J. Land, T.G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 359.
- [20] W. Poppe, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* 22 (1975) 217.
- [21] J.C. Ronfard-Haret, D. Averbeck, R.V. Bensasson, E. Bisagni, E.J. Land, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 479.
- [22] N.J. de Mol, *Pharmaceutisch Weekblad* 3 (1981) 599.
- [23] D. Averbeck, L. Dubertret, M. Craw, T.G. Truscott, F. DaíAcqua, P. Rodighiero, D. Vedaldi, E.J. Land, *Il Farmaco* 39 (1983) 57.
- [24] R. Bevilacqua, F. Bordin, *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 191.
- [25] N.J. de Mol, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, B. van Beele, *Photochem. Photobiol.* 34 (1981) 661.
- [26] S.G. Jones, A.R. Young, T.G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 21 (1993) 223.
- [27] D. Vedaldi, F. DaíAcqua, A. Gennaro, G. Rodighiero, *Z. Naturforsch.* 38 (1983) 866.
- [28] Q.A. Blan, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 177.
- [29] M.A. Pathak, P.C. Joshi, *Biochim. Biophys. Acta* 798 (1984) 115.
- [30] P. Martelli, L. Bovalini, S. Ferri, G.G. Franchi, M. Bari, *Febs Lett.* 189 (1985) 255.
- [31] H.Y. Aboul-Enein, A. Kladna, I. Kruk, K. Lichszeld, T. Michalska, *Biopolymers (Biospectroscopy)* 72 (2003) 59.
- [32] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 124502.
- [33] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* 434 (2007) 107.
- [34] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys.* 347 (2008) 422.
- [35] J.J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 199 (2008) 34.
- [36] M. Hotokka, B.O. Roos, P. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5263.
- [37] W.H. Elliott, D.C. Elliott, *Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, 2005.
- [38] F. Wilkinson, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 2569.
- [39] G.W. Robinson, R.P. Frosch, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 1187.
- [40] A.A. Gorman, I. Hamblett, C. Lambert, B. Spencer, M.C. Standen, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8053.
- [41] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Porter, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (69) (1973) 708.
- [42] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Porter, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (69) (1973) 721.
- [43] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Porter, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (70) (1974) 1143.
- [44] F. Wilkinson, D.J. McCarvey, A.F. Olea, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 3762.
- [45] A.F. Olea, F. Wilkinson, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 4518.
- [46] S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 487.
- [47] Th. Förster, *Ann. Phys.* 2 (1948) 55.
- [48] M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, 1995.
- [49] J. Barber, *Rep. Prog. Phys.* 41 (1978) 1159.
- [50] H. Singh, B. Bagchi, *Curr. Sci.* 89 (2005) 1710.
- [51] L. Stryer, R.P. Haugland, *Biochemistry* 58 (1967) 719.
- [52] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [53] R.F. Fink, J. Pfister, A. Schneider, H. Zhao, B. Engels, *Chem. Phys.* 343 (2008) 353.
- [54] D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 836.
- [55] D.W. Liao, W.D. Cheng, J. Bigman, Y. Karni, S. Speiser, S.H. Lin, *J. Chin. Chem. Soc.* 42 (1995) 177.
- [56] G.D. Scholes, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 1251.
- [57] R.D. Harcourt, G.D. Scholes, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 10521.
- [58] G.D. Scholes, R.D. Harcourt, *J. Chem. Phys.* 104 (1996) 5054.
- [59] G.D. Scholes, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 18731.
- [60] M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, New York, 1995.
- [61] A. Terenin, V. Ermolaev, *Trans. Faraday Soc.* 52 (1956) 1042.
- [62] N.J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, 1991.
- [63] Z.-Q. You, C.-P. Hsu, G.R. Fleming, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 44506.
- [64] L.M. Frutos, O. Castaño, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 104108.
- [65] P.H. Krupenie, *J. Phys. Chem.* 1 (1972) 423.
- [66] F. Nyasulu, J. Macklin, W. Cusworth III, *J. Chem. Ed.* 79 (2002) 356.
- [67] D. Tudela, V. Fernández, *J. Chem. Ed.* 80 (2003) 1381.
- [68] K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 1218.
- [69] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3151.
- [70] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fülscher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* 93 (1996) 219.
- [71] M. Rubio, B.O. Roos, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 7202.
- [72] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, in: M. Olivucci (Ed.), *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [73] M. Merchán, R. González-Luque, T. Climent, L. Serrano-Andrés, E. Rodríguez, M. Reguero, D. Peláez, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 26471.
- [74] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin AC, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6559.
- [75] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, in: M.K. Shukla, J. Leszczynski (Eds.), *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*, Springer, The Netherlands, 2008.
- [76] N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 196.
- [77] M.J. Paterson, O. Christiansen, F. Jensen, P.R. Ogilby, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1136.

