



**UNIVERSIDAD DE MURCIA**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización Teórica de la Acción de Ácidos  
Grasos y Carotenoides en Membranas y  
Fotosistemas**

**D. Javier Cerezo Bastida**

**2013**





Universidad de Murcia  
Facultad de Química  
Departamento de Química Física

---

# **Caracterización teórica de la acción de ácidos grasos y carotenoides en membranas y fotosistemas**

---

Memoria que para aspirar al grado de  
Doctor en Química presenta

Javier Cerezo Bastida

Murcia 2013

El trabajo contenido en esta Memoria ha sido financiado parcialmente por el Plan Nacional de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia y por el Plan de Formación de Profesorado Universitario y Personal Investigador de la Universidad de Murcia.





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

Facultad de  
**Química**

D. Alberto Requena Rodríguez, Catedrático de Universidad, y D. José Zúñiga Román, Catedrático de Universidad, del Área de Química Física en el Departamento de Química Física AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Caracterización teórica de la acción de ácidos grasos y carotenoides en membranas y fotosistemas”, realizada por Javier Cerezo Bastida, bajo su inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Física.

Fdo. D. Alberto Requena Rodríguez.

Fdo. D. José Zúñiga Román.

Murcia, a 14 de octubre 2013.



# Índice

<b>PRÓLOGO</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MÉTODOS DE LA QUÍMICA CUÁNTICA</b>	<b>7</b>
2.1. Métodos basados en la función de onda . . . . .	8
2.1.1. Métodos aproximados para resolver la ecuación de Schrödinger electrónica . .	11
2.1.2. Método de Hartree-Fock . . . . .	14
2.1.3. Correlación electrónica y métodos post-Hartree-Fock . . . . .	18
2.2. Teoría del funcional de la densidad . . . . .	23
2.2.1. Desarrollo formal de la teoría . . . . .	24
2.2.2. Formulación de Kohn-Sham . . . . .	26
2.2.3. Funcionales de correlación e intercambio . . . . .	29
2.2.4. DFT dependiente del tiempo . . . . .	35
2.3. Implementación práctica de métodos QM . . . . .	39
2.3.1. Funciones de base . . . . .	39
2.3.2. Evaluación de integrales moleculares . . . . .	43
2.3.3. Programas de mecánica cuántica . . . . .	46
<b>3. MECÁNICA MOLECULAR Y MÉTODOS DE SIMULACIÓN</b>	<b>49</b>
3.1. Métodos de mecánica molecular (MM) . . . . .	50
3.1.1. Términos enlazantes . . . . .	50
3.1.2. Términos no enlazantes . . . . .	53
3.2. Métodos híbridos QM/MM . . . . .	55
3.3. Métodos de simulación: Dinámica Molecular . . . . .	56
3.3.1. Programas de dinámica molecular . . . . .	61

<b>4. ESPECTROSCOPIA COMPUTACIONAL</b>	<b>63</b>
4.1. Interacción de la radiación con la materia . . . . .	64
4.2. Técnicas de simulación de espectros . . . . .	67
4.2.1. Formulación independiente del tiempo (TI) . . . . .	67
4.2.2. Formulación dependiente del tiempo (TD) . . . . .	69
4.3. Espectroscopía electrónica con resolución vibracional . . . . .	71
4.3.1. Dinámica vibracional: modos normales y relación de Duschinsky . . . . .	71
4.3.2. Formulaciones TI y TD en la aproximación armónica . . . . .	77
<b>5. PROTECCIÓN EN ENTORNOS BIOLÓGICOS: DE ÁCIDOS GRASOS A CAROTENOIDEOS</b>	<b>81</b>
5.1. Descripción teórica de entornos biológicos complejos . . . . .	82
5.1.1. Campos de fuerza estándar . . . . .	83
5.1.2. Parametrización de ácidos grasos con un modelo de átomos unidos. . . . .	86
5.1.3. Parametrización de carotenoides con un modelos de todos los átomos. . . . .	88
5.1.4. Modelización de fotosistemas . . . . .	102
5.2. Ácidos grasos <i>trans</i> en membranas celulares: terapias de lípidos de membrana . . . . .	104
5.2.1. Detalles Computacionales . . . . .	105
5.2.2. Efecto de los ácidos grasos sobre las membranas . . . . .	106
5.3. Acción antioxidante de carotenoides en entornos biológicos . . . . .	119
5.3.1. Detalles Computacionales . . . . .	120
5.3.2. Cuantificación del carácter antioxidante de carotenoides . . . . .	121
5.3.3. Relación entre conformación y carácter antioxidantes en carotenoides . . . . .	126
5.3.4. Carotenoides en bicapas lipídicas modelo . . . . .	134
5.3.5. Carotenoides en sistemas fotosintéticos . . . . .	147
<b>6. ESPECTROSCOPIA Y ESTADOS EXCITADOS EN CAROTENOIDEOS</b>	<b>153</b>
6.1. Fotoquímica de los estados electrónicos de baja energía . . . . .	154
6.2. Dinámica vibracional . . . . .	158
6.2.1. Detalles computacionales . . . . .	159
6.2.2. Análisis de modos normales . . . . .	159
6.2.3. Espectros IR y Raman de $\beta$ -caroteno . . . . .	167

6.3. Espectroscopía electrónica con resolución vibracional . . . . .	171
6.3.1. Detalles computacionales . . . . .	172
6.3.2. Espectros simulados para $\beta$ -caroteno . . . . .	176
6.3.3. Espectros simulados para violaxantina . . . . .	187
6.3.4. Limitaciones del tratamiento en coordenadas internas . . . . .	189
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>195</b>
<b>8. SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>201</b>
8.1. Summary . . . . .	201
8.1.1. Protection within biological environments: from fatty acids to carotenoids . .	203
8.1.2. Spectroscopy and excited states of carotenoids . . . . .	208
8.2. Conclusions . . . . .	212
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>218</b>



# Prólogo

*No podemos evitar la especialización, eso es imposible si queremos avanzar. Aunque debemos ser conscientes de que la especialización no es una virtud sino un mal inevitable.*

E. Schrödinger, “Science and Humanism” [Schrödinger 96]

Esta reflexión de Erwin Schrödinger, uno de los padres de la teoría cuántica, asume el sacrificio del ideal de hombre renacentista en favor del progreso científico, al tiempo que llama a evitar la complacencia ante este hecho. El propio Schrödinger trató de luchar contra esta realidad aventurándose en campos tan alejados de la física cuántica que lo encumbró como la biología molecular o la filosofía, en las que realizó contribuciones de mayor o menor envergadura. Enfrentado yo ahora a mi Tesis Doctoral, último paso de una especialización académica que comenzara aquel día en que preguntaron ¿ciencias o letras?, estas palabras resuenan como una verdad ineludible. Y, efectivamente, resulta difícil escapar de esta especialización al adentrarse en cualquier proyecto de Tesis, aunque, dentro de una disciplina tan extensa y apasionante como la Química Computacional, haya tenido la suerte de no dejar de explorar y aprender nuevos enfoques y técnicas durante estos cuatro años, produciendo así la ilusión de esquivar, en parte, ese mal inevitable.

Siendo el empeño por ampliar horizontes una de las principales motivaciones de esta Tesis, con el riesgo siempre presente de acabar con las manos llenas de proyectos fallidos, el trabajo resultante no habría sido posible sin las acertadas indicaciones de mis directores, los profesores Alberto Requena y Pepe Zúñiga, quienes han sabido encauzar mis aspiraciones hasta hacerlas desembocar en esta memoria. Me gustaría reiterar las gracias a Alberto por mostrarme esta asombroso campo científico apenas acabé mis estudios y ofrecerme siempre un sitio en su grupo de investigación, y a Pepe, por transmitirme la motivación que debe mover la ciencia y enseñarme a transmitirla a través de sus siempre precisas correcciones. Quiero agradecer también al profesor Adolfo Bastida, tercer pilar de este grupo de investigación, toda la ayuda prestada y que haya compartido su acertada visión de las herramientas computacionales.

Le debo un agradecimiento especialmente grande a José Pedro Cerón, que con su ejemplo de esfuerzo y creatividad científica me ha mostrado, y sigue mostrando, que aún en estos tiempos complicados es posible tomar, con éxito, el camino de la ciencia. Esta Tesis sigue los pasos iniciados en la suya, primera Tesis de este grupo de investigación enfocada íntegramente en métodos de cálculo electrónico, fuente de lectura recurrente que ha ayudado a llevar este trabajo a buen fin.

Una carrera investigadora se nutre de las fructíferas interacciones con los científicos que la acompañan, y esta Tesis debe mucho a todos aquellos que han compartido conmigo su ilusión por la ciencia que, en muchos casos, hemos podido hacer juntos. Gracias a François, con un recuerdo entrañable a ese año alsaciano con el que comencé a aprender a investigar, que me servirá siempre de ejemplo con su rigurosa y efectiva forma de trabajar. Gracias a Marwa, por compartir conmigo su inquietud científica, y asombrarme con la impresionante capacidad de aprender. A Miguel Mompeán, gracias por las charlas de Linux, GROMACS o los baches del camino, que han alimentado mi pasión por lo que hacemos. Gracias a Miguel Soler y José Miguel Bolarín, que me han hecho sentir tan cómodo en Cuántica A, y al resto de componentes de este grupo de investigación: Mari, Antonio “Ciezano” y Félix. Mi agradecimiento también al resto de becarios que caminaron y caminan por el departamento: Encarni, Ana, Ricardo, Diego, Álvaro, Eduardo y Carmen. Quiero asimismo extender mi agradecimiento a todos los miembros del departamento, especialmente a la directora, Prof. María del Carmen López, por brindarme todas las facilidades para poder llevar a cabo este trabajo de la forma más cómoda.

Gracias a Leif Eriksson, por acogerme en su grupo de investigación en Galway (Irlanda) durante mi estancia de máster, y continuar después nuestra colaboración tan fructíferamente. Muchas gracias también, al Dr. Fabrizio Santoro, por su hospitalidad durante mi estancia en Pisa (Italia), en la que me enseñó todo un curso avanzado de espectroscopía, abriéndome la puerta a una disciplina asombrosa, y gracias también a Francisco, por su indispensable colaboración en este aprendizaje.

Eterno agradecimiento a mis padres, por su apoyo incondicional, y por enseñarme, con su ejemplo, a ser buena persona y que, sin eso, todo lo conseguido vale poco. Espero haber aprendido algo.

A M<sup>a</sup> Carmen, que me ha acompañado día a día, aguantando las limitaciones que todo el trabajo invertido en esta Tesis nos ha traído. Tu apoyo ha sido la clave para este final feliz. Te daré las gracias cada día.

Tanto se debe tras un trabajo acabado, que a muchos que por justicia debieran aparecer en estos agradecimientos ha dejado fuera la memoria o el espacio. Daos por agradecidos, porque sois partícipes del final de esta etapa.



# CAPÍTULO 1

## Introducción

La introducción de las técnicas computacionales en investigaciones químicas y bioquímicas ha supuesto un importante adelanto científico que ha permitido simular, con gran realismo, los procesos que tienen lugar en todo tipo de sistemas, desde el casi vacío medio interestelar a los abarrotados y complejos entornos biológicos. El aumento de las prestaciones computacionales y la continua mejora de los modelos y algoritmos propicia una descripción cada vez más detallada de los sistemas estudiados, con una resolución temporal y espacial a menudo inaccesibles para las técnicas experimentales. No es extraño, por tanto, que con mayor frecuencia los trabajos de laboratorio se apoyen en cálculos teóricos como un complemento a los datos empíricos que ayuda a reforzar y refinar las conclusiones de los estudios.

Los métodos computacionales forman parte de una amplia disciplina centrada en la modelización de los procesos químico físicos y la predicción de las propiedades químicas de los sistemas, conocida como Química Computacional o Química Teórica. En este punto, resulta ineludible referirnos, en primer lugar, a los métodos de la Mecánica Cuántica y su aplicación a los problemas de la química, la Química Cuántica [Levine 01], ya que en el nivel microscópico, al que debemos de bajar para estudiar átomos y moléculas, los sistemas no están regidos por las leyes de la cotidiana física clásica, sino por la, contra intuitiva, física cuántica. Por esta razón, la comprensión de las propiedades atómicas y moleculares no pudo alcanzarse sino de la mano de esta “nueva física” que viene revolucionando la ciencia desde comienzos del siglo XX. Tal vez, la expresión más conocida de la mecánica cuántica es la famosa ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \tag{1.1}$$

que es una ecuación de valores propios en la que  $\hat{H}$  es el operador Hamiltoniano, asociado a la energía del sistema,  $E$ , y  $\Psi$  es la correspondiente función propia. Esta ecuación proporciona una herramienta para calcular la energía exacta (no relativista) de cualquier sistema químico, en estado estacionario, introduciendo el Hamiltoniano del sistema molecular concreto, o Hamiltoniano molecular, cuya expresión viene dada por:

$$\hat{H}_{mol} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_i \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 - \frac{\hbar^2}{2} \sum_A \frac{1}{m_A} \nabla_A^2 + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B e'^2}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|} - \sum_A \sum_i \frac{Z_A e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|} + \sum_A \sum_{i>j} \frac{e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} \quad (1.2)$$

donde los índices  $A$  y  $B$  hacen referencia a núcleos atómicos y los índices  $i$  y  $j$  a electrones, de forma que  $\mathbf{R}_A$  y  $\mathbf{r}_i$  son las posiciones del núcleo  $A$  y el electrón  $i$ , respectivamente<sup>1</sup>. Además,  $Z_A$  es el número atómico del núcleo  $A$ ,  $m_i$  y  $m_A$  es la masa de electrones y núcleos,  $\hbar$  es la constante de Planck dividida por  $2\pi$  y  $e'$  es la carga del electrón multiplicada por un factor de forma que  $e'^2 = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0}$ .

La compleja expresión del Hamiltoniano molecular revela que la aparente simplicidad de la Ecuación (1.1) es solo consecuencia de una nomenclatura simbólica acertadamente compacta ya que, de hecho, encierra un formidable problema matemático que solo puede ser resuelto de forma exacta para el átomo de hidrógeno. No es de extrañar, por tanto, que la práctica totalidad de las metodologías comiencen adoptado una aproximación, introducida por Max Born y Robert Oppenheimer, consistente en la separación de la *lenta* dinámica nuclear del rápido movimiento de los electrones, con los núcleos moviéndose en la superficie de energía potencial creada por el campo medio asociado a los electrones. De esta forma, la mayor parte de los métodos de la Química Cuántica se centran en resolver de forma aproximada la ecuación de Schrödinger electrónica, que proporciona la energía electrónica y la correspondiente función de onda. También bajo la aproximación de Born-Oppenheimer, otros métodos toman una ruta alternativa hacia la energía exacta del sistema, que pasa por el uso de la densidad electrónica, en lugar de la compleja función de onda, simplificando, en cierta medida, el problema matemático. En el Capítulo 2 revisamos ambas formulaciones, centrándonos en los métodos de los que haremos uso a lo largo de esta Tesis.

Aunque los métodos cuánticos son capaces de predecir con bastante precisión las propiedades de los sistemas moleculares, el elevado coste computacional que conllevan limita su aplicación a sistemas de, como mucho, unas centenas de átomos. Los modelos de sistemas biológicos, como membranas celulares o complejos proteicos, pueden llegar a estar formados, sin embargo, por miles o cientos de miles de átomos, por lo que quedan fuera del alcance de las metodologías puramente cuánticas. Afortunadamente, existen enfoques alternativos para evaluar la superficie de energía potencial de los sistemas químicos, como aquellos en los que las interacciones atómicas se describen de acuerdo las leyes de la física clásica. Se introducen para ello expresiones que describen de forma simplificada el efecto de la nube electrónica, como modelos armónicos de muelles para los enlaces o ecuaciones empíricas de dispersión, como la de Lennard-Jones, para evaluar las interacciones intermoleculares. Este tipo de métodos conforman la Mecánica Molecular, y en ellos, la energía se descompone en la contribución de diferentes factores, tanto enlazantes (enlaces, ángulos o diedros), como no enlazantes (términos dispersivos y electrostáticos), cuyas expresiones se basan en distintos modelos clásicos, introduciendo parámetros empíricos para asegurar que los valores calculados describan adecuadamente un conjunto de datos experimentales

<sup>1</sup>A lo largo de la descripción de la metodología que realizamos en los siguientes capítulos, empleamos una “r” minúscula las coordenadas electrónicas y una “R” mayúscula para las nucleares.

o reproduzcan satisfactoriamente los resultados de cálculos de química cuántica. Las expresiones analíticas sencillas que se emplean permiten calcular las interacciones que se producen entre un gran número de átomos, por lo que son adecuadas para el estudio de sistemas de gran tamaño, como los modelos de entornos biológicos y serán de utilidad en este trabajo. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la necesidad de realizar una parametrización empírica limita su precisión a la calidad de los parámetros que, a su vez, dependerán del conjunto de datos empleado en el ajuste de los mismos. En el Capítulo 3 describimos con más detenimiento los distintos métodos de la Mecánica Molecular, así como modelos híbridos en los que una parte de las interacciones quedan descritas mediante la Mecánica Molecular y otra parte mediante la Mecánica Cuántica, permitiendo una descripción precisa de la región más relevante. Por otro lado, hay que tener en cuenta que para obtener información de sistemas de gran tamaño, que poseen complejas superficies de energía potencial, necesitamos considerar un conjunto grande de conformaciones en lugar de centrarnos únicamente en un mínimo de la superficie. Por ejemplo, un muestreo configuracional extenso es una pieza indispensable para evaluar las propiedades termodinámicas en las condiciones deseadas de presión y temperatura. Por este motivo, las técnicas de simulación que proporcionan colectivos de conformaciones de forma eficiente resultan de gran utilidad. En este trabajo hemos hecho uso de la Dinámica Molecular que, además de generar los colectivos termodinámicos, permite evaluar el comportamiento dinámico de los sistemas, e incluimos una descripción de sus fundamentos en el Capítulo 3.

Uno de los tipos de técnicas más útiles para investigar detalladamente los sistemas químicos es la espectroscopía, que estudia las transiciones que se producen entre estados cuánticos de un sistema material inducidas por la radiación electromagnética [Requena 04], permitiendo de este modo obtener información del sistema registrando los cambios producidos en la radiación resultante tras su interacción con el medio material. La gran diversidad de técnicas espectroscópicas disponibles permite su aplicación a sistemas con diferente tamaño, desde átomos aislados a grandes complejos biológicos, que abarcan procesos con distintas escalas energéticas y temporales, incluyendo tanto los tránsitos casi instantáneos entre niveles electrónicos como los asociados con las más lentas dinámicas vibracional y rotacional. En nuestro caso, nos interesamos en la aplicación a moléculas de interés biológico, un ámbito en el que las técnicas espectroscópicas pueden proporcionar una información no solo de la estructura de las moléculas, sino también de su función en distintos organismos. Caben destacar, en este sentido, los enormes avances que, impulsados por la fuente de radiación que ha revolucionado el mundo científico, el láser, han experimentado las técnicas espectroscópicas, mejorando drásticamente la resolución energética y permitiendo el estudio dinámico de procesos que trascurren en escalas de tiempo por debajo del nanosegundo. Estas mejoras se han visto reflejadas, además, en la aparición de nuevas técnicas cada vez más específicas que proporcionan una gran cantidad de información no siempre fácil de analizar. Es en este aspecto donde los métodos espectroscópicos se benefician notablemente de una interesante rama de la Química Teórica, la Espectroscopía Computacional, en la que se persigue simular la forma y posición de las líneas espectrales producidas por diferentes tipos de técnicas, algunas de las cuales describiremos en el Capítulo 4 de esta Tesis. Dada la naturaleza cuántica de los tránsitos entre niveles energéticos moleculares, la mecánica cuántica vuelve a resultar clave para entender este tipo de procesos.

Como ya hemos apuntado, la aparente sencillez de una banda espectral encierra, en realidad,

una gran cantidad de información acerca de la estructura interior de la molécula, y la disposición de espectros simulados de forma precisa puede ser determinante para analizar los datos experimentales en profundidad, permitiendo por ejemplo discernir la geometría molecular por comparación de los espectros registrados frente a los simulados para distintos isómeros. Esta vía, que conecta la Espectroscopía Experimental y la Computacional, es además de doble sentido, ya que los desarrollos teóricos se han beneficiado de forma importante de la detallada información proporcionada por las técnicas experimentales. De hecho, la capacidad de reproducir fielmente los espectros registrados cada vez con mayor resolución, implica un conocimiento profundo de la física que gobierna estos procesos y avala los modelos teóricos empleados. Nos encontramos, por tanto, ante un ejemplo paradigmático de la relación complementaria entre teoría y experimento en el campo de la química.

En general, todas estas herramientas computacionales de la Química Teórica encuentran un excelente campo de trabajo en la modelización y el estudio diferentes entornos biológicos, con importantes contribuciones en campos de investigación tan relevantes como el desarrollo de medicamentos o de dispositivos biotecnológicos como los relativos a la producción de energía. Por este motivo, su aplicación resulta muy adecuada para abordar los objetivos de esta Tesis, en la que nos hemos centrado en caracterizar el comportamiento de biomoléculas que juegan un papel esencial en entornos biológicos como membranas celulares y sistemas fotosintéticos.

Las membranas celulares son estructuras biológicas complejas formadas por dos bicapas de fosfolípidos en las que se encuentran inmersas otras biomoléculas, y desempeñan una importante función no solo en la separación física del medio celular, sino también como soporte para una gran número de procesos fisiológicos. Entre los componentes más relevantes de las membranas encontramos las proteínas, integrales o periféricas, que son las principales responsables de un gran número de funciones fisiológicas [Escribá 08], y el colesterol, que regula la fluidez de la membrana [Kusumi 88]. Junto a estas moléculas aparecen otras a las que puede atribuirse una acción terapéutica específica, como los ácidos grasos, que pueden llegar a modular la estructura de la membrana [Escribá 06], o los carotenoides, que se asocian con la protección antioxidante de las cadenas lipídicas [Gruszecki 10]. Por su parte, los fotosistemas forman uno de los pilares en el desarrollo de la vida en la Tierra y son un elemento de gran potencial biotecnológico, integrando la maquinaria perfecta que permite la fijación de la energía solar, que baña el planeta en enormes cantidades. Como en las membranas, los fotosistemas contienen inmersas una gran diversidad de moléculas que determinan la actividad de los mismos, como distintos pigmentos, entre los que destacan los carotenoides, cuya presencia en membranas ya hemos comentado.

Resulta importante destacar que la función biológica de sistemas complejos como membranas y fotosistemas viene significativamente determinada por la presencia de moléculas específicas que se integran en estas grandes bioestructuras, por lo que la comprensión de su función biológica debe pasar necesariamente por la caracterización de estas especies y su papel concreto en el medio. En este trabajo nos centramos en dos tipos de moléculas que, como ya hemos comentado, pueden encontrarse inmersas en algunos de estos sistemas biológicos: los ácidos grasos y los carotenoides.

Los ácidos grasos con insaturaciones *cis* son capaces, por un lado, de modificar la estructura de las membranas y llevan asociados diversos efectos terapéuticos, siendo, de hecho, par-

ticularmente adecuados para su utilización en las llamadas terapias de lípidos de membrana (MLT) [Escribá 06]. Estas terapias se basan en revertir un estado patológico modificando, precisamente, la estructura de las membranas involucradas, directa o indirectamente, en los procesos fisiológicos responsables de la enfermedad. En este sentido, hemos de recordar que las membranas celulares se encuentran estrechamente relacionadas con infinidad de proteínas, por lo que cambios estructurales en la bicapa pueden alterar un gran número de rutas biológicas. Uno de los ácidos grasos más relevantes es el ácido oleico, que está estrechamente ligado a la renombrada dieta mediterránea y al que se han atribuido importantes efectos beneficiosos en el organismo [Zicha 99, Escribá 03] que se relacionan con la bondades de esta dieta. Recientemente, un derivado sintético del mismo, el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA), ha mostrado una marcada acción anti-hipertensiva [Alemany 04, Alemany 06] y anti-cancerígena [Alemany 04, Martínez 05, Borchert 08]. De hecho, estas prometedoras propiedades terapéuticas han dado lugar a que uno de los principales grupos de investigación en este campo inicie el camino hacia la comercialización del 2OHOA, bajo el nombre de *Minerval*, con el registro de la correspondiente patente [Escriba 02]. En cualquier caso, esta estrategia terapéutica guarda todavía un gran potencial, basado principalmente en la amplia diversidad, de composición y estructura, de las membranas celulares, lo que conlleva, potencialmente, una alta selectividad farmacológica si somos capaces de inducir perturbaciones específicas en membranas con unas características determinadas. Para ello, es necesario mejorar nuestro conocimiento acerca de las interacciones a nivel molecular capaces de alterar la estructura de las membranas y, con ello, la función de las proteínas asociadas a ellas. Buena muestra de este interés es la gran cantidad de trabajos de investigación encaminados a una mejor descripción de estas modificaciones, entre los que cabe destacar la reciente aparición de estudios que abordan el asunto desde un punto de vista computacional [Hyvönen 01, Knecht 06, Notman 07, Wong-ekkabut 07, Peters 09, Leekinjorn 09, Cordomi 10].

Los carotenoides, por otro lado, forman un importante grupo de pigmentos naturales biosintetizados en organismos fotosintéticos, aunque también se encuentran presentes en animales, a los que se incorporan mediante la dieta. Su papel en entornos biológicos viene marcado significativamente por sus propiedades electrónicas y espectroscópicas, y están involucrados tanto en reacciones de intercambio electrónico como en procesos fotoquímicos. En lo que respecta a su presencia en membranas celulares, los carotenoides han mostrado ser eficaces protectores frente a la oxidación peroxidativa de las cadenas lipídicas [McNulty 07], lo que se puede relacionar con su capacidad para desactivar las especies reactivas de oxígeno [Galano 10] poniendo de relieve su importante papel en la prevención de procesos degenerativos en tejidos biológicos.

La acción de los carotenoides se basa en sus propiedades electrónicas, en lugar de la perturbación estructural del medio en la que se basa la acción de los ácidos grasos. La importancia de los mismos trasciende por tanto su papel en biomembranas y, de hecho, estos pigmentos adquieren gran importancia en los organismos fotosintéticos en los que son sintetizados, localizándose en los fotosistemas. En ellos, además de su acción protectora, ante especies reactivas formadas como subproducto de algunas de las reacciones fotoquímicas que tienen lugar, los carotenoides realizan un importante papel de captadores de luz, complementando el rango de longitudes de onda cubierto por los otros pigmentos del fotosistema, las clorofilas.

Las atractivas propiedades electrónicas de los carotenoides tienen su origen, principalmente, en la cadena conjugada que conforma su rasgo estructural más relevante. Por esta razón,

los cambios conformacionales de esta cadena pueden modificar sustancialmente la acción de los carotenoides. En este sentido, el complejo entorno que rodea a estas moléculas tanto en membranas celulares como en fotosistemas, puede llegar a definir las propiedades que acaben mostrando estos pigmentos [Koyama 91], por lo que resulta de gran interés comprender mejor la relación que se establece entre las propiedades antioxidantes y espectroscópicas y la conformación de la cadena conjugada, así como evaluar el grado de perturbación que inducen los distintos medios biológicos sobre la estructura de los pigmentos.

Dadas las importantes implicaciones que tienen los ácidos grasos y los carotenoides en medios biológicos, en esta Tesis nos proponemos caracterizar la acción de estas moléculas con detalle mediante técnicas computacionales. En primer lugar, nos centramos en la presencia de ácidos grasos y carotenoides en membranas celulares, con el fin de dilucidar las propiedades terapéuticas atribuidas a ambas especies. En el caso de los carotenoides, extendemos su estudio a sistemas fotosintéticos donde juegan asimismo una papel muy relevante. En estos sistemas la acción de los carotenoides viene marcada tanto por su carácter antioxidantes como por sus propiedades espectroscópicas, a las que también dedicamos parte de este trabajo.

La presente Tesis se ha estructurado entonces de la siguiente forma. En los capítulos 2 a 4 se describen, en primer lugar, las técnicas computacionales que vamos a emplear a lo largo del trabajo, incluyendo los métodos de la química cuántica, descritos en el Capítulo 2, los cálculos de mecánica molecular y técnicas de simulación, que se repasan en el Capítulo 3, y las herramientas de la espectroscopía computacional, que se introducen en el Capítulo 4. Este arsenal de métodos teóricos nos permite abordar con garantías el estudio de los sistemas biológicos en los que estamos interesados. Así, en el Capítulo 5 se evalúan detenidamente los mecanismos de protección que desempeñan tanto los ácidos grasos como los carotenoides en membranas celulares y, los carotenoides también en fotosistemas. A continuación, en el Capítulo 6 se analizan las propiedades espectroscópicas de los carotenoides, prestando especial atención a la forma espectral de la banda más intensa en los carotenoides, y abordando en profundidad las dificultades computacionales que surgen en la simulación de espectros a temperatura ambiente de moléculas de esta envergadura. En el Capítulo 7 se presentan las conclusiones que se derivan de este trabajo y en el Capítulo 8 se incluye un resumen en inglés de los resultados y conclusiones de esta Tesis, con el fin de cumplir los requisitos para la obtención del Doctorado Internacional.

## CAPÍTULO 2

# Métodos de la Química Cuántica

Para abordar el estudio detallado de las interacciones a nivel microscópico, resulta imprescindible recurrir a la Mecánica Cuántica y, más concretamente, a su aplicación a la química, la Química Cuántica. Por este motivo, en este capítulo repasamos los conceptos básicos de las teorías y métodos de esta disciplina que nos permiten evaluar sistemas moleculares. Comenzamos introduciendo la aproximación de Born-Oppenheimer, punto de partida de los métodos de cálculo electrónico, ya que permite tratar por separado el movimiento de los electrones. A continuación, revisamos las teorías que nos permiten evaluar la estructura electrónica, comenzando con los métodos centrados en la función de onda, entre los que Hartree-Fock ocupa un papel de gran importancia, no solo histórica, sino también práctica, al ser la base de los métodos más avanzados que, básicamente, buscan la introducción de la correlación electrónica en los cálculos. Desafortunadamente, las mejoras en los métodos basados en la función de onda conllevan un gran aumento de la complejidad matemática y computacional, lo que impide su aplicación a sistemas de tamaño medio. En este sentido, los métodos basados en la, más sencilla, densidad electrónica, han supuesto una revolución en la Química Computacional, al permitir introducir gran parte de la correlación interelectrónica a un coste computacional asequible. Sin embargo, la teoría del funcional de la densidad (DFT), que revisamos a continuación, presenta algunas limitaciones asociadas a la imposibilidad de conocer de forma exacta el funcional para la energía, lo que obliga a adoptar expresiones aproximadas. No obstante, se postula como la única alternativa en muchos casos para obtener las propiedades de sistemas de cierta envergadura, tanto en el estado fundamental como en el excitado, estando estos últimos caracterizados mediante los métodos DFT dependientes del tiempo. Por último, tras presentar los distintos métodos disponibles para evaluar la estructura electrónica, analizamos la implementación práctica de los mismos, que ha permitido su inclusión en una gran cantidad de códigos que han acercado las técnicas computacionales a una gran cantidad de químicos, tanto computacionales como experimentales.

## 2.1. MÉTODOS BASADOS EN LA FUNCIÓN DE ONDA

El punto de partida de los métodos mecanocuánticos no relativistas, que son los que vamos a emplear en este trabajo, es la ecuación de Schrödinger introducida en la Ecuación (1.1) que, para sistemas sometidos a un potencial independiente del tiempo (como el que rige en átomos y moléculas no sometidos a campos externos), da como resultado la función de onda estacionaria,  $\Psi(\mathbf{r})$ , y su energía. Esta función de onda proporciona toda la información que es posible conocer acerca del sistema y que, teniendo en cuenta las limitaciones impuestas por el principio de incertidumbre, puede traducirse en valores concretos o, simplemente, en probabilidades de obtener un cierto valor para una propiedad si se realiza la medida de la misma. Por ejemplo, resulta imposible determinar exactamente la posición una partícula y, de hecho, debemos contentarnos con conocer la probabilidad,  $P(\Omega)$ , de que las partículas se encuentren en una región determinada del espacio,  $\Omega$ , que podemos calcular como:

$$P(\Omega) = \int_{\Omega} \Psi^*(\mathbf{r})\Psi(\mathbf{r})d\mathbf{r} \quad (2.1)$$

donde  $\mathbf{r}$  se refiere aquí las coordenadas de todas las partículas del sistema,  $\Psi^*$  es la función conjugada de  $\Psi$  y la integral extendida a todo el volumen, que se relaciona con la probabilidad total, debe ser igual a uno, lo que se conoce como condición de normalización. Podemos interpretar  $|\Psi(\mathbf{r})|^2 = \Psi(\mathbf{r})^*\Psi(\mathbf{r})$  como una densidad de probabilidad, que indica la probabilidad de que cada partícula se encuentre en torno a un volumen infinitesimal alrededor de las coordenadas  $\mathbf{r}$ .

Para aplicar la ecuación de Schrödinger a un sistema molecular, debemos hacer uso del operador Hamiltoniano molecular, introducido en la Ecuación (1.2), que reescribimos a continuación:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{mol} &= -\frac{\hbar^2}{2} \sum_i \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 + \sum_j \sum_{i>j} \frac{e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} - \sum_A \sum_i \frac{Z_A e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|} \\ &\quad -\frac{\hbar^2}{2} \sum_A \frac{1}{m_A} \nabla_A^2 + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B e'^2}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|} \\ &= \hat{T}_{el} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{Ne} + \hat{T}_{nuc} + \hat{V}_{NN} \end{aligned} \quad (2.2)$$

donde hemos introducido los operadores de energía cinética de electrones ( $\hat{T}_{el}$ ) y núcleos ( $\hat{T}_{nuc}$ ) y de energía potencial electrostática entre electrones ( $\hat{V}_{ee}$ ), núcleos ( $\hat{V}_{NN}$ ) y entre electrones y núcleos ( $\hat{V}_{Ne}$ ). El acoplamiento entre pares de electrones o núcleos, al que conducen los términos electrostáticos, es precisamente el que provoca que, excepto en sistemas de dos partículas (por ej., el átomo de hidrógeno), la ecuación anterior no se pueda separar para tratar cada elemento del sistema de forma independiente, lo que impide finalmente su resolución analítica. Antes de continuar, conviene detenernos en los aspectos físicos del sistema y, en concreto, en cómo pueden ayudarnos a simplificar este formidable problema. En este sentido, un hecho a destacar es la gran diferencia de masa entre los núcleos y los electrones que incluso para el núcleo más liviano (el del átomo de hidrógeno), da una relación  $m_N/m_e \approx 1800$ . Como consecuencia de ello, los electrones se moverán mucho más rápido que los núcleos, sometidos, como están ambos, a



fuerzas similares. De acuerdo con esta diferencia de movilidad, resulta razonable considerar que, para cada configuración nuclear, los electrones alcanzan un estado estacionario, lo que permite, en principio, tratar separadamente ambos movimientos.

Los supuestos anteriores constituyen la base de la aproximación de **Born-Oppenheimer**, una de las piedras angulares sobre las que reposan la mayor parte de los métodos la Química Cuántica y que define, concretamente, el marco teórico en el que nos moveremos en esta Tesis. Desarrollando esta aproximación, para cada configuración de núcleos fijos, debemos resolver la correspondiente ecuación de Schrödinger:

$$\hat{H}'_{el}\psi_{el} = E'_{el}\psi_{el} \quad (2.3)$$

donde el Hamiltoniano  $\hat{H}'_{el}$  es similar al Hamiltoniano molecular de la Ecuación (2.2), anulándose el término cinético de los núcleos que ahora consideramos inmóviles. También por esta razón, las coordenadas nucleares no son una variable en la Ecuación (2.3), y las coordenadas electrónicas son las únicas variables de las que depende la función de onda correspondiente:  $\psi_{el}(\mathbf{r})$ . De esta forma, el término  $\hat{V}_{NN}$  actúa únicamente como una constante y, por tanto, no afecta a la forma de la función de onda electrónica y, de hecho, se suele separar del resto de términos que sí dependen de las coordenadas electrónicas y que constituyen en Hamiltoniano electrónico ( $\hat{H}_{el}$ ), es decir:

$$\hat{H}'_{el} = \hat{H}_{el} + V_{NN} \quad (2.4)$$

donde, teniendo en cuenta que el operador  $\hat{V}_{NN}$  es realmente una constante, escribimos:

$$\hat{H}_{el} = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_i \frac{1}{m_i} \nabla_i^2 + \sum_j \sum_{i>j} \frac{e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} - \sum_A \sum_i \frac{Z_A e'^2}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|} \quad (2.5)$$

La resolución de la ecuación de Schrödinger empleando el Hamiltoniano (2.5) da como resultado la energía electrónica,  $E_{el}$ , y una de las áreas más activas de la Química Teórica, se centra precisamente en resolver de la forma más precisa y eficiente esa ecuación. Nótese que la relación entre la energía electrónica y el valor propio de la Ecuación (2.3) es, simplemente,  $E'_{el} = E_{el} + V_{NN}$ .

Hay que destacar que la validez de la aproximación de Born-Oppenheimer se sustenta firmemente en la innegable diferencia de masa entre electrones y núcleos. No obstante, aún resulta necesario abordar una cuestión de envergadura para poder aplicarla de forma efectiva a los problemas químicos, como es averiguar cuál es la relación entre la función de onda electrónica y la función de onda total que es la que realmente contiene toda la información acerca del sistema y determina la energía del mismo.

Aclararemos, en primer lugar, el papel de las coordenadas nucleares en la función de onda electrónica. Como hemos comentado, estas coordenadas no son una variable en la Ecuación (2.3), pero sus valores concretos deben introducirse en cualquier caso a través del término  $\hat{V}_{Ne}$ . Es decir, que para cada conformación molecular tendremos un Hamiltoniano distinto y, por tanto, una función de onda electrónica distinta, con un valor de energía electrónica también distinto, lo

que pone de manifiesto la dependencia de la función y energía electrónicas con la conformación nuclear. Se suele decir que la función de onda electrónica depende paramétricamente de las coordenadas nucleares, refiriéndose así a que cada valor de estas coordenadas da lugar a una función de onda diferente, pero sin que aparezca la variable  $\mathbf{R}$  en la expresión analítica de  $\psi_{el}$ , lo que, simbólicamente, se indica como  $\psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R})$  con el punto y coma indicando que la dependencia es paramétrica. En cualquier caso, al margen de este tecnicismo, el hecho relevante es que tanto la función de onda electrónica como la energía electrónica,  $E_{el}(\mathbf{R})$ , dependen de las coordenadas nucleares. Una vez aclarado este punto, se plantea una expresión para la función de onda molecular como producto de la función de onda electrónica, multiplicada por una función que depende únicamente de las coordenadas nucleares,

$$\Psi_{mol}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = \psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})\psi_{nuc}(\mathbf{R}) \quad (2.6)$$

donde  $\psi_{nuc}$  es la llamada función de onda nuclear. Tratamos entonces de resolver la ecuación de Schrödinger molecular empleando una función de este tipo, lo que conduce a:

$$\begin{aligned} (\hat{T}_{nuc} + \hat{H}_{el} + \hat{V}_{NN})\psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})\psi_{nuc}(\mathbf{R}) = \\ [\hat{T}_{nuc}\psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) + \psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R})\{E_{el}(\mathbf{R}) + V_{NN}(\mathbf{R})\}]\psi_{nuc}(\mathbf{R}) = \psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R})E_{mol}\psi_{nuc}(\mathbf{R}) \end{aligned} \quad (2.7)$$

donde hemos hecho uso de la Ecuación (2.3) y donde hemos tenido en cuenta que  $\psi_{el}$  depende de las coordenadas nucleares y, por tanto, no puede pasar a la izquierda del término  $\hat{T}_{nuc}$  que contiene derivadas respecto a dichas coordenadas. Es en este punto donde se completa la aproximación de Born-Oppenheimer, asumiendo que la función de onda electrónica varía muy suavemente con las coordenadas nucleares, es decir, que  $\psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \approx \psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R} + \Delta\mathbf{R})$ . Con lo que,

$$\hat{T}_{nuc}\psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R})\psi_{nuc}(\mathbf{R}) = \psi_{el}(\mathbf{r}; \mathbf{R})\hat{T}_{nuc}\psi_{nuc}(\mathbf{R}) \quad (2.8)$$

Aplicando esta aproximación en la Ecuación (2.7), la función de onda molecular y la energía total del sistema se obtienen resolviendo la siguiente ecuación de valores propios:

$$[\hat{T}_{nuc} + U(\mathbf{R})]\psi_{nuc}(\mathbf{R}) = E_{mol}\psi_{nuc}(\mathbf{R}) \quad (2.9)$$

donde se ha incluido un término de potencial efectivo,  $U(\mathbf{R})$ , que engloba la energía electrónica y la energía potencial de interacción nuclear, es decir<sup>1</sup>,  $U(\mathbf{R}) = E_{el}(\mathbf{R}) + V_{NN}(\mathbf{R})$ . Podemos considerar, por tanto, que los núcleos están sometidos al potencial,  $U(\mathbf{R})$ , creado por la densidad electrónica, lo que equivale a tratar de forma separada los movimientos nucleares y electrónicos. La aproximación de Born-Oppenheimer plasmada en la Ecuación (2.8) conduce así a la imagen bien establecida de los núcleos moviéndose en una (hiper)superficie de energía potencial, y resulta clave en la mayor parte de las aplicaciones de la química computacional, como el análisis conformacional, el cálculo de interacciones moleculares, la evaluación de la reactividad química o la simulación de la dinámica vibracional. Además, una vez aceptada esta separación, podemos

<sup>1</sup>Nótese que el término  $U(\mathbf{R})$  coincide con  $E'_{el}$  definido anteriormente.

abordar el cálculo del potencial  $U(\mathbf{R})$  empleando el método que mejor se adapte a nuestro problema, lo que engloba tanto los costosos métodos mecanocuánticos como las sencillas expresiones empíricas de la mecánica molecular.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que, a diferencia de la condición de partida apoyada en la diferencia entre las masas del electrón y el núcleo, la Ecuación (2.8), basada en la casi independencia de la función de onda electrónica de las coordenadas nucleares, no es universalmente válida. En los casos en los que no se cumple, la función de onda molecular se puede representar como una superposición de las distintas funciones propias del Hamiltoniano electrónico, lo que da lugar a acoplamientos no-adiabáticos entre distintos estados electrónicos que permiten la transferencia de población entre ellos. En general, se encuentra que estos acoplamientos no-adiabáticos son relevantes, por ejemplo, cuando los distintos valores propios asociados al Hamiltoniano electrónico se encuentren próximos en energía, siendo en este caso responsables de los procesos de desactivación no radiativos. Afortunadamente, para los sistemas en el estado fundamental (y muchos excitados), en torno a las estructuras de equilibrio, que es una de las situaciones más comunes en los estudios de sistemas químicos, la aproximación de Born-Oppenheimer es válida y podemos olvidarnos de los complejos acoplamientos no-adiabáticos. De hecho, en esta tesis, todos los cálculos se han realizado para sistemas en los que se cumple la condición (2.8), por lo que la resolución de la Ecuación (2.3) es el principal problema en el que debemos centrarnos, y al que dedicamos los siguientes apartados.

### 2.1.1. Métodos aproximados para resolver la ecuación de Schrödinger electrónica

El término de interacción interelectrónica,  $\hat{V}_{ee}$ , que aparece en la ecuación de Schrödinger electrónica (2.3) no permite la separación de los distintos electrones, lo que impide la resolución analítica exacta de esta ecuación, siendo necesario, por tanto, recurrir a métodos aproximados. En este sentido, podemos destacar los dos grandes grupos de métodos aproximados que hay disponibles para la resolución de problemas mecanocuánticos: el **método de variaciones** y la **teoría de perturbaciones**. El primero de ellos se basa en el cálculo de la energía (aproximada) dada una función de prueba,  $\phi$ , mediante la expresión:

$$E^0 = \frac{\langle \phi | \hat{H} | \phi \rangle}{\langle \phi | \phi \rangle} \geq E_{exacta} \quad (2.10)$$

donde  $E^0$  y  $E_{exacta}$  son las energías electrónicas aproximada y exacta. Nótese que, por simplicidad, omitimos el subíndice 'el' para la función de onda, el Hamiltoniano y la energía electrónicas. Empleamos además la notación *braket* introducida por Dirac para representar las integrales en todo el dominio espacial ( $\tau$ ), siendo  $\langle \phi | \hat{H} | \phi \rangle = \int_{\tau} \phi^* \hat{H} \phi d\mathbf{r}$ . Por último,  $\langle \phi | \phi \rangle$  es el factor de normalización, que se iguala a uno si la función de prueba está normalizada.

Como podemos observar en la Ecuación (2.10), el método de variaciones no solo nos ofrece un valor aproximado de la energía del sistema correspondiente a la función de prueba empleada, sino que nos indica que el valor obtenido se encuentra siempre por encima del valor exacto, y solo coincide con este último cuando se utiliza como función de prueba la función de onda exacta. Esto proporciona una valiosa herramienta para encontrar, de forma sistemática, soluciones

aproximadas mejoradas de la Ecuación (2.3). La estrategia más habitual consiste en introducir parámetros en la función de prueba de forma que, minimizando la energía respecto dichos parámetros, consigamos una energía menor y, por tanto, una mejor aproximación a la función de onda.