- [78] D.C. Harris, M.D. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Dover, Publications, Inc., New York, 1989.
- [79] G.D. Scholes, R.D. Harcourt, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 102 (1995) 9574.
- [80] J. Tatchen, N. Gilka, C.M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5209.
- [81] D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 188.
- [82] D.G. Truhlar, B.C. Garrett, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 440.
- [83] A.D. Isaacson, D.G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 1380.
- [84] D.G. Truhlar, W.L. Hase, J.T. Hynes, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 2664.
- [85] D.G. Truhlar, B.C. Garrett, S.J. Klippenstein, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 12771.
- [86] G. Karlström, R. Lindh, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, U. Ryde, V. Veryazov, P. -O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrady, L. Seijo, *Comp. Mater. Sci.* 28 (2003) 222.
- [87] V. Veryazov, P.-O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, *Int. J. Quantum Chem.* 100 (2004) 626.
- [88] R.J. Cave, M.D. Newton, *J. Chem. Phys.* 106 (1997) 9213.
- [89] M.D. Newton, *Chem. Rev.* 91 (1991) 767.
- [90] L.A. Curtiss, C.A. Naleway, J.R. Miller, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 1182.



ANEXOS

NOMENCLATURA AMINOÁCIDOS

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Serina	Ser	S
Valina	Val	V

SIGLAS

A

A	<i>Adenine</i>	Adenina
Abs	<i>Absortion</i>	Absorción
AC	<i>Avoided crossing</i>	Cruce evitado
ADN	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido Desoxirribonucleico
ANO	<i>Atomic Natural Orbital</i>	Orbital Natural Atómico
ATP	<i>Adenosine 5'-Triphosphate</i>	Adenosina 5'-Trifosfato
aug-cc	<i>Augmented Correlation Consistent</i>	Extendida Consistente con la Correlación
aug-cc-pVDZ	<i>Augmented Correlation Consistent Polarized Valence-Double-Zeta</i>	Doble Zeta de Valencia Polarizada Consistente con la Correlación y Extendida
aug-cc-pVTZ	<i>Augmented Correlation Consistent Polarized Valence-Triple-Zeta</i>	Triple Zeta de Valencia Polarizada Consistente con la Correlación y Extendida

B

B3LYP	<i>Becke3-Lee-Yang-Parr</i>	Becke3-Lee-Yang-Parr
BChl	<i>Bacteriochlorophyll</i>	Bacterioclorofila
BhRh	<i>Bathorhodopsin</i>	Batorrodopsina
BPheo	<i>Bacteriopheophytin</i>	Bacteriofeofitina
BSSE	<i>Basis Set Superposition Error</i>	Error por Superposición del Conjunto de Base

C

C	<i>Cytosine</i>	Citosina
Car	<i>Carotens</i>	Caroteno
CASSCF	<i>Complete Active Space Self-Consistent Field</i>	Espacio Activo Completo Campo Autoconsistente
CASSI	<i>Complete Active Space State Interaction</i>	Espacio Activo Completo Interacción de Estados
CASPT2	<i>Complete Active Space Perturbation Theory to Second Order</i>	Espacio Activo Completo Teoría de Perturbaciones hasta Segundo Orden
CBC	<i>Cyclobutane Cytosine</i>	Ciclobutilcitosina
Cc	<i>Correlation Consistent</i>	Consistente con la Correlación
CC	<i>Coupled Cluster</i>	Coupled Cluster

cc-Pvdz	<i>Correlation Consistent Polarized Valence-Double-Zeta</i>	Doble Zeta de Valencia Polarizada Consistente con la Correlación
CCSD	<i>Coupled Cluster Single and Double</i>	Coupled Cluster Simples y Dobles
CCSDT	<i>Coupled Cluster Single, Double, and Triple</i>	Coupled Cluster Simples, Dobles y Triples
CCSD(T)	<i>Coupled Cluster Single and Double and Triple computed perturbatively</i>	Coupled Cluster Simples y Dobles y Triples calculadas de forma perturbativa
CCSDTQ	<i>Coupled Cluster Single, Double, Triple and Quadruple</i>	Coupled Cluster Simples, Dobles, Triples y Cuadruples
CGTO	<i>Contracted Gaussian Type Orbital</i>	Orbital de Tipo Gaussian Contraído
Chl	<i>Chlorophyll</i>	Clorofila
CI	<i>Configuration Interaction / Conical Intersection</i>	Interacción de Configuraciones / Intersección Cónica
CISD	<i>Configuration Interaction Single and Double</i>	Interacción de Configuraciones Simples y Dobles
CISDT	<i>Configuration Interaction Single, Double, and Triple</i>	Interacción de Configuraciones Simples, Dobles y Triples
CMP	<i>Cytidine 5'-Monophosphate</i>	Citidina 5'-Monofosfato
CP	<i>Counterpoise</i>	Counterpoise
CT	<i>Charge Transfer</i>	Transferencia de Carga
Cyt	<i>Cytochrome</i>	Citocromo