Por otro lado, la teoría de perturbaciones se basa en definir un modelo simplificado del sistema para el que sea posible resolver de forma exacta la ecuación de Schrödinger correspondiente. Escribimos entonces,

$$\hat{H}^{(0)}\psi^{(0)} = E^{(0)}\psi^{(0)} \quad (2.11)$$

donde  $\hat{H}^{(0)}$ ,  $\psi^{(0)}$  y  $E^{(0)}$  son el Hamiltoniano, la función de onda y la energía de orden cero, es decir, las correspondientes al sistema simplificado.

El Hamiltoniano exacto del sistema se define entonces como  $\hat{H} = \hat{H}^{(0)} + \hat{H}'$ , donde  $\hat{H}'$  es precisamente la diferencia entre el Hamiltoniano exacto y el aproximado. La función de onda y la energía se expresan como una sucesión de términos que representan las correcciones de orden creciente:

$$\psi = \psi^{(0)} + \psi^{(1)} + \psi^{(2)} + \psi^{(3)} \dots \quad (2.12a)$$

$$E = E^{(0)} + E^{(1)} + E^{(2)} + E^{(3)} \dots \quad (2.12b)$$

donde  $\psi^{(i)}$  y  $E^{(i)}$  son las aproximaciones de  $i$ -ésimo orden a la función de onda y la energía.

La teoría de perturbaciones proporciona las expresiones para las correcciones de orden sucesivo, que dependen de los términos de orden inferior, de forma que el coste aumenta con cada orden adicional que se incluye en el cálculo. Este método puede resultar útil para resolver problemas en los que sepamos resolver sistemas simplificados similares, siendo necesario que el término de corrección  $\hat{H}'$  sea suficientemente pequeño en comparación con  $\hat{H}^{(0)}$ . Además, la energía obtenida de esta forma no cumple ningún requisito, como sí ocurre con la teoría de variaciones, de forma que su valor puede estar tanto por encima como por debajo de la energía exacta, y no hay manera de averiguar si un valor dado de la misma está más cerca que otro del resultado exacto.

Estos dos enfoques pueden ser utilizados para resolver de forma aproximada la Ecuación de Schrödinger electrónica (2.3). Para ello resulta útil establecer, en primer lugar, un modelo que permita posteriormente desarrollar cada método de forma concreta. En este sentido resultan de gran relevancia los modelos de electrones independientes, es decir, aquellos en los que no aparezcan interacciones que dependan de la posición relativa de pares de electrones, de forma que el problema sea separable, y cuyo Hamiltoniano se puede escribir como sigue:

$$\hat{H}_{indep} = \sum_i \hat{T}_i + \sum_i \sum_A \hat{V}_{iA}^{Ne} + \sum_i \hat{V}_i' \quad (2.13)$$

donde  $\hat{T}_i$  es el operador energía cinética del electrón  $i$ ,  $\hat{V}_{iA}^{Ne}$  es el potencial de interacción entre el electrón  $i$  y el núcleo (fijo)  $A$ , y el último sumatorio introduce potenciales adicionales que

solo dependen de las coordenadas de un electrón,  $i$  con el que podremos tratar de incorporar de forma aproximada el efecto del potencial interelectrónico.

Para este tipo de sistemas, la función de onda global,  $\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2 \dots \mathbf{r}_n)$ , puede expresarse, en principio, como el producto de funciones monoeléctricas,  $\phi_i(\mathbf{r}_i)$ , es decir,

$$\psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2 \dots \mathbf{r}_n) = \phi_1(\mathbf{r}_1)\phi_2(\mathbf{r}_2) \dots \phi_n(\mathbf{r}_n) \quad (2.14)$$

donde cada una de los orbitales se obtiene de resolver la correspondiente ecuación monoeléctrica:

$$\left[ \hat{T}_i + \sum_A \hat{V}_{iA}^{Ne} + \hat{V}'_i \right] \phi_i = \epsilon_i \phi_i \quad (2.15)$$

La función (2.14), se conoce como producto de Hartree, en honor al científico Douglas Hartree, pionero en los estudios variacionales basados en la función de onda (2.14), y las funciones monoeléctricas que describen el cada electrón independientemente,  $\phi_i(\mathbf{r}_i)$ , son los orbitales espaciales. Sin embargo, esta función no es válida para la descripción de un sistema formado de electrones, pese a cumplir los requisitos matemáticos impuestos por la Ecuación (2.3). El problema está en la omisión de una propiedad física, **el espín** ( $s$ ), con las coordenadas adicionales asociadas al mismo, que aparecen en las partículas subatómicas, y las restricciones que imponen en las funciones de onda mecanocuánticas. Para entender esta deficiencia debemos primero de recordar las limitaciones de nuestro Hamiltoniano molecular en el que, como hemos dicho ignoramos los efectos relativistas, que están precisamente en el origen del espín. Aún así, es posible introducir este efecto físico *ad hoc*, sin tener que recurrir a la compleja formulación relativista de la Ecuación (1.1), simplemente postulando la existencia de esta propiedad y añadiendo la dependencia de las coordenadas de espín a la función de onda,  $\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{w}_s)$ . En la práctica, en un modelo de electrones independientes, se añade el espín como una función multiplicativa junto a cada orbital espacial,  $\chi(\mathbf{r}, \mathbf{w}_s) = \phi(\mathbf{r})\omega(\mathbf{w}_s)$ , donde  $\omega$  es la función de espín,  $\mathbf{w}_s = \{w_{s1}, w_{s2}, \dots, w_{sn}\}$  es la coordenada de espín de cada electrón y  $\chi(\mathbf{r}, \mathbf{w}_s)$ , son los denominados espín-orbitales. Se encuentra además que el espín solo puede adoptar valores enteros o semi-enteros, dependiendo del tipo de partícula, que para electrones resulta ser  $\frac{1}{2}$ , el mismo que para protones y neutrones. Las partículas con espín semi-entero se denominan fermiones, y las de valor entero son bosones.

Como hemos apuntado, la existencia del espín invalida la función (2.14) para describir un sistema de electrones. El origen de este hecho se encuentra en el **Principio de Pauli** que, a su vez se basa en la indistinguibilidad de las partículas mecanocuánticas que resulta del principio de incertidumbre de Heissenberg. La introducción en la función de onda de la indistinguibilidad de dos partículas se concreta en la condición de que la función de onda solo puede quedar inalterada (función simétrica) o cambiar de signo (función antisimétrica) cuando se intercambian dos electrones. En particular, la función de onda de bosones debe quedar inalterada y la de fermiones debe cambiar de signo. Este es, de hecho, el Principio de Pauli, que para los electrones se puede reescribir como: *la función de onda de una sistema de electrones debe ser antisimétrica con respecto al intercambio de dos electrones cualesquiera* [Levine 01]. Se puede comprobar que, efectivamente, la función (2.14) no cumple esta condición y no es por tanto válida. Para obtener

una función de onda en términos de las funciones de cada partícula, como la (2.14), pero que cumpla el principio de Pauli, John Slater propuso en 1929 emplear como función un determinante de la forma [Slater 29]:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2 \dots \mathbf{x}_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\mathbf{x}_1) & \chi_2(\mathbf{x}_1) & \dots & \chi_n(\mathbf{x}_1) \\ \chi_1(\mathbf{x}_2) & \chi_2(\mathbf{x}_2) & \dots & \chi_n(\mathbf{x}_2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \chi_1(\mathbf{x}_n) & \chi_2(\mathbf{x}_n) & \dots & \chi_n(\mathbf{x}_n) \end{vmatrix} = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_n\rangle \quad (2.16)$$

donde  $\mathbf{x}_i$  incluye las tres coordenadas espaciales y la coordenada de espín del electrón  $i$  y  $\frac{1}{\sqrt{n!}}$  es una constante de normalización. La última expresión es una manera simplificada de representar el determinante.

Empleando las propiedades de los determinantes, es sencillo comprobar que la función definida en (2.16) cumple el principio de Pauli, derivándose además otras condiciones interesantes. Concretamente, si igualamos las coordenadas de cualesquiera dos electrones,  $\mathbf{x}_i = \mathbf{x}_j$ , el determinante se anula, de modo que la probabilidad  $P(\Omega)$ , expresada en la Ecuación (2.1), es igual a cero, lo que indica que dos electrones no pueden ocupar las mismas coordenadas espaciales y de espín. El mismo efecto se produce si elegimos el mismo espín-orbital para definir a dos electrones del sistema, lo que pone de manifiesto que dos electrones no pueden ocupar el mismo espín-orbital, que es el conocido principio de exclusión de Pauli. Teniendo en cuenta que para los electrones solo son posibles dos funciones de espín distintas,  $\alpha(w)$  y  $\beta(w)$ , podemos tener, como máximo, dos electrones ocupando el mismo orbital espacial, dando lugar a dos espín-orbitales distintos:  $\psi_i(\mathbf{r})\alpha(w)$  y  $\psi_i(\mathbf{r})\beta(w)$ .

Ya que es posible elegir en principio el término  $\hat{V}'_i$  de la Ecuación (2.13), de forma que el Hamiltoniano se aproxime en la mayor medida posible, parece razonable suponer que los modelos de electrones independientes que acabamos de introducir, y en concreto la función de onda (2.16), sea capaz de describir acertadamente las características generales del sistema real. De esta forma, se puede obtener una aproximación a la energía exacta con el método de variaciones, empleando este tipo de funciones, tras elegir un  $\hat{V}'_i$  adecuado y resolver la ecuación de Schrödinger con el Hamiltoniano aproximado (2.13). Una estrategia entonces para mejorar la función de onda aproximada, y por tanto la energía, es modificando el término  $\hat{V}'_i$ , por ejemplo, mediante argumentos físicos, de forma que describa de la mejor forma posible el término interelectrónico real. Por otro lado, podemos emplear las propiedades del método variacional para averiguar qué función de onda del tipo (2.16) conduce a la mejor energía, minimizando la integral variacional (2.10) variando la forma de los espín-orbitales. En la siguiente sección mostramos cómo estos dos caminos conducen precisamente a la mejor función de onda separable, es decir, dentro del modelo de electrones independientes, lo que constituye el llamado método de Hartree-Fock.

### 2.1.2. Método de Hartree-Fock

En 1928, Hartree estableció, usando razonamientos físicos intuitivos, la forma que deben tener los términos  $\hat{V}'_i$  del Hamiltoniano (2.13) para describir de la mejor forma posible la repulsión

interelectrónica mediante términos monoeléctricos [Hartree 28a, Hartree 28b, Hartree 28c]. Concretamente, encontró que la forma más adecuada de dar cuenta de la interacción entre electrones con un modelo de electrones independientes consiste en calcular, para un electrón  $i$ , la interacción con la densidad electrónica del resto de electrones  $j$ , que viene dada por el cuadrado del espín-orbital que ocupen, lo que proporciona el potencial de Hartree,  $v^H$ , que tiene la forma:

$$\hat{V}'_i = v^H = \sum_{j \neq i}^n e'^2 \int \frac{|\chi_j(\mathbf{x}_j)|^2}{r_{ij}} d\mathbf{x}_j \quad (2.17)$$

Se trata por tanto de una interacción promedio entre el electrón  $i$ , en el espín-orbital  $\chi_i$ , y la densidad electrónica generada por cada uno de los restantes electrones, que se encuentran en sus respectivos orbitales. Cada término se puede relacionar con la energía electrostática clásica entre el electrón  $i$  con una distribución homogénea de carga, que se suele denominar operador de Coulomb,  $\hat{J}_j$ . Existe, sin embargo, un error en el planteamiento original de Hartree, ya que supone distinguir los electrones que ocupan orbitales concretos, violando así el principio de Pauli, al recurrir a un producto de Hartree (2.14) como función de onda. Introduciendo la condición de antisimetría de la función de onda, el potencial  $\hat{V}'_i$ , que se denomina ahora potencial de Hartree-Fock,  $v^{HF}$ , queda entonces como:

$$\hat{V}'_i = v^{HF} = \sum_{j \neq i}^n e'^2 \int \frac{|\chi_j(\mathbf{x}_j)|^2}{r_{12}} d\mathbf{x}_2 - \sum_{j \neq i}^n e'^2 \int \frac{\chi_j^*(\mathbf{x}_2)}{r_{12}} d\mathbf{x}_2 \hat{P}_{12} \chi_j(\mathbf{x}_2) = \sum_j (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \quad (2.18)$$

donde hemos empleado los índices 1 y 2 para referirnos a las coordenadas electrónicas, e  $i$  y  $j$  para referirnos a los espín-orbitales, dejando claro que, dada su indistinguibilidad, los electrones no están ligados a un orbital concreto, y hemos introducido el operador de Coulomb,  $\hat{J}_j$  y el de intercambio,  $\hat{K}_j$ . Para definir este último hemos usado el operador  $\hat{P}_{12}$  que se encarga de intercambiar los electrones 1 y 2, de forma que:

$$\left[ \int \frac{\chi_j^*(\mathbf{x}_2)}{r_{12}} d\mathbf{x}_2 \hat{P}_{12} \chi_j(\mathbf{x}_2) \right] \chi_i(\mathbf{x}_1) = \left[ \int \frac{\chi_j^*(\mathbf{x}_2)}{r_{12}} d\mathbf{x}_2 \chi_i(\mathbf{x}_2) \right] \chi_j(\mathbf{x}_1) \quad (2.19)$$

donde, por simplicidad, hemos pasado a describir las ecuaciones en unidades atómicas, en las que  $e' = 1$ ,  $\hbar = 1$  y  $m_e = 1$ . El término entre corchetes es el operador de intercambio,  $\hat{K}_j$  que, al contrario del operador de Coulomb, no tiene un análogo clásico ya que emana del efecto puramente cuántico que surge como resultado de la indistinguibilidad de los electrones.

La ecuación monoeléctrica (2.15) que proporciona cada espín-orbital es entonces:

$$\left[ \hat{h}_i + \sum_j (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \right] \chi_i = \epsilon_i \chi_i \quad (2.20)$$

donde hemos introducido el operador monoeléctrico,  $\hat{h}_i$ , que depende únicamente del electrón  $i$ , como:

$$\hat{h}_i = \hat{T}_i + \sum_A \hat{V}_{iA}^{Ne} = -\frac{1}{2} \frac{1}{\nabla_1^2} - \sum_A \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{R}_A|} \quad (2.21)$$

Uno de los aspectos más destacables de la Ecuación (2.20) es que, para calcular un espín-orbital, necesitamos todos los demás (incluidos en  $\hat{J}_j$  y  $\hat{K}_j$ ), lo que obliga a abordar este problema de forma iterativa dando lugar a la denominación de método del **campo auto-consistente**. Así, introduciendo unos orbitales de partida, calculados por ejemplo empleando el modelo de electrones no interactuantes ( $\hat{V}_i' = 0$ ), tras varios ciclos de iteración obtendremos los espín-orbitales que dan lugar a la función de onda del tipo determinante de Slater (2.16). La energía del sistema real se aproxima entonces mediante:

$$E^{HF} = \langle \chi_1 \chi_2 \dots \chi_n | \hat{H} | \chi_1 \chi_2 \dots \chi_n \rangle \quad (2.22)$$

donde hemos hecho uso de la representación simplificada del determinante indicada en (2.16).

La demostración de que los espín-orbitales resultantes de la Ecuación (2.20) proporcionan, efectivamente, la mejor función de onda separable fue dada por Vladimir Fock en 1930 [Fock 30]. Concretamente, para una función de onda tipo determinante de Slater, la minimización de la integral variacional en función de los orbitales, con la restricción de que estos últimos sean ortonormales ( $\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij}$ ), se puede llevar a cabo mediante el método de los multiplicadores de Lagrange [Szabo 96], y conduce precisamente a que los orbitales que minimizan esta energía son los resultantes de la Ecuación (2.20), que puede escribirse de forma más compacta cómo sigue:

$$\hat{f}_i \chi_i(\mathbf{x}_1) = \epsilon_i \chi_i(\mathbf{x}_1) \quad (2.23)$$

donde  $\hat{f}_i$  es el llamado operador de Fock, que representa el término entre corchetes en la Ecuación (2.20). Esta es una ecuación de valores propios cuyo valor propio,  $\epsilon_i$ , puede interpretarse como la energía del orbital  $i$ , de forma que el determinante estará formado por los orbitales de menor energía. Por su parte, la energía aproximada del sistema real, calculada resolviendo la integral (2.24) resulta ser:

$$E^{HF} = \sum_i \epsilon_i - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \left( \langle \chi_i | \hat{J}_j | \chi_i \rangle - \langle \chi_i | \hat{K}_j | \chi_i \rangle \right) \quad (2.24)$$

Podemos concretar algo más la forma de los espín orbitales teniendo en cuenta que pueden expresarse como el producto de un orbital espacial,  $\psi_i(\mathbf{r})$ , por una de las dos funciones de espín posibles,  $\alpha(w)$  o  $\beta(w)$ . Si suponemos además que dos espín-orbitales con diferente función de espín comparten el mismo orbital espacial, estos vendrán dados por,

$$\chi_1 = \psi_1 \alpha; \quad \chi_2 = \psi_1 \beta; \quad \dots \quad \chi_{n-1} = \psi_{\frac{n}{2}} \alpha \quad \chi_n = \psi_{\frac{n}{2}} \beta \quad (2.25)$$

Esta formulación se conoce como método de **Hartree-Fock restringido** (*Restricted Hartree-Fock*, RHF), ya que se impone el uso del mismo orbital espacial para cada función de espín. El determinante correspondiente se expresa como:



$$\Psi^{RHF}(\mathbf{x}) = |\psi_1 \bar{\psi}_1 \dots \psi_{\frac{n}{2}} \bar{\psi}_{\frac{n}{2}}\rangle \quad (2.26)$$

donde, por simplicidad, definimos  $\psi_i = \psi_i(\mathbf{r})\alpha(w)$  y  $\bar{\psi}_i = \psi_i(\mathbf{r})\beta(w)$

Si desarrollamos la ecuación de Hartree-Fock (2.20) introduciendo espín-orbitales restringidos e integrando las coordenadas de espín, se llega a una ecuación para los orbitales espaciales. Teniendo en cuenta que las dos funciones de espín,  $\alpha$  y  $\beta$  son ortogonales, es decir que  $\langle \alpha | \beta \rangle = 0$  y  $\langle \alpha | \alpha \rangle = \langle \beta | \beta \rangle = 1$ , obtenemos concretamente:

$$\left[ \hat{h}_i + \sum_j \frac{n/2}{j} (2\hat{J}'_j - \hat{K}'_j) \right] \psi_i(\mathbf{r}_1) = \epsilon_i \psi_i(\mathbf{r}_1) \quad (2.27)$$

donde  $\hat{J}'_j$  y  $\hat{K}'_j$  son los operadores de Coulomb e intercambio en función de orbitales espaciales:

$$\hat{J}'_j = \int \frac{|\psi_j(\mathbf{r}_2)|^2}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 \quad (2.28a)$$

$$\hat{K}'_j = \int \frac{\psi_j^*(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_2 \hat{P}_{12} \psi_j(\mathbf{r}_2) \quad (2.28b)$$

La energía electrónica aproximada con esta función es:

$$E^{RHF} = \sum_i \epsilon_i - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \frac{n/2}{j} \left( 2\langle \psi_i | \hat{J}'_j | \psi_i \rangle - \langle \psi_i | \hat{K}'_j | \psi_i \rangle \right) \quad (2.29)$$

El modelo restringido da lugar a la mejor función de onda HF para sistemas de capa cerrada, es decir, aquellos en los que todos los electrones están apareados (cada orbital contiene un electrón con espín  $\alpha$  y otro con espín  $\beta$ ). Para sistemas de capa abierta, que contienen uno o más electrones desapareados, o en sistemas muy alejados de su posición de equilibrio, como en el estudio de la disociación de enlaces, la solución restringida no es, sin embargo, la de menor energía. En estos casos, la densidad de espín de los electrones desapareados conduce a una interacción diferenciada con el resto electrones que posean el mismo espín, a través del término de intercambio. Parece razonable asumir entonces que en estos casos los orbitales espaciales asociados a los electrones  $\alpha$  y  $\beta$  sean distintos,

$$\chi_1 = \psi_1^\alpha \alpha; \quad \chi_2 = \psi_1^\beta \beta; \quad \dots \quad \chi_i = \psi_{n_\alpha}^\alpha \alpha; \quad \chi_j = \psi_{n_\beta}^\beta \beta \quad (2.30)$$

lo que da lugar a la función de onda **Hartree-Fock no restringida** (*Unrestricted Hartree-Fock*, UHF),

$$\Psi^{UHF}(\mathbf{x}) = |\psi_1^\alpha \bar{\psi}_1^\beta \dots \psi_{n_\alpha}^\alpha \bar{\psi}_{n_\beta}^\beta\rangle \quad (2.31)$$

Una vez integradas las coordenadas de espín, como se hace para el modelo RHF, se llega a expresiones que dependen de las coordenada espaciales, que en este caso se separan en función de su espín,

$$\left[ \hat{h}^{\alpha}_i + \sum_j^{n_{\alpha}} (2\hat{J}^{\alpha'}_j - \hat{K}^{\alpha'}_j) \right] \psi_i^{\alpha}(\mathbf{r}_1) = \epsilon_i^{\alpha} \psi_i^{\alpha}(\mathbf{r}_1) \quad (2.32a)$$

$$\left[ \hat{h}^{\beta}_i + \sum_j^{n_{\beta}} (2\hat{J}^{\beta'}_j - \hat{K}^{\beta'}_j) \right] \psi_i^{\beta}(\mathbf{r}_1) = \epsilon_i^{\beta} \psi_i^{\beta}(\mathbf{r}_1) \quad (2.32b)$$

donde los  $\hat{J}^{\alpha'}_j$ ,  $\hat{K}^{\alpha'}_j$ ,  $\hat{J}^{\beta'}_j$  y  $\hat{K}^{\beta'}_j$  son los operadores de Coulomb e intercambio en función de orbitales espaciales para los electrones  $\alpha$  y  $\beta$ , que se definen de forma similar a (2.28a) y (2.28b).

En los casos en los que la función de onda restringida proporciona la menor energía, el modelo UHF proporciona la misma solución. Sin embargo, en los sistemas de capa abierta, la función UHF da una energía menor que la RHF. Desafortunadamente, mientras que las funciones restringidas tienen un espín definido (al igual que la función exacta), las funciones no restringidas no son funciones propias del operador de espín electrónico y, por tanto, no poseen un valor definido de esta propiedad. Debemos contentarnos con su valor promedio o esperado, dado por,

$$\langle S \rangle = \langle \psi^{UHF} | \hat{S} | \psi^{UHF} \rangle \quad (2.33)$$

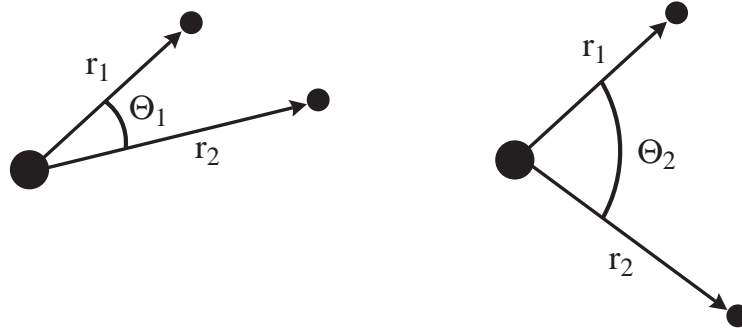
que se encuentra por encima del valor del espín de la función restringida más cercana, lo que indica la incorporación de términos de espín más elevados a la función de onda UHF, un efecto que se conoce como contaminación de espín. Esto supone un problema del método UHF, que limita la calidad de los resultados, resultando necesario indicar cuál es el valor  $\langle S \rangle$ , y compararlo con el valor de espín de la función no restringida análoga para determinar la fiabilidad del cálculo.

### 2.1.3. Correlación electrónica y métodos post-Hartree-Fock

El modelo de Hartree-Fock contiene la interacción interelectrónica solo de forma promedio, es decir, cada electrón no *ve* al resto de electrones individualmente, sino la distribución de carga asociada a la densidad electrónica de cada uno. Como consecuencia, la función de onda electrónica aproximada proporcionada por este modelo da lugar a una descripción en la que los movimientos de los electrones no están correlacionados. Tomemos, por ejemplo, un sistema con dos electrones moviéndose en torno al núcleo. Suponiendo que tienen espín opuesto, la función de onda de Hartree-Fock se puede expresar como:

$$\Phi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = |\psi_a \bar{\psi}_b\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} (\psi_a(\mathbf{r}_1)\alpha(w_1)\psi_b(\mathbf{r}_2)\beta(w_2) - \psi_a(\mathbf{r}_2)\alpha(w_2)\psi_b(\mathbf{r}_1)\beta(w_1)) \quad (2.34)$$

Para averiguar la probabilidad de encontrar el electrón 1 en un volumen infinitesimal en torno a la posición  $\mathbf{r}_1$  y el electrón 2 en un volumen infinitesimal en torno a la posición  $\mathbf{r}_2$ ,  $P(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ , debemos integrar sobre las coordenada de espín,



**Figura 2.1** – Dos posibles configuraciones de un sistema de dos electrones (círculos pequeños en torno a un núcleo (círculo grande). Tomada de [Cerón-Carrasco 09b].

$$P(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \int \int |\Phi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2)|^2 dw_1 dw_2 = \frac{1}{2} (|\psi_a(\mathbf{r}_1)|^2 |\psi_b(\mathbf{r}_2)|^2 + |\psi_a(\mathbf{r}_2)|^2 |\psi_b(\mathbf{r}_1)|^2) \quad (2.35)$$

donde hemos tenido en cuenta la ortogonalidad de las funciones de espín. Como podemos ver, la probabilidad total es el producto de la probabilidad de encontrar a cada electrón<sup>2</sup>, lo que indica que se trata de situaciones independientes, no correlacionadas.

Supongamos ahora que las probabilidades  $|\psi_a(\mathbf{r})|$  y  $|\psi_b(\mathbf{r})|$  dependen únicamente de la distancia de los electrones al núcleo (esto es lo que ocurre para los orbitales tipo  $s$ ). En ese caso, las dos conformaciones mostradas en la Figura 2.1 son igualmente probables, de acuerdo con el modelo de Hartree-Fock, a pesar de que la distancia entre los dos electrones es distinta en cada caso. Se comprueba, además, como la probabilidad de encontrar los dos electrones en la misma posición es distinta de cero. Estos hechos ponen de manifiesto que hay una grave deficiencia en el modelo, ya que no es capaz de dar cuenta de la **correlación electrónica** de origen electrostático, que impide que dos electrones se acerquen demasiado.

Hay que tener en cuenta, sin embargo, que la función de onda de Hartree-Fock sí que contiene, de forma exacta, la correlación producida por la interacción de intercambio (asociada al operador  $\hat{K}_j$ ), que mantiene separados dos electrones del mismo espín. Concretamente, si los dos electrones del sistema anterior tienen el mismo espín, la función de onda viene dada por:

$$\Phi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = |\psi_a \psi_b\rangle = \frac{1}{\sqrt{2}} (\psi_a(\mathbf{r}_1) \psi_b(\mathbf{r}_2) - \psi_a(\mathbf{r}_2) \psi_b(\mathbf{r}_1)) \alpha(w_1) \alpha(w_2) \quad (2.36)$$

y ahora la probabilidad  $P(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$  es,

$$P(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2) = \frac{1}{2} [|\psi_a(\mathbf{r}_1)|^2 |\psi_b(\mathbf{r}_2)|^2 + |\psi_a(\mathbf{r}_2)|^2 |\psi_b(\mathbf{r}_1)|^2 - (\psi_a^*(\mathbf{r}_1) \psi_b(\mathbf{r}_1) \psi_b^*(\mathbf{r}_2) \psi_a(\mathbf{r}_2) + \psi_b^*(\mathbf{r}_1) \psi_a(\mathbf{r}_1) \psi_a^*(\mathbf{r}_2) \psi_b(\mathbf{r}_2))] \quad (2.37)$$

<sup>2</sup>Nótese que es el promedio de las dos situaciones posibles dada la indistinguibilidad de las partículas

donde el último término reduce la probabilidad de encontrar cerca dos electrones con el mismo espín, anulándola cuando ocupan la misma posición.

Cabe destacar también la distinción que se realiza entre dos tipos de correlación electrónica. Tenemos, por un lado, la correlación dinámica, que es la que se debe puramente al término de repulsión electrostática y hemos descrito más arriba, y por otro lado, la correlación estática, que se produce por la interacción y mezcla de estados energéticos que caen cerca en energía. Parte de este segundo tipo de correlación está incluida en la función de onda UHF, mientras que la función RHF no contiene ninguno de los dos tipos de correlación.

Pese a incluir el efecto de intercambio, la ausencia de correlación electrostática tiene como resultado que la energía de Hartree-Fock se desvíe apreciablemente de la energía exacta. Se define en concreto la energía de correlación como la diferencia entre la energía exacta y la de Hartree-Fock,

$$E_{corr} = E_{exacta} - E_{HF} \quad (2.38)$$

y, de acuerdo con teoría de variaciones, esta energía es siempre positiva. El valor relativo de este error se encuentra típicamente en torno al 0.5%, y pese a que parece pequeño, no es asumible para aplicaciones químicas. Por ejemplo, la energía total de un átomo de carbono es de unos 1000 eV, con lo que la energía de correlación es de unos 5 eV, que es del orden de las energías de enlace, lo que impide calcular energías de enlace fiables como diferencias entre las energías atómicas y moleculares. Es necesario, por tanto, disponer de métodos que vayan más allá del modelo de electrones independientes, para los que emplearemos las teorías variacional y de perturbaciones que hemos presentado anteriormente.

En el caso del método de variaciones, se puede mejorar la descripción del sistema usando como función de prueba una combinación lineal de determinantes de Slater. Para construirlos, se pueden emplear los espín-orbitales calculados con la ecuación de Hartree-Fock (2.23), incluyendo no solo los  $n$  orbitales de menor energía que dan lugar a la función de Hartree-Fock (HF), sino también orbitales más energéticos, que dan lugar a configuraciones excitadas por intercambio de alguno de los determinantes de la función HF de referencia. Así, si se intercambia un orbital de referencia por orbitales se forman configuraciones monoexcitadas (*Singles*, S), si se intercambian dos, se forman configuraciones doblemente excitadas (D), y así sucesivamente, de modo que escribimos:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_n) = \psi^{HF} + \sum_a \sum_{i>n} c_a^i \psi_{a \rightarrow i}^{(S)} + \sum_{a,b} \sum_{i,j>n} c_{a,b}^{i,j} \psi_{a,b \rightarrow i,j}^{(D)} + \dots \quad (2.39)$$

donde los  $a$  y  $b$  denotan orbitales de la función HF de referencia, los índices  $i$  y  $j$  denotan orbitales excitados, y  $a \rightarrow i$  indica el intercambio del orbital  $\chi_a$  por el orbital  $\chi_i$ . Los coeficientes de la combinación,  $c_a^i$ ,  $c_{a,b}^{i,j}$ , ..., son los que minimizan la energía variacional.

Es importante resaltar que la función  $\psi^{HF}$  junto con todas las configuraciones excitadas forman un conjunto completo, lo que permite escribir cualquier otra función, incluyendo la solución exacta del Hamiltoniano molecular, como combinación lineal de todos estos determinantes de

Slater. Así, en el límite que incluye todas las excitaciones, la expresión (2.39) proporciona la función de onda exacta, lo que ofrece una manera sistemática de mejorar las aproximaciones a la función de onda y la energía. La optimización variacional de la función de onda (2.39) da lugar al método de **interacción de configuraciones** (CI). Este método implica operaciones con determinantes de dimensión igual al número de términos de la expansión. Obviamente, el conjunto de todas las excitaciones es infinito, y aunque se limiten los espín-orbitales excitados empleados y se trunque el orden de la excitación<sup>3</sup>, el número de configuraciones que se obtienen aumenta enormemente con el tamaño del sistema, lo que impide la aplicación práctica de este tipo de soluciones, excepto para sistemas de tamaño reducido. Algunas alternativas a este método incluyen modificaciones en la selección de excitaciones, como el método de **clústeres acoplados** (CC) que asegura, incluso en sus versiones truncadas, que el método sea consistente en tamaño<sup>4</sup> o la optimización de los espín-orbitales para cada configuración considerada, lo que da lugar a los **métodos multireferenciales** (MR), que son de especial importancia cuando más de una configuración es relevante en la descripción del estado considerado. En cualquier caso, el gran tamaño de los sistemas mecanocuánticos en los que estamos interesados en esta Tesis, formado por alrededor de una centena de átomos, impide la aplicación de estos métodos.

Por su parte, el método perturbativo molecular introducido por Møller y Plesset en 1934 [Møller 34], toma como Hamiltoniano de referencia el formado por los operadores de Fock para todos los electrones del sistema,

$$\hat{H}^0 = \sum_i^n \hat{f}_i = \sum_i h_i + \sum_i^n \sum_j^n (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \quad (2.40)$$

con lo que el término perturbativo es la diferencia entre el potencial electrostática exacto y el potencial de Hartree-Fock,

$$\hat{H}' = \sum_i^n \sum_j^n v_{i,j}^{ee} - \sum_i^n v_i^{HF} = \sum_i^n \sum_j^n \frac{1}{r_{ij}} - \sum_i^n \sum_j^n (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \quad (2.41)$$

La función de onda de orden cero, o función propia del operador  $\hat{H}^0$ , es precisamente la función de onda Hartree-Fock,

$$\psi^{(0)} = \psi^{HF} = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_n\rangle \quad (2.42)$$

y la energía de orden cero es la suma de las energías orbitales,

$$E^{(0)} = \sum_i^n \epsilon_i \quad (2.43)$$

que, sin embargo, no es igual a la energía HF que se muestra en la Ecuación (2.24)

<sup>3</sup>Lo que da lugar a los métodos CI truncados, como CIS, CISD...

<sup>4</sup>Es decir, que el error cometido sea proporcional al tamaño del sistema. Esto es así para el método CI completo (todas las excitaciones en el conjunto de orbitales excitados), pero no se cumple en los métodos CI truncados.

De acuerdo con la teoría de perturbaciones, la primera corrección a la energía se calcula como,

$$E^{(1)} = \langle \psi^{(0)} | \hat{H}' | \psi^{(0)} \rangle \quad (2.44)$$

que resulta ser, precisamente  $E^{(1)} = -\frac{1}{2} \sum_i \sum_j \left( \langle \chi_i | \hat{J}_j | \chi_i \rangle - \langle \chi_i | \hat{K}_j | \chi_i \rangle \right)$ , de forma que,

$$E^{(0)} + E^{(1)} = \sum_i^n \epsilon_i - \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \left( \langle \chi_i | \hat{J}_j | \chi_i \rangle - \langle \chi_i | \hat{K}_j | \chi_i \rangle \right) = E^{HF} \quad (2.45)$$

es decir, que la corrección de energía hasta primer orden es la que coincide con la energía de Hartree-Fock. Hasta este punto, no hemos introducido ninguna mejora respecto al método de Hartree-Fock y, de hecho, el efecto de la correlación se introduce a partir de la corrección de segundo orden en la energía. Esta corrección se calcula una vez obtenida la corrección de primer orden de la función de onda, y su expresión resulta ser:

$$E^{(2)} = \sum_m \frac{|\langle \psi_m^{(0)} | \hat{H}' | \psi^{(0)} \rangle|^2}{E^{(0)} - E_m^{(0)}} \psi_m^{(0)} \quad (2.46)$$

donde hemos omitido el subíndice para el estado fundamental en el que nos centramos, es decir,  $\psi^{HF}$ , y  $m$  hace referencia estados excitados del Hamiltoniano  $\hat{H}^0$ , que son los determinantes monoexcitados, doblemente excitados, etc., que hemos comentado anteriormente. Teniendo en cuenta, sin embargo, que las integrales del tipo  $\langle \psi^{HF} | \hat{H}' | \psi^{Exc} \rangle$  son solo distintas de cero para excitaciones dobles ( $Exc = D$ ), la corrección de segundo orden se puede escribir como sigue:

$$E^{(2)} = \sum_{a,b}^n \sum_{i,j>n} \frac{\langle \psi^{HF} | \hat{H}' | \psi_{a,b \rightarrow i,j}^{(D)} \rangle \langle \psi_{a,b \rightarrow i,j}^{(D)} | \hat{H}' | \psi^{HF} \rangle}{E^{HF} - E_{a,b \rightarrow i,j}} \quad (2.47)$$

Como vemos, la corrección de segundo orden de la energía incluye la interacción con todas las configuraciones doblemente excitadas, que tienen mayor peso cuanto menor es la diferencia de energía con el estado fundamental, y las expresiones para las correcciones de órdenes superiores son aún más complejas. En general, los métodos de perturbaciones para moléculas se denominan  $MP_n$  (método Møller-Plesset de orden  $n$ ), de forma que la energía MP1 es igual a la energía HF, y a partir de MP2 se incluye la correlación electrónica. Normalmente MP2 incluye un 80-90% de la energía de correlación y es, de hecho, el método basado en la función de onda menos costoso para incluir la correlación electrónica, por lo que puede ser aplicado a sistemas de cierta envergadura.

## 2.2. TEORÍA DEL FUNCIONAL DE LA DENSIDAD

Toda la información que es posible conocer acerca de un sistema de electrones está contenida en la función de onda electrónica,  $\Psi(\mathbf{x})$ , que depende de  $4n$  variables (3 coordenadas espaciales y una de espín para cada electrón), lo que la convierte en una formidable estructura matemática, difícil de determinar e interpretar. No es de extrañar, por tanto, que se haya buscado una entidad matemática más fácil de manejar, ya desde los albores de la mecánica cuántica. Como veremos a lo largo de esta sección, este sustituto de la función de onda es la densidad electrónica que, a partir de la interpretación probabilística indicada en la Ecuación (2.1), se define como sigue,

$$\rho(\mathbf{r}) = n \int \cdots \int |\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \mathbf{x}_3 \dots \mathbf{x}_n)|^2 dw_1 d\mathbf{x}_2 d\mathbf{x}_3 \dots d\mathbf{x}_n \quad (2.48)$$

Esta propiedad proporciona la probabilidad de encontrar un electrón cualquiera en la posición  $\mathbf{r}$  con el resto de los electrones en una posición y un espín arbitrarios, y se identifica con un observable físico que puede ser determinado experimentalmente. La densidad electrónica depende únicamente de 3 variables (las coordenadas espaciales), lo que supone una simplificación muy notable con respecto a la función de onda. Pero, ¿contiene la densidad electrónica toda la información del sistema, al igual que la función de onda? Esta pregunta es clave para determinar si una teoría basada en la densidad electrónica tiene sentido y, aunque la respuesta definitiva no llegó hasta que Hohenberg y Kohn desarrollaron sus dos famosos teoremas, parece en principio razonable apostar por ella. De hecho, un análisis de dicha densidad nos revela que contiene, al menos, alguna información fundamental del sistema. Así, su integral a todo el espacio determina el número de electrones  $n$ , y la posición y carga de los núcleos se pueden establecer a partir de los máximos de la densidad [Koch 01].

Suponiendo que, efectivamente, la densidad electrónica contiene toda la información acerca del sistema, hay que determinar los ingredientes necesarios para poder acceder a ella, y en particular, a la energía electrónica, que es una propiedad clave del sistema en el marco de la aproximación de Born-Oppenheimer. En el caso de los métodos basados en la función de onda, la receta para obtener información del sistema sobre una propiedad,  $A$ , es mediante la siguiente integral,

$$\langle A \rangle = \langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle \quad (2.49)$$

donde  $\hat{A}$  es el operador mecanocuántico asociado al observable  $A$  y  $\langle A \rangle$  es el valor promedio de la propiedad  $A$ . Si la función de onda (normalizada) del sistema,  $\Psi$ , es función propia de  $\hat{A}$ , obtendremos además un valor concreto de la medida,  $\langle A \rangle = A$ . Disponemos por tanto de una aplicación que proporciona el valor (concreto o promedio) de la propiedad conociendo la función de onda. A este tipo de aplicación, que relaciona un valor numérico a una función, se le denomina funcional,  $A[\Psi]$ . En el caso concreto de la energía electrónica,  $E[\Psi]$ , se emplea el Hamiltoniano electrónico introducido en la Ecuación (2.5), para escribir,

$$E[\Psi] = \langle \Psi | \hat{H}^{el} | \Psi \rangle = T_{el}[\Psi] + V_{ee}[\Psi] + V_{Ne}[\Psi] \quad (2.50)$$

donde hemos tenido en cuenta las distintas partes en las que se divide el Hamiltoniano electrónico, que dan lugar a funcionales específicos cuyas expresiones se obtienen separando la integral energética total en dichas componentes.

Esto es precisamente lo que necesitamos en esta teoría, un funcional de la densidad electrónica que proporcione el valor de las propiedades del sistema, interesándonos principalmente en la energía,  $E[\rho]$ . Uno de los primeros intentos del empleo de la densidad electrónica para averiguar la energía de un sistema molecular fue el modelo de Thomas-Fermi [Thomas 27, Fermi 27], en el que se emplean modelos físicos sencillos para obtener expresiones analíticas que proporcionan la energía del sistema en función de la densidad electrónica. Las aproximaciones del modelo de Thomas-Fermi son demasiado toscas para dar resultados aceptables, aunque el modelo tiene una gran relevancia histórica por ser la primera realización práctica de los conceptos introducidos en este apartado.

### 2.2.1. Desarrollo formal de la teoría

La teoría del funcional de la densidad (*Density Functional Theory*, DFT) moderna se asienta formalmente en los dos **teoremas de Hohenberg-Kohn**, formulados por Pierre Hohenberg y Walter Kohn en 1964 [Hohenberg 64], en los que demuestran la relación biunívoca que hay entre la densidad electrónica y la energía electrónica (primer teorema), y la aplicación del principio de variaciones para obtener la densidad y energía exactas (segundo teorema), y que se pueden expresar como sigue:

**Primer Teorema.** El potencial externo<sup>5</sup> es (excepto por una constante) un funcional único de  $\rho(\mathbf{r})$ ; ya que, el potencial externo determina, a su vez, la forma del Hamiltoniano (electrónico), se observa que el estado fundamental del sistema de partículas (electrones) es un funcional único de  $\rho(\mathbf{r})$ .

**Segundo Teorema.** La energía exacta, que se obtiene de aplicar la densidad electrónica asociada al potencial externo del sistema, es la mínima energía que arroja este funcional en relación a todas las densidades electrónicas asociadas a cualquier potencial externo.

El primer teorema pone de manifiesto la existencia de un funcional de la densidad capaz de proporcionar la energía a partir de una densidad electrónica. Sin embargo, no dice nada acerca de como se construye este funcional, cuya forma genérica es:

$$E[\rho] = T_{el}[\rho] + V_{ee}[\rho] + V_{Ne}[\rho] \quad (2.51)$$

donde hemos separado la energía en los mismos términos que en el caso del funcional de la energía de la Ecuación (2.50). Entre estos términos, el funcional  $V_{Ne}[\rho]$  es el único que depende

---

<sup>5</sup>Se refiere al potencial externo al sistema (de electrones) que, en el caso de moléculas, es el potencial de interacción con los núcleos.



del sistema concreto que estemos tratando, y su expresión puede derivarse a partir del funcional correspondiente de la función de onda, como sigue:

$$\begin{aligned}
 \langle \Psi | \hat{V}_{Ne} | \Psi \rangle &= \int \dots \int \Psi^* \left[ \sum_i^n \sum_A^N \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|} \right] \Psi d\mathbf{x}_1 \dots d\mathbf{x}_n \\
 &= \int \left\{ \sum_i^n \int \dots \int |\Psi|^2 dw_i d\mathbf{x}_1 \dots d\mathbf{x}_n \right\} \left[ \sum_A \frac{Z_a}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|} \right] d\mathbf{r}_i \quad (2.52) \\
 &= \int \rho(\mathbf{r}) \left[ \sum_A \frac{Z_a}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_A|} \right] d\mathbf{r} = V_{Ne}[\rho]
 \end{aligned}$$

donde hemos tenido en cuenta la indistinguibilidad de los electrones y la definición de la densidad electrónica dada en la Ecuación (2.48).

La forma de los otros dos términos es independiente del sistema, por lo que dan lugar a un funcional universalmente válido que se representa de la forma  $F[\rho] = T_{el}[\rho] + V_{ee}[\rho]$ . Sin embargo, no se puede deducir una expresión para ninguno de los términos de este funcional, como ocurre para la interacción con los núcleos. Por ejemplo, el término interelectrónico,  $|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$  en la interacción electrostática,  $V_{ee}$ , impide la separación de la densidad electrónica en  $V_{ee}[\Psi]$ , y por tanto, la determinación del funcional de la densidad correspondiente. Lo que se suele hacer, entonces, es introducir un potencial similar para el que se conoce su expresión en función de  $\rho$ , como el potencial de interacción clásico entre dos densidades electrónicas,  $J[\rho]$ , y definir entonces este funcional como,

$$V_{ee}[\rho] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + V_{ncl}[\rho] = J[\rho] + V_{ncl}[\rho] \quad (2.53)$$

donde  $V_{ncl}[\rho]$  contiene los efectos no-clásicos de la interacción interelectrónica, incluyendo los efectos de correlación electrostática y de intercambio, descritos anteriormente, y la corrección de la auto-interacción que se produciría al aplicar la fórmula clásica. Para determinar la energía cinética debemos encontrar otro modelo que de cuenta de la mayor parte de la energía exacta.