D

dA	<i>2'-Deoxyadenosine</i>	2'-Desoxiadenosina
dAMP	<i>2'-Deoxyadenosine 5'-Monophosphate</i>	2'-Desoxiadenosina 5'-Monofosfato
dC	<i>2'-Deoxycytidine</i>	2'-Desoxicitidina
dCMP	<i>2'-Deoxycytidine 5'-Monophosphate</i>	2'-Desoxicitidina 5'-Monofosfato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido Desoxirribonucleico
DFT	<i>Density Functional Theory</i>	Teoría del Funcional de la Densidad
dG	<i>2'-Deoxyguanosine</i>	2'-Desoxiguanosina
dGMP	<i>2'-Deoxyguanosine 5'-Monophosphate</i>	2'-Desoxiguanosina 5'-Monofosfato
dT	<i>2'-Deoxythymidine</i>	2'-Desoxitimidina

dTMP	<i>2'-Deoxythymidine 5'- Monophosphate</i>	2'-Desoxitimidina 5'- Monofosfato
DZ	<i>Double Zeta</i>	Doble Zeta
DZP	<i>Double Zeta Polarization</i>	Doble Zeta de Polarización
E		
E	<i>Energy</i>	Energía
EA	<i>Electron Affinity</i>	Afinidad Electrónica
EE	<i>Electrostatic Embedding</i>	Inmersión Electrostática
EET	<i>Excitation Energy Transfer</i>	Transferencia de Energía de Excitación
eT	<i>Electron Transfer</i>	Transferencia Electrónica
ET	<i>Energy Transfer</i>	Transferencia de Energía
F		
F	<i>Fluorescence</i>	Fluorescencia
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>	Flavin adenina dinucleótido
FBC	<i>Free Base Chlorin</i>	Base libre de clorina
FCI	<i>Full Configuration Interaction</i>	Interacción de Configuraciones Completa
FF	<i>Face-to-face</i>	Cara a cara
G		
G	<i>Guanine</i>	Guanina
G+	<i>Gram +</i>	Gram +
GDP	<i>Guanine 5'-Diphosphate</i>	Guanina 5'-Difosfato
GMP	<i>Guanine 5'-Monophosphate</i>	Guanina 5'-Monofosfato
GMPc	<i>Cyclic Guanine 5'- Monophosphate</i>	Guanina 5'-Monofosfato cíclico
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>	Receptor acoplado a una proteína G
GTO	<i>Gaussian Type Orbital</i>	Orbital de Tipo Gaussiano
GTP	<i>Guanine 5'-Triphosphate</i>	Guanina 5'-Trifosfato
H		
HF	<i>Hartree-Fock</i>	Hartree-Fock
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>	Orbital Molecular Ocupado Más Alto
I		
IC	<i>Internal Conversion</i>	Conversión Interna
IMAG	<i>Imaginary</i>	Imaginario

IP	<i>Ionization Potential</i>	Potencial de Ionización
IPEA	<i>Ionization Potential Electron Affinity</i>	Potencial de Ionización Afinidad Electrónica
IRC	<i>Intrinsic Reactive Coordinate</i>	Coordenada Intrínseca de Reacción
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>	Cruce Entre Sistemas
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IVR	<i>Intramolecular Vibrational Relaxation</i>	Relajación vibracional intramolecular

K

L

L	<i>L-Cones</i>	Cono L
LE	<i>Locally Excited</i>	Excitado Localmente
LS	<i>Level-Shift</i>	Desplazamiento de Nivel
LS-CASPT2	<i>Level-Shift Complete Active Space Perturbation Theory to Second Order</i>	Desplazamiento de Nivel Espacio Activo Completo Teoría de Perturbaciones hasta Segundo Orden

M

M	<i>M-cones</i>	Cono M
MCSCF	<i>Multi-Configurational Self-Consistent Field</i>	Multiconfiguracional de Campo Autoconsistente
ME	<i>Mechanical Embedding</i>	Inmersión Mecánica
MEP	<i>Minimum Energy Path</i>	Camino de Mínima Energía
MM	<i>Molecular Mechanics</i>	Mecánica Molecular
MO	<i>Molecular Orbital</i>	Orbital Molecular
MP	<i>Møller-Plesset</i>	Møller-Plesset
MP2	<i>Møller-Plesset to Second order</i>	Møller-Plesset hasta Segundo orden