En cuanto al segundo teorema, una forma más general de plantear la búsqueda variacional de la densidad electrónica del estado fundamental es la que ofrece el enfoque de la búsqueda restringida de Levy, que se puede expresar como [Levy 82],

$$E_{exacta} = \min_{\rho \rightarrow N} \left( F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r}) V_{Ne} d\mathbf{r} \right) \quad (2.54)$$

Es decir, dada una densidad,  $\rho$ , que integre el número de electrones del sistema,  $F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r}) V_{Ne} d\mathbf{r}$  proporciona la energía correspondiente a dicha densidad, y, minimizando esa expresión, se obtiene la densidad y energía del estado fundamental. Por su parte, el funcional universal queda definido de forma más amplia por:

$$F[\rho] = \min_{\Psi \rightarrow \rho} \langle \Psi | \hat{T}_{el} + \hat{V}_{ee} | \Psi \rangle \quad (2.55)$$

Esta formulación extiende el enfoque de Hohenberg-Kohn, incorporando, por ejemplo, la posibilidad de tratar estados degenerados.

### 2.2.2. Formulación de Kohn-Sham

En el desarrollo expuesto en el apartado anterior, se ha puesto de manifiesto que si bien la densidad electrónica puede determinar de forma unívoca la energía del sistema, de forma análoga a cómo se hace con la función de onda, desconocemos la forma que adopta el funcional encargado de esta extraer esta información de la densidad electrónica. En concreto, hemos dividido el funcional en los siguientes términos:

$$E[\rho] = T_{el}[\rho] + J[\rho] + V_{ncl}[\rho] + V_{Ne}[\rho] \quad (2.56)$$

donde solo conocemos las expresiones para  $V_{Ne}[\rho]$  y  $J[\rho]$ , dadas por las ecuaciones (2.52) y (2.53), respectivamente. La parte  $V_{ncl}[\rho]$  contiene todos los efectos no clásicos que no hemos sido capaces de recuperar de la interacción electrónica, mientras que aún no hemos introducido ningún modelo para desarrollar la parte cinética.

El método para abordar este problema de forma práctica vino de la mano del propio Kohn, que junto con Lu Jeu Sham, introdujo un modelo efectivo para calcular la parte cinética e incorporar las componentes desconocidas en el funcional de la densidad, lo que se conoce como **método de Kohn-Sham** (KS) [Kohn 65]. Para ello se introduce un sistema de referencia compuesto por electrones independientes o no interactuantes, como los descritos por el Hamiltoniano (2.13) en la Sección (2.1). Como ya hemos visto, la función de onda de estos sistemas es un orbital de Slater formado por espín-orbitales,  $\chi(\mathbf{x}) = \psi_i(\mathbf{r})\omega(w)$  (donde  $\omega = \alpha$  o  $\beta$ ), cuya forma depende de la elección del potencial  $\hat{V}'$  en el Hamiltoniano (2.13). Por tanto, resulta posible escoger el potencial de forma que la función de onda resultante de lugar a la densidad electrónica exacta, es decir,

$$\rho_S(\mathbf{r}) = \sum_i |\psi_i(\mathbf{r})|^2 = \rho_{exacta}(\mathbf{r}) \quad (2.57)$$

donde hemos empleado la letra  $S$  para identificar al sistema de referencia no interactuante y hemos aplicado la Ecuación (2.48) a la función descrita por el determinante de Slater. Al potencial de interacción de la Ecuación (2.13) que da lugar a esta función de onda, se le denomina potencial de Kohn-Sham,  $v^{KS}$ , de forma que la ecuación monoeléctronica del sistema de referencia es,

$$\left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 + V_{ne}(\mathbf{r}) + v^{KS}(\mathbf{r}) \right] \psi_i(\mathbf{r}) = \epsilon_i \psi_i(\mathbf{r}) \quad (2.58)$$

donde los orbitales espaciales,  $\psi_i(\mathbf{r})$ , son los del sistema de referencia.

El método Kohn-Sham propone calcular la energía cinética del sistema de referencia, que se puede obtener de forma exacta y debe ser similar a la energía cinética del sistema real,

$$T_S[\rho] = \sum_i^n \langle \psi_i | \hat{T}_{el} | \psi_i \rangle = \frac{1}{2} \sum_i^n \langle \psi_i | \nabla^2 | \psi_i \rangle \quad (2.59)$$

donde hemos indicado que se trata de un funcional la densidad  $\rho$  ya que, aunque no aparezca de forma explícita, la densidad electrónica está relacionada con los orbitales mediante la Ecuación (2.57).

Si introducimos esta energía cinética, el funcional (2.56) queda de la forma,

$$E[\rho] = T_S[\rho] + T_C[\rho] + J[\rho] + V_{ncl}[\rho] + V_{Ne}[\rho] \quad (2.60)$$

donde el nuevo funcional,  $T_C[\rho] = (T_{el}[\rho] - T_S[\rho])$ , contiene la diferencia entre la energía cinética total y la exacta. En resumen, con esta expresión calculamos la interacción interelectrónica con un modelo clásico,  $J[\rho]$ , y la energía cinética usando el sistema de referencia,  $T_S[\rho]$ , quedando la diferencia con el sistema real incorporada a los términos  $V_{ncl}[\rho]$  y  $T_C[\rho]$ , cuyas expresiones son desconocidas. Agrupamos entonces estos términos problemáticos en el llamado **funcional de correlación e intercambio**,  $V_{XC}[\rho]$ , de forma que,

$$E[\rho] = T_S[\rho] + J[\rho] + V_{XC}[\rho] + V_{Ne}[\rho] \quad (2.61)$$

Podemos desarrollar la expresión anterior en función de los orbitales espaciales del sistema no interactuante, teniendo en cuenta la conexión entre  $\rho$  y el sistema de referencia dada por la Ecuación (2.57), de forma que,

$$\begin{aligned} E[\rho] = & -\frac{1}{2} \sum_i^n \langle \psi_i | \nabla^2 | \psi_i \rangle - \frac{1}{2} \sum_i^n \sum_j^n \int \int \frac{|\psi_i(\mathbf{r}_1)|^2 |\psi_j(\mathbf{r}_2)|^2}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} \\ & + V_{XC}[\rho] - \sum_i^n \int \sum_A^N \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{R}_A|} |\psi_i(\mathbf{r}_1)|^2 d\mathbf{r}_1 \end{aligned} \quad (2.62)$$

donde, en principio, el único término que no conocemos es  $V_{XC}[\rho]$ .

Además, tampoco hemos indicado la forma de obtener la función de onda del sistema de referencia, es decir, no conocemos la forma del potencial  $v^{KS}$  que da lugar a los orbitales  $\psi_i$ . Para averiguarla, hacemos uso del método de variaciones, y buscamos los orbitales (y por tanto la densidad electrónica) que minimizan la energía de la Ecuación (2.62). Este paso se realiza de forma similar a la determinación variacional de los orbitales de Hartree-Fock, es decir, minimizando el funcional  $E[\rho]$  respecto a los orbitales  $\psi$  (la densidad), e introduciendo la restricción de que dicho orbitales permanezcan ortonormales aplicando el método de Euler-Lagrange [Parr 89]. Este desarrollo acaba en que los orbitales que minimizan la energía (2.62) son los resultantes de la siguiente ecuación de valores propios:

$$\left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 + \sum_A^N \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{R}_A|} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} + v_{XC} \right] \psi_i = \epsilon_i \psi_i \quad (2.63)$$

donde  $v_{XC}$  es la derivada del funcional de correlación e intercambio respecto a la densidad electrónica,

$$v_{XC} = \frac{\delta V_{XC}}{\delta \rho} \quad (2.64)$$

Si reunimos todos los términos que dependen únicamente de un electrón, como  $h_i$ , podemos reescribir la Ecuación (2.63) de la forma,

$$\left[ \hat{h}_i + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} + v_{XC} \right] \chi_i = \epsilon_i \chi_i \quad (2.65)$$

donde ahora el parecido entre la Ecuación (2.63) y la ecuación de Hartree-Fock (2.20) resulta más que evidente, ya que ambas se diferencian en el potencial de interacción interelectrónica efectiva. Así, en el caso de Hartree-Fock, dicho potencial es  $v^{HF}$ , definido en la Ecuación (2.18), que proporciona los espín orbitales que dan lugar a la mejor función de onda de electrones independientes, mientras que en el presente caso, se trata del potencial  $v^{KS}$  de la Ecuación (2.58), que conduce a los orbitales que forman la función de onda de electrones independientes que origina la misma densidad electrónica que la función de onda del sistema real. Resulta interesante comparar ambos potenciales más detenidamente,

$$v^{HF}(\mathbf{r}) = \sum_i \hat{J}_i - \sum_i \hat{K}_i \quad (2.66)$$

$$v^{KS}(\mathbf{r}) = \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_2|} d\mathbf{r}_2 + \frac{\delta V_{XC}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})} = \sum_i \hat{J}_i + v_{XC} \quad (2.67)$$

donde hemos tenido en cuenta la equivalencia del potencial de Coulomb definido en ambas ecuaciones. La única diferencia entre estas dos ecuaciones reside en que donde el método de Hartree-Fock introduce el potencial de intercambio, el de Kohn-Sham pone el potencial de correlación e intercambio definido en la Ecuación (2.64). Sin embargo, mientras que el método de Hartree-Fock ofrece únicamente una aproximación (relativamente pobre) a la energía, el método de Kohn-Sham proporciona la energía exacta mediante el funcional (2.62), siempre y cuando el potencial de correlación e intercambio empleado sea el correcto, que, sin embargo, no es conocido.

Dada la analogía entre los métodos de Kohn-Sham y Hartree-Fock, se pueden usar para ambos las mismas consideraciones en cuanto a los enfoques posibles para su resolución. En concreto, al igual que en Hartree-Fock, los determinantes de Slater correspondientes al sistema KS de referencia pueden generarse usando a enfoques tanto restringidos como no restringidos, dando lugar a las variantes RKS y UKS, que tienen las mismas limitaciones que las discutidas en el caso de los métodos RHF y UHF. Asimismo, ya que los métodos HF y KS guardan muchas similitudes, se emplean en ellos técnicas similares, lo que explica que los códigos capaces de llevar a cabo cálculos HF, puedan realizar cálculos KS utilizando muchas rutinas idénticas.

Cabe destacar que la metodología introducida por Kohn y Sham es, en principio, exacta. Sin embargo, en la práctica, al no conocer la forma el funcional de correlación e intercambio,

$V_{XC}[\rho]$ , ni por tanto el potencial  $v_{XC}$ , tenemos que recurrir a funcionales aproximados que, consecuentemente, darán lugar a densidades y energías electrónicas aproximadas. En el siguiente apartado repasamos los funcionales disponibles en la actualidad.

### 2.2.3. Funcionales de correlación e intercambio

Para que esta metodología tenga utilidad práctica son necesarias aproximaciones al funcional de correlación e intercambio. La construcción de funcionales es, de hecho, una de las ramas más activas en la teoría del funcional de la densidad, en la que se usan modelos más o menos complejos incorporando, en muchos casos, parámetros que se ajustan empíricamente para proporcionar los mejores resultados frente a un conjunto dado de datos. Existen además, algunas propiedades conocidas del funcional exacto, como que la densidad resultante integre un número  $n$  de electrones o su comportamiento asintótico, que se pueden añadir como restricciones en el desarrollo de los funcionales aproximados.

En cuanto a la forma concreta de los funcionales, lógicamente, dependen de la densidad electrónica y, además, parece razonable suponer que también dependan de la topología de esta función, por lo que se puede incluir su gradiente y Laplaciano. De hecho, según la información que se incluya, se establece la clasificación más general de los funcionales como sigue.

#### Aproximación de la densidad local y de la densidad de espín local, L(S)DA

El primer modelo que se empleó fue el del gas uniforme de electrones, en el cuál los electrones se mueven sobre una distribución homogénea de carga positiva, de forma que el conjunto total es eléctricamente neutro, y la densidad electrónica resultante es constante. El funcional relacionado depende únicamente de este valor de densidad en cada punto (local), y se representa como,

$$V_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r})\varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))d\mathbf{r} \quad (2.68)$$

donde  $\varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))$  es la energía de correlación e intercambio por partícula en un gas uniforme de electrones de densidad  $\rho(\mathbf{r})$ , ponderada por la densidad electrónica en ese punto. Esta formulación constituye la aproximación local de espín (*Local Density Approximation*, LDA). El término  $\varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))$  se puede dividir en las contribuciones de correlación e intercambio,

$$\varepsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r})) = \varepsilon_X(\rho(\mathbf{r})) + \varepsilon_C(\rho(\mathbf{r})) \quad (2.69)$$

y se puede calcular cada componente por separado.

En el modelo de gas uniforme de electrones, la energía de intercambio,  $\varepsilon_X(\rho(\mathbf{r}))$ , se expresa mediante la aproximación de Slater al intercambio Hartree-Fock [Slater 74], basado en las ideas originales de Bloch y Dirac desarrolladas en los años 20. La expresión para este término es,

$$\varepsilon_X(\rho(\mathbf{r})) = -\frac{3}{4}\sqrt{\frac{3\rho(\mathbf{r})}{\pi}} \quad (2.70)$$

y se suele denominar intercambio de Slater o Slater-Dirac, representándose con una S.

En cuanto a la parte de correlación,  $\varepsilon_C(\rho(\mathbf{r}))$ , no se conoce una forma explícita para la misma como en el caso de la energía de intercambio, aunque se han calculado valores de este término de forma precisa mediante cálculos de Monte-Carlo cuánticos [Ceperly 80], y estos valores han sido empleados por Vosko, Wilk y Nusair para obtener una expresión analítica que se ajuste a ellos, proporcionando así una expresión concreta para calcular este término, que se conoce como VWN.

La separación del funcional, como en la LDA (2.68), se realiza en prácticamente todos los funcionales desarrollados (muchos de ellos basados en el modelo LDA) pudiéndose emplear partes de correlación e intercambio obtenidas por separado. Una manera de nombrar entonces los funcionales es mediante la conjunción de los acrónimos de la parte de intercambio y de correlación. Así, por ejemplo, otra manera de indicar el modelo LDA es mediante SVWN.

Una modificación del modelo LDA consiste en emplear de forma separada las densidades electrónicas de espín  $\alpha$  y  $\beta$ , que suman entre las dos la densidad total. De esta forma, el funcional de correlación e intercambio queda,

$$V_{XC}^{LSDA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{XC}(\rho^\alpha(\mathbf{r}), \rho^\beta(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.71)$$

y constituye la aproximación de la densidad de espín local (*Local Spin Density Approximation*, LSDA), necesaria para la aplicación de la versión no restringida de las ecuaciones de Kohn-Sham (UKS) en el tratamiento de sistemas de capa abierta.

La aplicación de las aproximaciones locales, desarrolladas para el modelo de gas de electrones uniforme, implican que la variación espacial de la densidad electrónica es muy suave. Por tanto, en el caso de átomos y moléculas, en los que se producen variaciones bruscas de la densidad, esta aproximación no es muy buena y, de hecho, el modelo L(S)DA no proporciona, en general, resultados aceptables para su uso en problemas químicos, lo que explica que los métodos DFT no se extendieran a la Química Computacional hasta la aparición de modelos más avanzados.

### Aproximación de Gradiente Generalizado, GGA

La mejora de los funcionales viene de la mano de la introducción en ellos del gradiente de la densidad, de forma que, aún manteniendo una descripción local, se da cuenta de la variación de la densidad electrónica. La forma general del mismo es la siguiente,

$$V_{XC}^{GGA}[\rho] = \int f(\rho^\alpha(\mathbf{r}), \rho^\beta(\mathbf{r}), \nabla\rho^\alpha(\mathbf{r}), \nabla\rho^\beta(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.72)$$

que constituye la aproximación de gradiente generalizado (*Generalized Gradient Approximation*, GGA). Como hemos comentado, es habitual dividir el funcional en las componentes de intercambio y correlación,

$$V_{XC}^{GGA}[\rho] = V_X^{GGA} + V_C^{GGA} \quad (2.73)$$

La forma de estos funcionales se determina imponiendo las restricciones que deberían cumplir los funcionales exactos, aunque la elección de las complejas expresiones matemáticas de los mismos viene guiada, pragmáticamente, por su capacidad para proporcionar resultados satisfactorios. Una estrategia común consiste en partir de la aproximación LDA. Por ejemplo, para el caso del funcional de intercambio, tenemos,

$$E_X^{GGA}[\rho] = V_X^{LSDA} + \Delta V_X^{LSDA} = V_X^{LSDA} - \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int F(s_\sigma)(\rho^\sigma(\mathbf{r}))^{4/3} d\mathbf{r} \quad (2.74)$$

donde  $s_\sigma$  es el gradiente de densidad reducida de espín  $\sigma$ ,

$$s_\sigma(\mathbf{r}) = \frac{|\nabla \rho^\sigma(\mathbf{r})|}{(\rho^\sigma(\mathbf{r}))^{4/3}} \quad (2.75)$$

La elección de la función  $F(s_\sigma)$  determina, por tanto, el funcional de intercambio. Uno de los más usados es el propuesto por Axel Becke en 1988 [Becke 88], representado como B88 o simplemente B, cuya forma es,

$$F^B = \frac{\beta s_\sigma^2}{1 + 6\beta s_\sigma \sinh^{-1} s_\sigma} \quad (2.76)$$

donde  $\beta$  es un parámetro empírico cuyo valor se determinó mediante un ajuste de mínimos cuadrados a las energías de intercambio exactas de los gases nobles, de He a Rn.

Dada la separación indicada en la Ecuación (2.72), el desarrollo de los funcionales de correlación e intercambio se hace de forma independiente y, aunque un mismo grupo de investigación haya determinado aproximaciones para ambos, es habitual usar distintas combinaciones. Así, por ejemplo, el funcional de intercambio de Becke se puede emplear junto con distintos funcionales, como los desarrollados por Perdew y colaboradores (P86 y PW91) [Perdew 86, Wang 91], dando lugar a los funcionales BP86 y BPW91, o con el desarrollado por Lee, Parr y Yang en 1988 (LYP) [Lee 88], dando lugar al conocido funcional BLYP. Cabe destacar que este último funcional de correlación, que es uno de los más usados, no está basado en el modelo de gas uniforme de electrones, sino en la energía de correlación del átomo de Helio, lo que pone de manifiesto que estrategias diferentes pueden dar lugar a funcionales igualmente válidos.

La expresión (2.76) presenta dos características comunes de los funcionales aproximados. En primer lugar, las expresiones son relativamente complejas y, en segundo lugar, suelen contener parámetros empíricos que se ajustan para que el funcional de lugar a los mejores resultados<sup>6</sup>. Precisamente por esta razón, muchos investigadores son reticentes a catalogar los métodos DFT como métodos *ab initio*, pese que se trata de una teoría, en principio, exacta. No obstante, tal vez la mayor componente empírica de estos métodos es la asociada a la gran cantidad de funcionales disponibles que, en algunos casos, dan lugar a resultados dispares. Por este motivo, a la hora de afrontar un problema con químicos métodos DFT lo primero que hay que hacer es calibrar el método, escogiendo el funcional que mejor describe el tipo de sistema en que estemos

---

<sup>6</sup>No obstante, existen funcionales GGA sin parámetros empíricos como el desarrollado por Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) [Perdew 96]

interesados, para lo que podremos comprobar los resultados de varios funcionales o examinar en la bibliografía reciente qué funcionales producen resultados satisfactorios.

En todo caso, en comparación con los funcionales LSDA, los funcionales GGA suponen una mejora significativa, ya que proporcionan resultados con una precisión aceptable en muchos casos, por lo que han tenido una gran aceptación entre los químicos computacionales. De hecho, desde su aparición a finales de los años 80, su aplicación a sistemas químicos ha aumentado exponencialmente año tras año [Koch 01]. Esta mejora pone de manifiesto, además, que la inclusión de información sobre la topología de la función  $\rho(\mathbf{r})$ , como el gradiente, es la ruta a seguir en la mejora de los funcionales y, en esta dirección, encontramos los funcionales Meta-GGA, en los que se incorpora información adicional, como la densidad de la energía cinética o la Laplaciana de la densidad, y entre los que destaca el desarrollado por Tao, Perdew, Staroverov y Scuseria (TPSS) [Tao 03].

Pese a la mejora que suponen los funcionales GGA, estos se enfrentan todavía a algunos obstáculos que limitan la calidad de los resultados. Por ejemplo, la inclusión de la energía de intercambio se consigue solo de forma aproximada, mientras que en las teorías de la función de onda, incluido el método más sencillo de Hartree-Fock, esta se calcula de forma exacta. Por otro lado, los funcionales GGA se desvían del comportamiento de los funcionales exactos, como por ejemplo en su incorrecta tendencia asintótica, algo que, nuevamente, mantiene el método Hartree-Fock. De esta forma, cabe preguntarse si es posible introducir la parte bien descrita con Hartree-Fock, para corregir los funcionales. La respuesta a esta pregunta la desarrollamos en los dos apartados siguientes.

## Funcionales híbridos

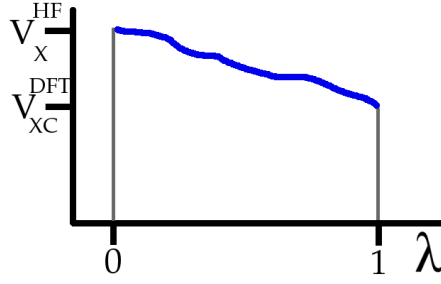
Los funcionales híbridos son aquellos que contienen parte del intercambio exacto, calculado con Hartree-Fock. La llave para introducir este intercambio exacto en los funcionales es el método de la conexión adiabática, que expresa el potencial de correlación e intercambio,  $v_{XC}(\lambda)$ , en términos de un parámetro de interacción,  $\lambda$ , que varía entre 0 (sistema no interactuante) y 1 (sistema real). Así, para  $\lambda = 0$ , el único efecto que existe es el intercambio, con lo que el potencial es, exactamente, el de intercambio Hartree-Fock,  $v_X^{HF} = \hat{K}$ , definido en la Ecuación (2.18), mientras que para  $\lambda = 1$ , volvemos a tener el potencial  $v_{XC}^{DFT}$  completo definido en la Ecuación (2.64). El funcional de correlación e intercambio se escribe entonces como sigue,

$$V_{XC}[\rho] = \int_0^1 \langle \Psi(\lambda) | v_{XC}(\lambda) | \Psi(\lambda) \rangle d\lambda = \int_0^1 V_{XC}(\lambda) d\lambda \quad (2.77)$$

La dependencia, sin embargo, del potencial  $v_{XC}$  (y del funcional  $V_{XV}$ ) con el parámetro  $\lambda$  no es conocida (de hecho solo se conoce de forma exacta para  $\lambda = 0$ ). No obstante, si asumimos una variación como la mostrada en la Figura 2.2, entonces podemos expresar el funcional de correlación e intercambio de la forma:

$$V_{XC}[\rho] = V_X^{HF} + z(V_{XC}^{DFT} - V_X^{HF}) \quad (2.78)$$





**Figura 2.2** – Representación cualitativa de la variación de la energía de correlación e intercambio con el parámetro  $\lambda$ .

donde  $V_X^{HF}$  es el intercambio exacto HF,  $V_{XC}^{DFT}$  es el funcional de correlación e intercambio para el que podemos usar alguno de los funcionales aproximados indicados en el epígrafe anterior, y  $z$  es un factor que dependerá de la forma de la función de la Figura 2.2. Nótese que si el funcional exacto fuera conocido, entonces tendríamos  $V_{XC} = V_{XC}^{DFT}$ . En la práctica, esta formulación nos permite introducir la energía de intercambio exacta para corregir las deficiencias de los funcionales aproximados.

El parámetro  $z$  puede ajustarse para conseguir los mejores resultados por comparación frente a valores experimentales. Además, puestos a realizar un ajuste empírico, puede resultar conveniente dar algo más de flexibilidad a la función (2.78) añadiendo algún parámetro ajustable adicional. Esto es precisamente lo que propuso Becke al definir el potencial híbrido de tres parámetros B3PW91, empleando como funcional DFT el BPW91 (basado en LSDA), dando lugar a la expresión [Becke 93],

$$V_{XC}^{B3PW91} = a(V_X^{HF} - V_X^{LSDA}) + V_X^{LSDA} + b\Delta V_X^B + V_C^{LSDA} + c\Delta V_C^{PW91} \quad (2.79)$$

donde  $\Delta V_X^B$  y  $\Delta V_C^{PW91}$  son las correcciones de gradiente corregido a LSDA como se indica en la Ecuación (2.74), y  $a$ ,  $b$  y  $c$  son los parámetros ajustables que se determinaron usando energías de atomización e ionización de un conjunto amplio de moléculas, y cuyos valores concretos son  $a = 0,20$ ,  $b = 0,72$  y  $c = 0,81$ . Nótese que  $a$  es el parámetro que determina la cantidad de intercambio exacto, mientras que  $b$  y  $c$  controlan la corrección de gradiente corregido que se incorpora, por lo que cabe destacar que tan solo se introduce un 20% del intercambio exacto.

El funcional híbrido anterior ofrece buenos resultados. Sin embargo, el funcional más empleado, con diferencia, en estudios DFT hasta la fecha es ser una variación del funcional original de Becke propuesta por Stephens y colaboradores en 1994 [Stephens 94], en la que se emplea el funcional de correlación LYP en lugar del PW91, dando lugar al famoso funcional B3LYP. En este caso, teniendo en cuenta que el funcional LYP no está basado en el modelo LSDA, la forma del funcional híbrido es,

$$V_{XC}^{B3LYP} = a(V_X^{HF} - V_X^{LSDA}) + V_X^{LSDA} + b\Delta V_X^B + (1 - c)V_C^{LSDA} + cV_C^{LYP} \quad (2.80)$$

donde los parámetros empíricos,  $a$ ,  $b$  y  $c$  son los ajustados por Becke para el funcional B3PW91. Resulta sorprendente que, pese a no emplear parámetros optimizados específicamente para el

uso de estos dos funcionales, el funcional híbrido B3LYP conduce a resultados bastante buenos y sigue siendo, de hecho, el funcional más ampliamente utilizado en la actualidad [Sousa 07].

### Correcciones del intercambio a largo alcance

La introducción de parte del intercambio HF en los funcionales híbridos no solo mejora los resultados frente a los valores LSDA y GGA sino que corrige en parte el mal comportamiento asintótico del potencial de intercambio de estos funcionales, que no presentan una caída de tipo  $-r^{-1}$  para regiones alejadas del núcleo, como debe ocurrir en el intercambio exacto [Levy 84]. La mejora producida en funcionales híbridos no es, sin embargo, completamente satisfactoria y, por ejemplo, el funcional B3LYP tiene un comportamiento del tipo  $-0,2r^{-1}$  [Yanai 04], lo que explica su fracaso en los casos que involucran una densidad electrónica más dispersa, como la que puede aparecer en el estudio de la polarizabilidad de grandes cadenas o en la evaluación de algunos niveles excitados<sup>7</sup> como los estados de transferencia de carga [Dreuw 05].

Para corregir esta deficiencia, Tsuneda y su grupo [Tawada 04] han propuesto dividir el término de repulsión interelectrónica ( $r_{12}^{-1} = |r_1 - r_2|^{-1}$ ) del potencial de intercambio en dos regiones, una de corto y otra de largo alcance, siguiendo el esquema de partición de Ewald,

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} + \frac{\text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (2.81)$$

donde erf es la función de error de Gauss y  $\mu$  es un parámetro que controla la forma de esta función. El primer término describe el decaimiento de corto alcance (*Short Range*, SR) y el segundo de largo alcance (*Long Range*, LR), descritos mediante los funcionales  $V_X^{SR}$  y  $V_X^{LR}$  respectivamente. En el primer caso,  $V_X^{SR}$ , se trata de un funcional de intercambio tipo GGA, como en la Ecuación (2.74), modificado para dar cuenta del término interelectrónico actualizado,  $[1 - \text{erf}(\mu r_{12})]/r_{12}$ , y en el segundo caso, el intercambio de largo alcance,  $V_X^{LR}$ , se calcula simplemente con el potencial de intercambio de Hartree-Fock,  $\hat{K}$ , sustituyendo  $r_{12}$  por el segundo término de la suma (2.81).

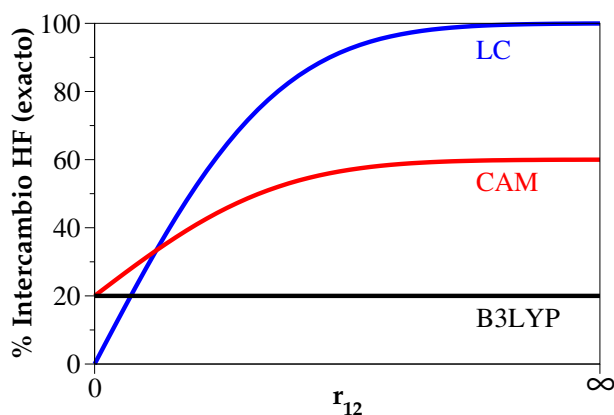
De acuerdo con la expresión anterior, el intercambio en  $r_{12} = 0$  no incluye nada de intercambio HF, mientras que a distancias infinitas,  $r_{12} \rightarrow \infty$ , todo el intercambio es el exacto (HF). Posteriormente, Yanai y colaboradores introdujeron más flexibilidad en el esquema de división del término de repulsión interelectrónica, añadiendo dos parámetros a la expresión (2.81) que permiten que la contribución HF sea variable en  $r_{12} = 0$  y en  $r_{12} \rightarrow \infty$ . Esta extensión se denomina método de atenuación de Coulomb (*Coulomb Attenuating Method*, CAM), y se expresa de la forma,

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - [\alpha + \beta \text{erf}(\mu r_{12})]}{r_{12}} + \frac{\alpha + \beta \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} \quad (2.82)$$

donde los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  controlan la contribución de intercambio exacto en función de  $r_{12}$ .

Yanai y colaboradores optimizaron concretamente los parámetros empleando el funcional BLYP para el intercambio de corto alcance,  $V_{XC}^{SR}$ , basándose en el funcional B3LYP, del que se

<sup>7</sup>Los estados excitados son accesibles con las técnicas dependientes del tiempo, expuestas en la siguiente sección.



**Figura 2.3** – Cantidad de intercambio HF incluido en el funcional de intercambio,  $V_X$ , determinado con distintas aproximaciones, en función de la distancia interelectrónica. Adaptado de [Yanai 04].

toman los valores de la corrección de gradiente al funcional, es decir, los parámetros  $b$  y  $c$  de la Ecuación (2.80). Por su parte, eligiendo los valores  $\alpha = 0,2$  y  $\alpha + \beta = 0,6$ , se consigue que la contribución del intercambio exacto, parámetro  $a$  en (2.80), varíe de 0.2 a 0.6 para  $r_{12}$  entre cero e infinito, dando lugar al funcional CAM-B3LYP. En la Figura 2.3 se presenta la variación de la contribución del intercambio exacto en función de la distancia interelectrónica con el funcional B3LYP, el de corrección de largo alcance (LC) de Tawada y colaboradores [Tawada 04] y el del método CAM de Yanai y colaboradores [Yanai 04].

El funcional CAM-B3LYP ofrece resultados similares a B3LYP en muchos casos, pero mejorando, por ejemplo, la descripción de los estados de transferencia de carga, cuya energía se calcula mediante las técnicas dependientes del tiempo que se exponen en la siguiente sección.

#### 2.2.4. DFT dependiente del tiempo

De acuerdo con el primer teorema de Hohenberg-Kohn, queda claro que DFT es una teoría del estado fundamental. Sin embargo es posible extender su aplicación a estados excitados introduciendo un potencial dependiente del tiempo (TD). De hecho, en 1984, Runge y Gross formularon un teorema que supone la extensión del primer teorema de Hohenberg-Kohn a sistemas dependientes del tiempo [Gross 85], en el que se demuestra que para una función de onda inicial, existe una correlación unívoca entre el potencial dependiente del tiempo externo y la densidad dependiente del tiempo correspondiente. Es decir, la función de onda dependiente del tiempo queda definida por la densidad,  $\Psi[\rho](\mathbf{r}, t)$ , por lo que cualquier propiedad dependiente del tiempo es también un funcional de la densidad, como ocurre con las propiedades estáticas en virtud del teoremas de Hohenberg-Kohn, y por tanto también lo son las energías de excitación. Este teorema es la base de los métodos DFT dependientes del tiempo (TDDFT).

Para determinar la densidad dependiente del tiempo se minimiza la integral de acción en lugar de la energía. Esta integral se define de la forma,

$$A[\rho] = \int_{t_0}^{t_1} dt \langle \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) | i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{H}(\mathbf{r}, t) | \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \rangle \quad (2.83)$$

y puede dividirse en un funcional universal, y una parte que depende del potencial externo total, que incluye la interacción con los núcleos y el potencial dependiente del tiempo, es decir,

$$A[\rho] = B[\rho] - \int_{t_0}^{t_1} dt \int \rho(\mathbf{r}, t) [V_{Ne}(\mathbf{r}) + V_t(\mathbf{r}, t)] d\mathbf{r} \quad (2.84)$$

donde  $V_t(\mathbf{r}, t)$  es el potencial externo dependiente del tiempo, y  $B[\rho]$  es el funcional universal (análogo al potencial estático  $F[\rho]$ ), dado por:

$$B[\rho] = \int_{t_0}^{t_1} dt \langle \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) | i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{T}_{el}(\mathbf{r}) - \hat{V}_{ee}(\mathbf{r}) | \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \rangle \quad (2.85)$$

La densidad se puede obtener entonces mediante una formulación dependiente del tiempo del método Kohn-Sham, en la que se define un sistema de referencia no interactuante sometido a un potencial externo dependiente del tiempo,  $v^{TD-KS}(\mathbf{r}, t)$ , que da lugar a la densidad dependiente del tiempo exacta. La función de onda resultante,  $\Psi_S$ , es un determinante de Slater en el que cada orbital se obtiene resolviendo la correspondiente ecuación monoeléctrica,

$$i \frac{\partial}{\partial t} \psi(\mathbf{r}, t) = \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 + V_{ne}(\mathbf{r}) + v^{TD-KS}(\mathbf{r}, t) \right] \psi(\mathbf{r}, t) \quad (2.86)$$

que es la versión dependiente del tiempo de la Ecuación (2.58), proporcionando los orbitales que dan lugar a la densidad del sistema real,

$$\rho_S(\mathbf{r}, t) = \sum_i |\psi_i(\mathbf{r}, t)|^2 = \rho_{exacta}(\mathbf{r}, t) \quad (2.87)$$

Siguiendo la analogía con la formulación KS original, en la versión TD se calcula el funcional  $B_S[\rho]$  del sistema de referencia, dado por,

$$B_S[\rho] = \int_{t_0}^{t_1} dt \langle \Psi_S(\mathbf{r}, t) | i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{T}_{el}(\mathbf{r}) | \Psi_S(\mathbf{r}, t) \rangle \quad (2.88)$$

en lugar de la energía cinética  $T_S[\rho]$ , y se define finalmente el funcional de la integral de acción como,

$$A[\rho] = B_S[\rho] - J^{TD}[\rho] - V_{Ne}^{TD}[\rho] - V_t^{TD}[\rho] - A_{XC}[\rho] \quad (2.89)$$

donde  $J^{TD}[\rho]$  y  $V_{Ne}^{TD}[\rho]$  tienen una forma similar a sus contrapartidas independientes del tiempo, pero integrando en este caso la variable temporal entre  $t_0$  y  $t_1$ .  $V_t^{TD}[\rho]$  se calcula de forma similar a  $V_{Ne}^{TD}[\rho]$  empleando el potencial dependiente del tiempo y  $A_{XC}[\rho]$  es la parte de correlación e intercambio de la integral de acción, que se define como sigue,

$$A_{XC}[\rho] = B_S[\rho] - J^{TD}[\rho] - B[\rho] \quad (2.90)$$

La minimización de la función aplicando el método de Euler-Lagrange conduce, como en el caso independiente del tiempo, a la forma de calcular los orbitales espaciales del sistema de referencia, indicando la forma del potencial  $v^{TD-KS}$  de la Ecuación (2.86). Se obtiene así,

$$i\frac{\partial}{\partial t}\psi(\mathbf{r}, t) = \left[ -\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{ne}(\mathbf{r}) + V_t(\mathbf{r}, t) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2, t)}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{r}_2|} + \frac{\delta A_{XC}[\rho]}{\delta\rho(\mathbf{r}, t)} \right] \psi(\mathbf{r}, t) \quad (2.91)$$

de donde se puede extraer la expresión para el potencial de Kohn-Sham dependiente del tiempo, dada por,

$$v^{TD-KS}(\mathbf{r}, t) = V_t(\mathbf{r}, t) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2, t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}_2|} + \frac{\delta A_{XC}[\rho]}{\delta\rho(\mathbf{r}, t)} \quad (2.92)$$

Comparando este potencial con su análogo estático,  $v^{KS}(\mathbf{r})$ , definido en la Ecuación (2.67), se observa que la versión TD añade el potencial externo dependiente del tiempo,  $V_t(\mathbf{r}, t)$ , y, además, cambia la definición de la parte de correlación e intercambio, que debemos introducir para esta nueva situación y que, en general cabe esperar que dependa del tiempo. Sin embargo, en lugar de construir nuevos funcionales de correlación e intercambio, se suele recurrir a la aproximación adiabática de la densidad local (*Adiabatic Local Density Approximation*, ALDA), que se basa en que la densidad cambia lentamente con el tiempo<sup>8</sup> y que permite emplear los mismos funcionales obtenidos en la formulación KS independiente del tiempo.

Nos queda *únicamente* definir la forma del potencial externo dependiente del tiempo y resolver las ecuaciones anteriores para obtener la densidad,  $\rho(\mathbf{r}, t)$  [Dreuw 05]. Así, para calcular el espectro de absorción, podemos considerar el potencial dependiente del tiempo como el resultante de la interacción con el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética, como veremos en el Capítulo 4. La resolución de estas ecuaciones es, sin embargo, complicada, y para el caso interacciones poco intensas, se pueden emplear tratamientos perturbativos de primer orden, como las funciones de respuesta lineales (*Linear Response*, LR), ya desarrollados ampliamente en el contexto de los métodos basados en la función de onda para obtener propiedades asociadas con segundas derivadas, dando lugar al método de perturbaciones acopladas de Hartree-Fock (*Coupled-Perturbed Hartree-Fock*, CPHF) [McWeeny 62, Stevens 63]. En el caso de la densidad electrónica, la respuesta lineal ( $\delta\rho$ ) tras la interacción con un potencial externo dependiente del tiempo ( $\delta V_{ext}(\mathbf{r}, t)$ ) viene dada por,

$$\delta\rho(\mathbf{r}, \omega) = \int \chi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) \delta V_{ext}(\mathbf{r}', \omega) d\mathbf{r}' \quad (2.93)$$

donde hemos sustituido la dependencia temporal, por la dependencia con la frecuencia,  $\omega$ , asociada al potencial externo, y donde  $\chi(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega)$  es la función de respuesta lineal para la densidad. Aprovechando la formulación de Kohn-Sham, podemos expresar la respuesta de la densidad exacta a través de la función de respuesta del sistema de referencia, lo que nos permite emplear

<sup>8</sup>El término *local* hace referencia aquí a una localidad temporal

los métodos bien establecidos para la función de onda. La respuesta de la densidad se calcula entonces como sigue,

$$\delta\rho(\mathbf{r}, \omega) = \int \chi_S(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) \delta V_{eff}(\mathbf{r}', \omega) d\mathbf{r}' \quad (2.94)$$

donde el potencial efectivo  $\delta V_{eff}$  engloba todos las componentes de energía potencial,

$$\delta V_{eff}(\mathbf{r}', \omega) = \delta V_{eff}(\mathbf{r}', \omega) + \int \frac{\delta\rho(\mathbf{r}'', \omega)}{\mathbf{r}' - \mathbf{r}''} d\mathbf{r}'' + \delta v_{XC}(\mathbf{r}', \omega) \quad (2.95)$$

Para resolver estas ecuaciones se pueden emplear las formulaciones de matrices densidad desarrolladas dentro de la teoría HF [McWeeny 60], lo que implica un proceso iterativo. La función de respuesta lineal para el sistema no interactuante se puede escribir como sigue,

$$\chi_s(\mathbf{r}, \mathbf{r}', \omega) = \sum_a^{n(oc)} \sum_{i>n}^{virt} n_a \psi_a(\mathbf{r}) \psi_i(\mathbf{r}) \psi_i(\mathbf{r}') \psi_a(\mathbf{r}') \left( \frac{1}{(\epsilon_a - \epsilon_i) + \omega} + \frac{1}{(\epsilon_a - \epsilon_i) - \omega} \right) \quad (2.96)$$

donde  $\psi_i$  y  $\epsilon_i$  son los orbitales y energías del  $i$ -ésimo orbital Kohn-Sham, con lo que queda claro que en este enfoque se emplean también los orbitales virtuales de Kohn-Sham, incluyendo, únicamente, términos monoexcitados.

La perturbación en la que estamos interesados es un campo eléctrico oscilante de frecuencia  $\omega$ ,  $|\mathbf{E}| = E_0 \cos(\omega t)$ , que describe razonablemente bien el efecto de la radiación electromagnética de esa frecuencia. La respuesta del momento dipolar de la molécula a esta perturbación se puede expresar, hasta primer orden, de la forma,

$$\boldsymbol{\mu}(\omega) = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\alpha}(\omega)\mathbf{E} \quad (2.97)$$

donde  $\boldsymbol{\mu}_0$  es el momento dipolar permanente y  $\boldsymbol{\alpha}(\omega)$  es la polarizabilidad dependiente de la frecuencia,  $\boldsymbol{\alpha}(\omega)$ , que describe la respuesta del momento dipolar al campo eléctrico. Una vez obtenida la respuesta de primer orden de la densidad,  $\delta\rho(\mathbf{r}, \omega)$ , esta se puede emplear para calcular  $\boldsymbol{\alpha}(\omega)$  mediante [van Gisbergen 98],

$$\alpha_{ij}(\omega) = -2 \int d\mathbf{r} \delta\rho(\mathbf{r}, \omega) r_j \quad (2.98)$$

que se puede expresar también como la suma sobre estados,

$$\alpha(\omega) = \sum_m \frac{f_m}{\omega_m^2 - \omega^2} \quad (2.99)$$

donde se aprecia que la polarizabilidad muestra divergencias (polos) para los valores de frecuencia correspondientes a las energías de excitación exactas ( $\omega_i$ ), por lo que a partir de la función de polarizabilidad podremos calcular estas energías de excitación. El término  $f_m$  es la fuerza del oscilador, que determina la intensidad del tránsito monofotónico.

El método TDDFT permite calcular tanto las energías de los estados excitados, como la intensidad de las bandas de absorción, empleando únicamente propiedades del estado fundamental, como los orbitales y energías KS. Estos métodos presentan, sin embargo, algunas limitaciones. Por ejemplo, la introducción de los orbitales virtuales del sistema de referencia, mal descritos para altas energías, hace que el método funcione mejor para describir estados electrónicos de baja energía. Además, como se observa en la Ecuación (2.96), se incluyen solo términos monoexcitados, por lo que los estados que necesiten términos bi-excitados y superiores no quedan bien descritos. Por último, como ya hemos indicado, en el cálculo de estados de transferencia de carga es necesario emplear un funcional que describa correctamente el comportamiento asintótico, como es el caso de los funcionales con correcciones al intercambio de largo alcance que hemos descrito anteriormente.

## 2.3. IMPLEMENTACIÓN PRÁCTICA DE MÉTODOS QM

Hasta ahora, hemos presentado una gran variedad de métodos mecanocuánticos, mostrando las ecuaciones fundamentales que, en principio, permiten obtener las energías, funciones de onda o densidades electrónicas. Sin embargo, cabe destacar que, en todos los casos, las expresiones teóricas son suficientemente complejas como para que su resolución analítica no sea posible. Hace falta desarrollar, por tanto, una formulación práctica de estas ecuaciones que permita su resolución sistemática mediante su implementación en programas de química computacional.