N

NAB	<i>Nucleic Acid Base</i>	Base nucleica
NADP+	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido (oxidada)
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	Nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NO	<i>Natural Orbital</i>	Orbital Natural

O		
ONION	<i>Our own N-layered Integrated Molecular Orbital and molecular Mechanics</i>	
P		
P	<i>Phosphorescence</i>	Fosforescencia
PCM	<i>Polarizable Continuum Model</i>	Modelo polarizable continuo
PE	<i>Polarized Embedding</i>	Inmersión Polarizada
PEC	<i>Potential Energy Curve</i>	Curva de Energía Potencial
PEH	<i>Potential Energy Hypersurface</i>	Hipersuperficie de Energía Potencial
PES	<i>Potential Energy Surface</i>	Superficie de Energía Potencial
PGTO	<i>Primitive Gaussian Type Orbital</i>	Orbital de Tipo Gaussiano Primitivo
Pheo	<i>Pheophytin</i>	Feofitina
PhRh	<i>Photorhodopsin</i>	Fotorrodopsina
PP	<i>Perpendicular</i>	Perpendicular
PQ	<i>Plastoquinone</i>	Plastoquinona
PS	<i>Photosystem</i>	Fotosistema
PSB11	<i>Protonated Schiff Base</i>	Base de Schiff protonada
Pyr	<i>Pyrimidine</i>	Pirimidina
Q		
Q	<i>Quinone</i>	Quinona
QCEXVAL	<i>Quantum Chemistry of the Excited State Universitat de València</i>	Química Cuántica del Estado Excitado <i>Universitat de València</i>
QM	<i>Quantum Methods</i>	Métodos Cuánticos
R		
RC	<i>Reaction Center</i>	Centro de reacción
Rh	<i>Rhodopsin</i>	Rodopsina
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido Ribonucléico
RFP	<i>Reverse Fingerprint</i>	Huella digital reversa
S		
S	<i>S-Cones</i>	Cono S
S	<i>Single</i>	Simple
SAC	<i>Spin-Adapted Configuration</i>	Configuración Adaptada de Espín

SCE	<i>Self-Consistent Embedding</i>	Inmersión Autoconsistente
SCF	<i>Self-Consistent Field</i>	Campo Autoconsistente
SCFPT2	<i>Self-Consistent Field Perturbation Theory to Second order</i>	Campo Autoconsistente Teoría de Perturbaciones hasta Segundo orden
SOC	<i>Spin-Orbit Coupling</i>	Acoplamiento Espín-Órbita
SONO	<i>Single-Occupied Natural Orbital</i>	Orbital Natural Uniocupado
SP	<i>Special Pair</i>	Par especial
SS	<i>Side-by-side</i>	Lado a lado
SS-EET	<i>Singlet Singlet Excitation Energy Transfer</i>	Transferencia de energía de excitación Singlete-Singlete
STC	<i>Singlet-Triplet Crossing</i>	Cruce Singlete Triplete
STO	<i>Slater Type Orbital</i>	Orbital de Tipo Slater
SWI	<i>Step-Wise Intermediate</i>	Intermediario

T

T	<i>Thymine / Triple / Twist</i>	Timina / Triples / Torsión
TD-DFT	<i>Time-Dependent Density Functional Theory</i>	Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo
TMP	<i>Thymidine 5'-Monophosphate</i>	Timidina 5'-Monofosfato
TS	<i>Transition State</i>	Estado de Transición
TT-EET	<i>Triplet Triplet Excitation Energy Transfer</i>	Transferencia de energía de excitación Triplete-Triplete
TZ	<i>Triple Zeta</i>	Triple Zeta
TZP	<i>Triple Zeta Polarization</i>	Triple Zeta de Polarización

U

U	<i>Uracile</i>	Uracilo
UV	<i>Ultraviolet</i>	Ultravioleta
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i>	Ultravioleta-Visible

V

VDZ	<i>Valence-Double-Zeta</i>	Doble Zeta de Valencia
VEA	<i>Vertical Electron Affinity</i>	Afinidad Electrónica Vertical
VET	<i>Vibrational Energy Transfer</i>	Transferencia de Energía Vibracional
VIP	<i>Vertical Ionization Potential</i>	Potencial de Ionización Vertical
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>	Dinámica Molecular Visual
VTZ	<i>Valence-Triple-Zeta</i>	Triple Zeta de Valencia

ZPVE	Z	<i>Zero-Point Vibrational Energy</i>	Energía Vibracional de Punto Cero
------	----------	--------------------------------------	--------------------------------------