### 2.3.1. Funciones de base

La función de onda electrónica es una entidad matemática de gran complejidad, que se puede representar como una combinación de determinantes de Slater, formados a su vez por espín-orbitales de la forma  $\chi(\mathbf{r}, w) = \omega(w)\psi(\mathbf{r})$ , donde  $\omega$  es una función de espín y  $\psi$  un orbital espacial. Los cálculos mecanocuánticos proporcionan la forma de estos orbitales, normalmente a partir de un cálculo iterativo auto-consistente, HF o KS, en el que, si bien pueden emplearse métodos numéricos [Kobus 97], lo más frecuente es recurrir a una combinación lineal de estos orbitales en términos de funciones más manejables, es decir,

$$\psi_i(\mathbf{r}) = \sum_a C_{ai} \phi_a(\mathbf{r}) \quad (2.100)$$

donde  $C_{ai}$  son los coeficientes la combinación lineal y las funciones monoeléctricas,  $\phi_a(\mathbf{r})$ , son las llamadas funciones de base, ya que su papel es similar al de los vectores que forman una base vectorial. En este sentido, cabe destacar que la dimensión del espacio funcional es infinita, es decir, es necesario, en principio, emplear infinitas funciones de base, por lo que, al limitarnos a un número finito de términos, esta combinación lineal truncada supone una aproximación, mejor cuanto mayor sea el tamaño de la base o cuanto mejor describan las funciones de base el comportamiento del orbital molecular.

Si las funciones de base escogidas están centradas en los átomos, se obtiene la aproximación de los orbitales moleculares mediante combinación lineal de orbitales atómicos<sup>9</sup> (OM-CLOA), que es el enfoque más común en las aplicaciones de Química Cuántica. Para construir estas funciones atómicas, pueden emplearse expresiones basadas en los orbitales hidrogenoides incluyendo parámetros variacionales, que en coordenadas esféricas polares,  $r, \Theta, \varphi$ , toman la forma siguiente,

$$\phi_{n,l,m}^{STO}(r, \Theta, \varphi) = \mathcal{N}Y_{l,m}(\Theta, \varphi)r^{n-1}e^{-\xi r} \quad (2.101)$$

con lo que las funciones vienen definidas por los números cuánticos  $(n, l, m)$ ,  $\mathcal{N}$  es una constante de normalización,  $Y_{l,m}$  son los armónicos esféricos que representan la parte angular de la función y  $\xi$  es un parámetro variacional. Entre los números cuánticos empleados destaca el número  $l$ , que define los distintos tipos de simetría angular de la función, dando lugar a funciones tipo  $s$  ( $l = 0$ ),  $p$  ( $l = 1$ ),  $d$  ( $l = 2$ )...

Los funciones descritas por la Ecuación (2.101) se conocen como orbitales tipo Slater (*Slater Type Orbitals*, STO) y resultan muy adecuadas para representar los orbitales moleculares. En particular, su parte radial,  $r^{n-1}$ , presenta una discontinuidad (cúspide) en  $r = 0$ , lo que permite describir correctamente el comportamiento de la función en torno al núcleo. Sin embargo, en la práctica, este tipo de funciones conducen a integrales moleculares difíciles de manejar. Por esta razón, se suelen emplear funciones Gaussianas, que se pueden definir tanto en coordenadas esféricas,

$$\phi_{n,l,m}^{GTO(esf)}(r, \Theta, \varphi) = \mathcal{N}Y_{l,m}(\Theta, \varphi)r^{2n-2-l}e^{-\xi r^2} \quad (2.102)$$

como en coordenadas Cartesianas,

$$\phi_{n,l,m}^{GTO(Cart)}(x, y, z) = \mathcal{N}x^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}r^{2n-2-l}e^{-\xi r^2} \quad (2.103)$$

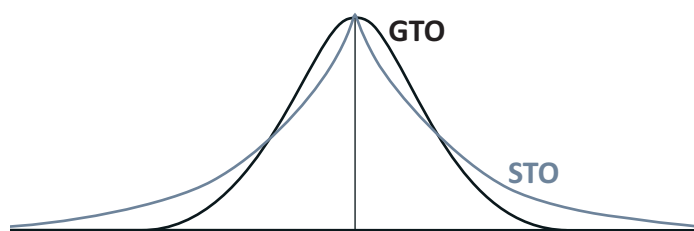
donde, en este caso, se emplean los números enteros  $l_x, l_y$  y  $l_z$  cuya suma,  $l = l_x + l_y + l_z$ , determina la simetría angular. Ambas formulaciones no son, en realidad, totalmente equivalentes. En concreto, mientras que el número de armónicos esféricos es  $2l + 1$  (1 función  $s$ , 3  $p$ , 5  $d$ , 7  $f$ , etc), el número funciones con una determinada simetría es igual a las posibilidades de escoger  $l_x, l_y$  y  $l_z$  de forma que sumen un determinado número  $l$ , lo que da lugar a 1 función  $s$ , 3  $p$ , 6  $d$  y 10  $f$ , con lo que aumenta el número de funciones para  $l > 1$  (aunque las funciones resultantes no son linealmente independientes). Por tanto, habrá que tener en cuenta en que coordenadas se definen las funciones de base.

La ventaja de los orbitales GTO se manifiesta en la evaluación de integrales moleculares en las que intervienen varios orbitales. Aprovechando las propiedades de la funciones Gaussianas, concretamente el hecho de que el producto de dos Gaussianas sea otra Gaussiana, se pueden simplificar notablemente estas integrales. De hecho, la mayor parte de los códigos de mecánica

---

<sup>9</sup>Aunque hablemos de orbitales atómicos, no se emplean exactamente las soluciones de una función mono-electrónica para átomos, sino construcciones matemáticas más convenientes inspiradas en estas.





**Figura 2.4** – Comportamiento cualitativo de la parte radial en funciones tipo STO y GTO. Tomada de [Cerón-Carrasco 09b].

cuántica emplean este tipo de funciones<sup>10</sup>, aunque su descripción del comportamiento radial de la función sea algo deficiente, como se muestra en la Figura 2.4, en la que se compara la forma radial de una función STO y una función GTO, apreciándose que los GTO carecen de cúspide y decaen con la distancia mucho más rápidamente que los STO. Por esta razón, es necesario emplear más funciones de base de tipo GTO para describir adecuadamente la función de onda en comparación con el número necesario de STO, pero incluso así, las simplificaciones asociadas a los GTO compensan este aumento.

Hay que indicar que la introducción de una base para representar los orbitales moleculares hace que el coste computacional de los algoritmos para resolver las ecuaciones químico-cuánticas pase a depender precisamente del número de funciones de base empleadas, pudiéndose expresar dicho coste (por ejemplo en segundos de CPU) mediante una expresión del tipo  $\text{CPU} = \mathcal{C}M^n$ , donde  $\mathcal{C}$  es una constante de proporcionalidad,  $M$  es el número de funciones de base (lo que se conoce como tamaño de la base o tamaño espectral) y  $n$  indica la dependencia exponencial y es característica del método. La estrategia más habitual para introducir entonces un número mayor de funciones GTO manteniendo un menor número total de funciones de base,  $M$ , es agrupar varios GTO, fijando los coeficientes para conseguir el mejor ajuste a un STO análogo. Las funciones resultantes se conocen como orbitales de tipo Gaussiano contraídos (*Contracted Gaussian Type Orbital*, CGTO),

$$\phi_{n,l,m}^{CGTO} = \sum_j a_j \phi_j^{GTO} \approx \phi_{n,l,m}^{STO} \quad (2.104)$$

donde los coeficientes  $a_j$  se mantienen fijos durante los cálculos.

Los orbitales resultantes se denominan STO-NG [Hehre 69], donde  $N$  es el número de GTOs empleadas en la contracción, que suele estar entre 1 y 6. Obviamente, cuanto mayor sea  $n$  mayor es el parecido entre el CGTO y el STO correspondiente, lo que se asocia a una mejor descripción del orbital molecular. Por esta razón, teniendo en cuenta la ausencia de cúspide en los GTO, cuando quedamos describir mejor la región nuclear emplearemos una contracción de mayor orden, lo que será necesario para las funciones correspondientes a los orbitales atómicos más internos.

<sup>10</sup>Es tal su importancia, que dieron nombre a uno de los programas más populares de Química Cuántica usados en la actualidad, *Gaussian*, que fue inicialmente desarrollado por Pople y colaboradores en los años 70 utilizando estas funciones de base [Hehre 73].

A la hora de elegir las funciones de base, la opción más sencilla es escogerlas estableciendo una correspondencia uno a uno entre las funciones centradas en cada átomo y los orbitales atómicos que forman las capas llenas o semi-llenas. Por ejemplo, para H, que posee una configuración atómica  $1s^1$ , escogemos una función de base de tipo  $s$ , y para Li ( $1s^2 2s^1$ ) o O ( $1s^2 2s^2 2p^4$ ) escogemos dos orbitales tipo  $s$  ( $1s$  y  $2s$ ) y 3 tipo  $p$  ( $2p_x$ ,  $2p_y$  y  $2p_z$ ). La base resultante se conoce como **base mínima**, ya que es la base de menor tamaño que contiene las características básicas del sistema químico. Sin embargo, la descripción ofrecida por este tipo de bases es muy limitada y son solo útiles para estudios cualitativos. La extensión de las bases se realiza entonces introduciendo funciones de base adicionales centradas sobre cada átomo, de forma que se aumenta la flexibilidad en la descripción de los orbitales moleculares.

Una estrategia para añadir funciones adicionales consiste en dividir cada función de la base mínima en varias funciones con igual simetría angular ( $l$ ) pero distinto tamaño. Con esto se consigue un efecto similar al de los CGTO, pero pudiendo ajustar los coeficientes durante el cálculo. Normalmente, los orbitales internos no sufren variaciones importantes, por lo que la división se suele limitar a los orbitales de valencia (*Valence Splitting*, VS). Dependiendo del número de funciones de base que se empleen para describir cada función de la base mínima se distinguen bases doble-zeta (DZ), triple-zeta (TZ), etc., que indican la división de cada función en dos, tres, etc.

Otra posibilidad es añadir funciones de mayor número cuántico  $l$  respecto al máximo en la base mínima, lo que se conoce como **funciones de polarización**. Se añaden así funciones  $p$  sobre hidrógenos o  $d$  sobre los elementos de la segunda fila (Li-Ne), pudiendo incluir funciones de un número  $l$  aún mayor. Con esto se consigue mayor flexibilidad en la descripción angular de cada orbital molecular. En esta misma línea, se pueden añadir funciones de base que, aunque tengan un número  $l$  ya contenido en la base mínima, lleven un exponente orbital,  $\xi$ , muy bajo, de forma que el orbital decaiga mucho más lentamente, lo que se conoce como **funciones difusas**, que resultan de gran utilidad en los casos en los que la densidad electrónica se extienda a regiones muy alejadas del núcleo, como ocurre en los aniones.

Se han desarrollado una gran cantidad de funciones de base de tipo GTO incorporadas en la mayor parte de los programas químico-cuánticos. Uno de los conjuntos más empleados son las funciones de base de Pople. Su nomenclatura general es:  $w-xy[z][++]G[A, B]$  (los términos entre corchetes pueden aparecer o no), donde  $w$  indica el número de GTO empleados para contraer los orbitales atómicos internos,  $xy$  (doble-zeta) o  $xyz$  (triple zeta) indica el número de GTO en cada orbital atómico de valencia,  $+$  indica la presencia de funciones difusas sobre todos los átomos distintos de hidrógeno y  $++$  extiende estas funciones también sobre hidrógenos y, finalmente, el último término indica las funciones de polarización que se incluyen sobre átomos de la segunda fila y superiores ( $A = d, f \dots$ ) y sobre los hidrógenos ( $B = p$ ). Así, por ejemplo, la base 6-31G(d) es una base con doble-zeta para los orbitales de valencia, con 6 GTOs para describir los CGTOs internos y 3 y 1 GTO para describir los CGTOs de valencia, incluyendo además funciones de polarización sobre los elementos de la segunda fila, y la base 6-311++G(d,p), es una triple-zeta de valencia, con funciones difusas sobre todos los átomos y funciones de polarización  $d$  sobre los elementos de la segunda fila y  $p$  sobre los hidrógenos.

Como vemos, es posible aumentar de forma sistemática el tamaño de la base, lo que permite

estudiar su efecto en los cálculos. En este sentido hay que destacar que, aunque cabe esperar que los orbitales moleculares queden mejor descritos empleando bases de gran tamaño, no siempre obtendremos mejores resultados con bases más extensas. De hecho, dependiendo del método teórico será necesario concretar un tamaño adecuado al mismo. Así, en los casos en los que se incluya una gran cantidad de correlación electrónica, debe darse a la función de onda la flexibilidad necesaria para dar cuenta de este efecto, por lo que deben introducirse tamaños de base más bien grandes. Por otro lado, si se emplean bases demasiadas funciones de polarización en métodos que no incluyen correlación, pueden aparecer artefactos. Se habla entonces de la necesidad de emplear bases equilibradas.

### 2.3.2. Evaluación de integrales moleculares

El desarrollo (2.100) proporciona una expresión concreta para los orbitales moleculares en términos de las funciones de base, por lo que la aplicación de todos los métodos mecanocuánticos comienza con la obtención de los coeficientes de este desarrollo. Con esto podemos construir los determinantes de Slater, que proporcionan directamente los resultados de los métodos monodeterminanteles, HF y KS-DFT, y constituyen el punto de partida de los métodos post-Hartree-Fock.

En el caso del método de Hartree-Fock restringido (RHF) dado por la Ecuación (2.27), Root-haan y Hall [Roothaan 51, Hall 51] reformularon las ecuaciones, introduciendo las expansiones en orbitales moleculares y proporcionando así un método práctico para obtener los coeficientes (y por tanto los orbitales moleculares) y las energías de los orbitales. Así, el conjunto de ecuaciones acopladas (2.27) puede reescribirse como sigue,

$$\hat{f}_i \sum_a C_{ai} \phi_a(\mathbf{r}) = \epsilon_i \sum_a C_{ai} \phi_a(\mathbf{r}) \quad (2.105)$$

donde hemos usado el desarrollo (2.100) y donde  $f_i$  es el operador de Fock en coordenadas espaciales,  $\hat{f} = \left[ \hat{h}_i + \sum_j^{n/2} (2\hat{J}'_j - \hat{K}'_j) \right]$ . El primer término aquí,  $\hat{h}_i$ , da cuenta de la energía cinética y potencial electrón-núcleo, y el segundo, que llamaremos  $\hat{g}_{ij}$ , describe la interacción promedio entre electrones. Si multiplicamos por la derecha por el conjugado de uno de los orbitales atómicos,  $\phi_b^*$ , e integramos las coordenadas espaciales, obtenemos,

$$\sum_a c_{ai} \langle \phi_b | \hat{f} | \phi_a \rangle = \epsilon_i \sum_a c_{ai} \langle \phi_b | \phi_a \rangle \quad (i = 1, M) \quad (2.106)$$

que es un sistema de  $M$  (tamaño de la base) ecuaciones acopladas que pueden escribirse de forma más compacta matricialmente, como sigue,

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\epsilon \quad (2.107)$$

donde  $\mathbf{C}$  es la matriz de los coeficientes de las combinaciones lineales de todos los orbitales moleculares,  $C_{ai}$ ,  $\epsilon$  es una matriz diagonal conteniendo las energías de los orbitales,  $\epsilon_i$ , y los elementos de las matrices  $\mathbf{F}$  (matriz de Fock) y  $\mathbf{S}$  (matriz de solapamiento) vienen dados por:

$$F_{ba} = \langle \phi_b | \hat{f} | \phi_a \rangle \quad (2.108)$$

$$S_{ba} = \langle \phi_b | \phi_a \rangle \quad (2.109)$$

Las integrales moleculares que forman los elementos de las matrices de Fock y de solapamiento son, de hecho, una pieza clave en la resolución de las ecuaciones de Hartree-Fock, y una vez determinadas el resto del trabajo consiste en una serie de transformaciones matriciales. Teniendo en cuenta la definición de  $\hat{f}$ , que contiene un término monoeléctrico,  $\hat{h}(\mathbf{r}_1)$  y otro que introduce la interacción promedio con el resto de orbitales,  $\hat{g}(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2)$ , los elementos de la matriz de Fock se puede escribir de la forma [Szabo 96],

$$F_{ba} = H_{ba} + G_{ba} = T_{ba} + V_{ba}^{Ne} + \sum_i \sum_{cd}^{n/2} C_{ci} C_{di}^* [2(ba|dc) - (ba|cd)] \quad (2.110)$$

donde los elementos  $H_{ba}$  contienen las integrales monoeléctricas de energía cinética y potencial electrón-núcleo,

$$H_{ba} = T_{ba} + V_{ba}^{Ne} = \int \phi_b^*(\mathbf{r}_1) \left[ \frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_A \frac{Z_A}{|\mathbf{r}_1 - \mathbf{R}_A|} \right] \phi_a(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (2.111)$$

y las integrales bielectrónicas que aparecen en el término interelectrónico,  $G_{ba}$ , se han denotado como,

$$(ba|dc) = \int \phi_b^*(d\mathbf{r}_1) \phi_a(d\mathbf{r}_1) r_{12}^{-1} \phi_d^*(\mathbf{r}_2) \phi_c(\mathbf{r}_2) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.112)$$

Como vemos, los elementos de la matriz de Fock dependen de los coeficientes de la combinación lineal (la matriz densidad), que también aparece en la ecuación matricial (2.107), por lo que esta debe ser resuelta de forma iterativa, realizando las manipulaciones matriciales necesarias en cada ciclo, y actualizando la matriz de Fock de acuerdo con la Ecuación (2.110), hasta que los cambios en los coeficientes que se producen entre dos iteraciones consecutivas sea menor que cierto criterio de convergencia establecido [Szabo 96]. Un procedimiento similar se sigue al introducir el desarrollo OM-CLOA en las ecuaciones UHF (2.32a) y (2.32b) [Pople 54].

Las integrales bielectrónicas (2.112) que aparecen en la matriz de Fock son la parte más difícil de manejar en la resolución de las ecuaciones de Hartree-Fock, no solo por su evaluación, sino también por su almacenamiento, ya que, en principio, solo es necesario calcularlas al comienzo del cálculo y pueden guardarse en disco para leerse en cada ciclo. Concretamente, el espacio de almacenamiento requerido aumenta con el tamaño de la base en proporción  $M^4$  y, por ejemplo, para una base formada por solo 100 funciones, el número de integrales bielectrónicas que habría que almacenar, descartando las que son equivalentes, es de 12.753.775 [Szabo 96], por lo que su almacenamiento en doble precisión (8 bytes por número real) requiere de unos 100 MB, mientras que para un sistema con el doble de funciones hace falta m de 1.5 GB. Podemos imaginar fácilmente que para tamaños de base más elevados, que son los que se obtienen en sistemas de

cierta envergadura, como los que tratamos en este trabajo, los requisitos de almacenamiento aumenten a valores excesivos.

Por esta razón, para tratar sistemas de tamaño medio es necesario disponer de implementaciones que manejen eficientemente el almacenamiento de las integrales. Una primera mejora consiste en realizar un cribado previo, que reduzca el número de integrales a evaluar. Para ello se puede emplear la desigualdad de Cauchy-Schwarz, que para el caso de las integrales bielectrónicas se puede introducir como,

$$(ab|cd) \leq \sqrt{(ab|ab)}\sqrt{(cd|cd)} \quad (2.113)$$

lo que ofrece un límite superior para el valor de la integral  $(ab|cd)$  una vez conocidos los valores de las integrales  $(ab|ab)$  y  $(cd|cd)$ . Calculando por tanto inicialmente las integrales del tipo  $(ab|ab)$  podremos determinar qué integrales de las que faltan caen por debajo de un valor umbral preestablecido que nos permita despreciarlas, reduciendo así el número de integrales que deben ser calculadas y almacenadas.

Para conseguir un ahorro de almacenamiento en disco aún mayor, se puede recurrir a los **métodos directos** [Almlöf 95], en los que se sustituye la escritura en disco por el cálculo de las integrales bielectrónicas según se vayan necesitando. Este procedimiento, además de ahorrar espacio de almacenamiento, evita una excesiva carga de las operaciones de lectura/escritura (*Input/Output*, I/O) en disco, que son bastante lentas. De hecho, empleando esquemas eficientes para actualizar la matriz de Fock en cada ciclo, se consigue reducir el tiempo necesario para realizar los cálculos.

Necesitamos además métodos eficientes para evaluar las integrales monoeléctricas y bielectrónicas que aparecen en los elementos la matriz de Fock (2.110). Algunos algoritmos disponibles para este fin son PRIMS de Gill y Pople [Gill 91] (implementado en *Gaussian*) o SEWARD de Lindh y colaboradores [Lindh 91] (implementado en *Molpro* y *Molcas*). Sin embargo, por muy eficientes que resulten los métodos de evaluación de las integrales, esta parte del cálculo supone efectivamente el cuello de botella del mismo y, para sistemas mayores de un cierto tamaño, harán imposible su realización. Por este motivo, en algunos casos será necesario introducir aproximaciones adicionales que reduzcan el coste computacional de estas integrales. Un ejemplo es el método de **resolución de la identidad** (*Resolution of the Identity*, RI), también conocido como de **ajuste de la densidad** (*Density Fitting*, DF). En estos métodos, el producto de funciones de base correspondientes al mismo electrón en la integral (2.112) se expresa en términos de una combinación lineal de funciones monoeléctricas auxiliares,  $\eta(\mathbf{r}_1)$ , de la forma,

$$\phi_b^*(\mathbf{r}_1)\phi_a(\mathbf{r}_1) = \sum_k^L c_{k,ab}\eta_k(\mathbf{r}_1) \quad (2.114)$$

donde  $L$  es el tamaño de la base auxiliar y existen distintas estrategias para obtener los coeficientes de la combinación [Kendall 97]. El desarrollo de estos métodos culmina en la redefinición de las integrales bielectrónicas en términos de integrales de tres índices,

$$(ab|cd) = \sum_t^L (ad|t)(t|cd) \quad (2.115)$$

donde el subíndice  $t$  hace referencia a las funciones  $\Theta_t$  que se obtienen rotando las funciones  $\eta_k$  originales durante el proceso de obtención de los coeficientes. El resultado final es que se expresan las integrales de cuatro índices como productos de integrales de tres índices que son más rápidas de evaluar, lo que puede reducir el tiempo de cálculo. Para que la igualdad anterior sea exacta es sin embargo necesario emplear un conjunto infinito de funciones  $t$ , por lo que hemos de recurrir a desarrollos truncados que introducen una aproximación adicional en el cálculo. Concretamente, para que esta formulación sea más eficiente que la original, debe ocurrir que el tamaño de la base auxiliar,  $L$ , sea significativamente menor que el cuadrado del tamaño de la base principal,  $M^2$ .

Este tipo de enfoques son aplicables tanto a métodos HF como KS-DFT [Dunlap 83, Manby 01, Polly 04] y pueden ser ampliados para aplicarlos a métodos de correlación electrónica como MP2 [Werner 03].

### 2.3.3. Programas de mecánica cuántica

En la actualidad existen una gran cantidad de programas de Química Cuántica que incluyen los métodos teóricos discutidos en este capítulo. En este trabajo hemos empleado principalmente el paquete de programas *Gaussian09* [Frisch 09] que es uno de los más populares. Parte de su éxito se basa en el esfuerzo realizado por sus autores para conseguir implementar una serie de métodos que puedan ser usados de manera fácil con una mínima interacción por parte del usuario<sup>11</sup>, consiguiendo así que cualquier investigador químico, no necesariamente especialista en química computacional, pueda usar con cierta soltura los métodos de la Química Cuántica, lo que ha propiciado que los cálculos de Química Cuántica se hayan convertido en una herramienta de uso rutinario en toda clase de investigaciones experimentales.

Sin embargo, si bien la mejora de métodos, implementación y recursos computacionales permite la generalización, hasta cierto punto, de ese concepto de “caja negra”, en algunos casos puede ser interesante recurrir a métodos que requieran un perfil más experimentado en métodos teóricos, como son los métodos DF introducidos anteriormente, los métodos locales de correlación [Hetzer 98] o los métodos de correlación explícita  $F_{12}$  [Manby 03]. Aunque *Gaussian09* implementa una buena parte de este tipo de metodologías, existen programas más orientados a cálculos de este tipo, como *Molpro* [Werner 10], que en este trabajo se ha empleado en casos puntuales, para el uso de métodos DF-MP2.

En cualquier caso, *Gaussian* lleva implementados algunos algoritmos especialmente interesantes para realizar los estudios incluidos en esta Tesis, como los distintos métodos de solvatación implícita de modelo continuo del disolvente (*Polarizable Continuum Model*, PCM) [Tomasi 94] o la inclusión de gradientes analíticos para muchos de los métodos de cálculo, lo que permite la

---

<sup>11</sup>El término *black box* (caja negra) aparece de forma recurrente en muchas páginas de manual del programa para referirse a este hecho

exploración de las superficies de energía potencial (*Potential Energy Surface*, PES) respectivas, destacando los gradientes en métodos TD [Scalmani 06] que hacen posible la evaluación de la PES de estados excitados.





## CAPÍTULO 3

# Mecánica Molecular y métodos de simulación

Los métodos de la Química Cuántica descritos en el capítulo anterior permiten describir acertadamente los fenómenos en los que la densidad electrónica juega un papel relevante, como el estudio de procesos de transferencia de carga u otras reacciones químicas. Sin embargo, el elevado coste computacional que llevan asociado limita su aplicación a sistemas de, como mucho, unos pocos cientos de átomos. Por contra, los complejos bioquímicos, como las membranas celulares o proteínas requieren la modelización de miles o cientos de miles de átomos, siendo necesarias técnicas más eficientes para evaluar las interacciones moleculares. En este contexto, destacan los métodos de la mecánica molecular, en los que dichas interacciones se calculan mediante modelos sencillos, como muelles para describir enlaces o potenciales de Lennard-Jones para las interacciones dispersivas, con los que se trata de reproducir la superficie de energía potencial, originada realmente por la nube electrónica en el contexto de la aproximación de Born-Oppenheimer. Los métodos de la mecánica molecular proporcionan así expresiones analíticas rápidas de evaluar, en las que se deben introducir términos empíricos como las constantes de fuerza de los muelles, o los parámetros del potencial de Lennard-Jones, que permiten caracterizar el gran número de interacciones no enlazantes que se producen en medios biológicos, responsables de efectos de gran relevancia en distintos mecanismos bioquímicos.

La simplicidad con la que se suelen tratar las interacciones enlazantes impide, sin embargo, estudiar procesos complejos como la ruptura y formación de enlaces, por lo que dichos métodos no son adecuados cuando estemos interesados en la reactividad química, para lo que necesitaremos los métodos mecanocuánticos (QM). Aún en estos casos, podemos introducir en el modelo las interacciones no enlazantes del medio biológico calculadas mediante mecánica molecular (MM) a través de enfoques híbridos QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics). No obstante, estos cálculos siguen siendo demasiado costosos para permitir la exploración exhaustiva del espacio configuracional que suele ser necesaria en el estudio de grandes sistemas biológicos. Para esta labor son más aconsejables los métodos MM, que deben estar acompañados técnicas de simulación eficientes, capaces de generar un número suficientemente alto de conformaciones con un coste computacional asequible. En este capítulo revisamos brevemente las técnicas computacionales asociadas a la mecánica molecular, los modelos híbridos y los métodos de simulación.

### 3.1. MÉTODOS DE MECÁNICA MOLECULAR (MM)

La mecánica molecular (MM) proporciona una vía alternativa a los métodos de la mecánica cuántica para evaluar la superficie de energía potencial, reemplazando la resolución del Hamiltoniano electrónico de la ecuación (2.3) por expresiones empíricas debidamente parametrizadas. Así, tomando como base el trabajo pionero de Hill [Hill 46], en el que se propone una determinación cuantitativa de la energía potencial molecular mediante una expresión analítica en función de enlaces, ángulos y distancias interatómicas incluyendo los efectos de dispersión, los métodos MM proponen la descomposición de la energía en distintos términos enlazantes (enlaces, ángulos y torsiones) y no enlazantes (interacciones dispersivas y electrostáticas). De esta forma, la energía ( $E_{MM}$ ) se puede escribir como sigue,

$$E_{MM} = E_{enlaces} + E_{ángulos} + E_{torsiones} + E_{acoplamiento} + E_{electrostática} + E_{dispersión} \quad (3.1)$$

donde cada término incluye la suma sobre todos los posibles elementos estructurales del sistema (enlaces, ángulo, pares atómicos, etc)

La concreción de la forma funcional de cada término, así como la especificación de los parámetros empíricos, dan lugar a los distintos campos de fuerza. Estos pueden interpretarse mediante modelos clásicos de los que se derivan las expresiones energéticas, como representaciones de bolas y muelles, en las que los núcleos quedan descritos por bolas cargadas que están conectadas por muelles e interactúan elásticamente y electrostáticamente. Desde un punto de vista más general, la forma de las funciones se escoge con el objetivo de reproducir resultados experimentales o cálculos mecanocuánticos, tratando de mantener cierta simplicidad que permita una evaluación rápida de la energía. Otro aspecto importante es la transferibilidad de los parámetros, ya que, para que estas técnicas sean aplicables de forma general, debemos emplear los mismos parámetros para partículas análogas, por ejemplo un carbono aromático, uno alifático o un nitrógeno de amina, independientemente del resto del sistema. Esto se cumple de forma bastante general, siempre que los sistemas que simulemos sean similares a aquellos en los que se validaron los parámetros, lo que limita la aplicación universal de los campos de fuerza.

A continuación describimos la forma más habitual que toman algunos de los términos energéticos de la Ecuación (3.1), distinguiendo entre enlazantes y no enlazantes.

#### 3.1.1. Términos enlazantes

Los términos enlazantes incluyen las interacciones relacionadas directa o indirectamente con los enlaces covalentes de la molécula. Las expresiones suelen ajustarse a datos experimentales espectroscópicos o a resultados obtenidos mediante cálculos cuánticos.

#### Enlaces

Un buen ejemplo de los distintos enfoques que se pueden seguir lo ofrecen los términos asociados a los enlaces covalentes, caracterizados normalmente por una función con un mínimo que

describe la correspondiente curva de potencial disociativa. Para reproducir este comportamiento se puede emplear un función exponencial de tipo Morse. Sin embargo este tipo de funciones no es la adoptada normalmente, ya que no permite una implementación eficiente, y se recurre a desarrollos en serie de Taylor alrededor del mínimo,

$$E_{\text{enlace}}(r_{ij}) = k^{(2)}(r_{ij} - b_0)^2 + k^{(3)}(r_{ij} - b_0)^3 + k^{(4)}(r_{ij} - b_0)^4 + \dots \quad (3.2)$$

donde  $r_{ij}$  es la distancia entre los átomos enlazados  $i - j$ ,  $b_0$  es la distancia de equilibrio del enlace y  $k^{(2)}$ ,  $k^{(3)}$ ,  $k^{(4)}$ , son las constantes de fuerza cuadrática, cúbica, cuártica y así sucesivamente. Obviamente, cuanto mayor sea el orden del desarrollo, mejor descrito estará el potencial pero mayor será el coste asociado al cálculo, por lo que debemos encontrar un balance entre precisión y carga computacional. De esta forma, los campos de fuerza ideados para describir moléculas orgánicas pequeñas, como las serie de campos de fuerza de MM de Allinger [Allinger 77, Allinger 89, Allinger 96] priman la reproducción precisa del potencial real, que permita una exploración extensa de la superficie de energía potencial (*Potential Energy Surface*, PES) intramolecular, y llegan a incluir constantes de fuerza cuártica en sus ultimas versiones. El uso de una serie de Taylor restringe, sin embargo, su aplicación a conformaciones en torno a la de equilibrio, de forma que aunque los términos de orden mayor a dos incluyan efectos anarmónicos, falla al evaluar el potencial en situaciones muy alejadas del mínimo, por lo que no son útiles para describir la ruptura y formación de enlaces. Se suele decir, de hecho, que los campos de fuerza clásicos no permiten describir reactividad química, aunque existan algunos ejemplos de campo de fuerza reactivos diseñados a costa de aumentar la complejidad de las ecuaciones, como es el caso de reaxFF [van Duin 01].

En el extremo opuesto al de los campos de fuerza que describen bien regiones alejadas de las conformaciones de mínima energía, primando precisión frente a eficiencia, encontramos los ideados para describir las interacciones en grandes sistemas biológicos, en los que estamos más interesados en interacciones intermoleculares o cambios conformacionales que no implican una deformación excesiva de los enlaces, y este es el escenario en el que nos moveremos en este trabajo. Teniendo en cuenta, además, el tamaño de este tipo de sistemas, en estos casos se escoge un potencial cuadrático, ya que es más sencillo de evaluar y resulta suficiente para el nivel de descripción interatómica en el que estamos interesados. Algunos ejemplos de campos de fuerza de este tipo son OPLS [Jorgensen 88], CHARMM [MacKerell 98], AMBER [Cornell 95] o GROMOS [van Buuren 93]. En los tres primeros, la expresión del término cuadrático es,

$$E_{\text{enlace}}(r_{ij}) = \frac{1}{2}k_b^{(arm)}(r_{ij} - b_0)^2 \quad (3.3)$$

donde  $k^{(arm)}$  es la constante de fuerza armónica. GROMOS hace uso, sin embargo, de una expresión algo distinta, que es,

$$E_{\text{enlace}}(r_{ij}) = \frac{1}{4}k_b^{(G)}(r_{ij}^2 - b_0^2)^2 \quad (3.4)$$

donde la constante de fuerza  $k_b^{(G)}$  se puede expresar en función de la constante armónica como  $2k_b^{(G)}b_0^2 = k_b^{(arm)}$ .

## Ángulos

La formación de enlaces moleculares lleva asociada ciertas restricciones en los ángulos entre enlaces vecinos, como se induce, por ejemplo, a partir de los modelos de hibridación de orbitales en la teoría de enlace de valencia. Así, por ejemplo, un carbono enlazado a cuatro átomos presenta hibridación  $sp^3$ , lo que impone que los ángulos entre enlaces sean de unos  $109^\circ$ , mientras que si está enlazado a tres átomos, la hibridación es  $sp^2$  y el ángulo entre enlaces de unos  $120^\circ$ . Estos ángulos fijan, por tanto, la posición de equilibrio, y abrirlos o cerrarlos lleva consigo a un aumento de energía que se puede describir también mediante una serie de Taylor, como hemos visto en el caso de los enlaces. En concreto, las formas funcionales que aparecen en los campos de fuerza biológicos en los que estamos interesados son de orden cuadrático,

$$E_{\text{ángulo}}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_a^{(arm)}(\theta_{ijk} - \theta_0)^2 \quad (3.5)$$

donde  $\theta_{ijk}$  es el ángulo que forman los átomos  $i - j - k$  y  $\theta_0$  es el valor de equilibrio. También en este caso GROMOS propone la siguiente formulación alternativa, basada en el coseno del ángulo,

$$E_{\text{ángulo}}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_a^{(G)}(\cos(\theta_{ijk}) - \cos(\theta_0))^2 \quad (3.6)$$

donde ahora la relación entre la constante de fuerza armónica y la de GROMOS viene dada por  $k_a^{(G)} \sin^2(\theta_0) = k_a^{(arm)}$ .

## Torsiones

Para átomos separados por tres enlaces, formando un ángulo diedro, gran parte las interacciones que se produce viene marcada por términos electrostáticos y de dispersión, aunque dada la corta distancia a la que están forzados a permanecer por su conectividad, se tratan de forma algo distinta. Así, para evitar interacciones excesivamente elevadas, se suelen escalar los términos de interacción no enlazante. Aún así, el resultado final puede alejarse del potencial asociado a la rotación de los diedros y, por tanto, conviene añadir un término específico de torsión que termina de ajustar este potencial. Además, pueden existir algunas restricciones que fijen los diedros con origen en la estructura electrónica, como los efectos de aromaticidad o conjugación de dobles enlaces, que se incluyen también en este término.

A diferencia de los enlaces y los ángulos, en el caso de los diedros es altamente probable haya más de una conformación representativa en su de rotación, por lo que no basta con considerar una región limitada entorno a la posición de equilibrio y hay que reproducir el potencial asociado a la rotación completa alrededor del ángulo diedro. Para ello se emplean funciones periódicas, como series de Fourier del tipo,

$$V_{\phi_{ijkl}} = k_\phi[(1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \phi_n))] \quad (3.7)$$

donde  $\phi_{ijkl}$  es el ángulo diedro que forman los átomos  $i - j - k - l$ ,  $n$  es un número entero (a veces denominado multiplicidad) que controla el número de mínimos y máximos de la función coseno, y

$\phi_n$  es el valor de referencia para una multiplicidad dada. En ocasiones hay que introducir varios términos con distinta multiplicidad. Esta es la forma funcional que adoptan muchos campos de fuerza, incluido GROMOS y, en este caso CHARMM es el que introduce una formulación alternativa,

$$V_{\phi_{ijkl}} = \sum_{n=0}^5 (c_n(\cos(\phi)))^n \quad (3.8)$$

conocida como función tipo Rickaert-Bellemans, que equivale a una serie de Fourier hasta un término  $4\phi$ .

Para forzar una geometría plana o una determinada estequiometría, suelen incluirse también otro tipo de potenciales de torsión, a veces denominados diedros impropios, que restringen la posición de tres átomos unidos a un mismo elemento.

### Acoplamiento entre términos enlazantes

El movimiento curvilíneo de los ángulos debe afectar a las tensiones de los enlaces. Para tenerlo en cuenta se pueden incluir términos de acoplamiento entre ambos movimientos, como el siguiente,

$$E_{acoplamiento} = k_{b-a}(r_{ij} - b_0)(\theta_{ijk} - \theta_0) \quad (3.9)$$

Sin embargo, salvo casos en los que nos interese una descripción muy precisa de la PES intramolecular (como con los campos de fuerza MM2, MM3 y MM4), el efecto de estos acoplamientos no se suele incluir y, de hecho, no aparece en los campos de fuerza biológicos. No obstante, en algunos casos se pueden introducir términos que, en cierto modo, acoplan los movimientos angulares y de enlace, como los potenciales de Urey-Bradley que se incluyen por ejemplo en los campos de fuerza CHARMM, que introducen un potencial armónico entre los átomos extremos en un ángulo,

$$E_{Urey-Bradley}(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_{UB}(r_{ik} - r_0^{UB})^2 \quad (3.10)$$

donde  $r_0^{UB}$  es la distancia de equilibrio entre estos átomos.

#### 3.1.2. Términos no enlazantes

Los términos no enlazantes dan cuenta de las interacciones que se originan al margen de la conexión entre los átomos, a través de fuerzas electrostáticas y de dispersión. Para átomos enlazados, estas fuerzas también están presentes, aunque su efecto se incluye dentro de los términos enlazantes y, por tanto, no suelen considerarse entre átomos con uno o dos enlaces entre ellos. Para el resto de átomos del sistema, pertenecientes o no a la misma molécula, hay que considerar este tipo de interacciones que, de hecho, resultan de gran importancia en sistemas

biológicos. Su parametrización es algo más compleja que en el caso de los términos enlazantes, y suele hacerse empleando datos termoquímicos, como entalpías de solvatación o vaporización, aunque para asignar las cargas efectivas con las que interactúan electrostáticamente los distintos átomos se puede recurrir a métodos de partición de la función de onda (como el de Mulliken), que permiten estimar la carga parcial sobre un determinado átomo.

### Interacciones de dispersión

Como consecuencia de la interacción entre los dipolos que se forman por la separación de cargas moleculares y los dipolos inducidos por la movilidad de la densidad electrónica, se producen una serie de interacciones atractivas de dispersión (van der Waals) proporcionales a  $r^{-6}$ . Por otro lado, al acercar dos átomos o moléculas excesivamente, sus densidades electrónicas entran en contacto originando una fuerte repulsión de corto alcance. Una de las expresiones más extendidas y eficientes para dar cuenta de este tipo de interacciones entre dos átomos del sistema es la de Lennard-Jones,

$$E_{dispersión}^{L-J} = \sum_i \sum_{j>k} \left( \frac{C_{ij}^{(12)}}{r^{12}} - \frac{C_{ij}^{(6)}}{r^6} \right) \quad (3.11)$$

donde el exponente del término repulsivo se escoge igual a 12 porque permite simplificaciones en la implementación, y siendo los términos  $C^{(12)}$  y  $C^{(6)}$  son los parámetros a ajustar. Como vemos, la doble suma sobre todos los átomos de la molécula implica que este tipo de interacciones se tiene que evaluar un gran número de veces, por lo que resulta conveniente establecer un esquema de cribado con el que desprezarse las interacciones que se establecen entre átomos separados más allá de cierta distancia umbral (radio de corte), que suele estar entre los 10 y 12 Å, ya que el valor de esta interacción para distancias mayores prácticamente se anula.

### Interacción electrostática: cargas parciales

La densidad electrónica se distribuye de forma heterogénea por la molécula, de forma que algunos núcleos quedan sobre-apantallados, con una carga efectiva negativa y otros sub-apantallados, con carga positiva. Como consecuencia de ello, se establecen interacciones de carácter electrostático entre todos los átomos del sistema, descritas mediante una expresión de Coulomb:

$$E_{electrostática} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (3.12)$$

donde  $\epsilon_0$  y  $\epsilon_r$  son las permitividades dieléctricas en el vacío y relativa, respectivamente,  $q_i$  y  $q_j$  son las cargas efectivas (cargas parciales) sobre los núcleos  $i$  y  $j$ , y  $r_{ij}$  es la distancia entre los núcleos. Teniendo en cuenta que las cargas parciales dependen de la disposición que adopte la nube electrónica, que es diferente para cada conformación, estas cargas deberían actualizarse para las distintas configuraciones del sistema o incluir los efectos de polarización de la nube electrónica como un parámetro más en el campo de fuerzas. Sin embargo, esto añade más complejidad a

los campos de fuerza, y aunque haya campos de fuerza polarizables [Halgren 01], su aplicación a grandes sistemas biológicos es costosa y su uso no está aún muy extendido.

En la elección del campo de fuerzas hay que hacer una mención especial a la evaluación de las interacciones electrostáticas, sobre todo cuando se aplican condiciones periódicas de contorno, es decir, se replica la celda que representa el sistema en todas las direcciones del espacio para emular el efecto de un sistema macroscópico. Al contrario que las interacciones de van der Waals, que son de relativo corto alcance y pueden tratarse con un radio de corte, las interacciones electrostáticas decaen mucho más suavemente con la distancia, por lo que el valor de este radio correspondiente debería ser muy grande y, por consiguiente, las dimensiones de la caja de simulación serían demasiado grandes para mantener la convención de la imagen mínima<sup>1</sup>, lo que conduciría a un coste computacional excesivo. Así, para evaluar de forma explícita las interacciones electrostáticas de una partícula con el resto de las que forman parte del sistema, usando las condiciones periódicas de contorno, se puede emplear el algoritmo Ewald [Ewald 21], que se basa en añadir una densidad de carga ficticia que permite que la evaluación de las interacciones electrostáticas de toda la red periódica de cargas converja más rápidamente. Aún así, el algoritmo original de Ewald sigue siendo excesivamente costoso computacionalmente y no es aplicable a sistemas de la envergadura de los tratados en este trabajo. Afortunadamente, existen modificaciones del mismo, como el algoritmo PME (*Particle Mesh Ewald*) [Darden 93], que son mucho más eficiente y se pueden aplicar a sistemas de gran tamaño.

## 3.2. MÉTODOS HÍBRIDOS QM/MM

Los métodos QMMM (*Quantum Mechanics – Molecular Mechanics*) [Warshel 76] constituyen una serie de metodologías que persiguen abordar de forma precisa problemas moleculares de gran tamaño combinando las ventajas de los métodos de la mecánica cuántica (precisión y posibilidad de tratar reactividad química y estados excitados) con los de la mecánica molecular (cálculos rápidos y con poco coste computacional que permiten tratar sistemas de gran tamaño).

En este trabajo hemos empleado el algoritmo ONIOM, desarrollado por Morokuma y colaboradores [Dapprich 99]. Esta metodología se basa en la partición del sistema en la región que estamos interesados en tratar cuánticamente (región QM) y la región que tratamos con mecánica molecular (región MM). Esta partición es, de hecho, un punto de partida común en la mayoría de este tipo de cálculos, y da lugar a una expresión para la energía que puede descomponerse como sigue:

$$E_{total} = E_{QM} + E_{MM} + E_{QM/MM} \quad (3.13)$$

donde  $E_{QM}$ ,  $E_{MM}$  y  $E_{QM/MM}$  son, respectivamente, la energía calculada en la región QM, la calculada en la región MM y la energía de interacción entre las dos regiones.

---

<sup>1</sup>Según la convención de la imagen mínima sólo se evalúan interacciones entre una molécula y las réplicas más cercanas de las restantes moléculas originales [Allen 87].

La diferencia entre distintos enfoques radica principalmente en cómo se evalúa la parte  $E_{QM/MM}$ . En el caso del método ONIOM se emplea un esquema sustractivo en el que se calcula la interacción mediante cálculos independientes en ambos subsistemas,

$$E_{total} = E_{MM}^{Sistema\ completo} + E_{QM}^{Región\ QM} - E_{MM}^{Región\ QM} \quad (3.14)$$

donde  $E_{MM}^{Sistema\ completo}$  es la energía de todo el sistema evaluada con el nivel de cálculo MM,  $E_{QM}^{Región\ QM}$  es la energía de la parte QM evaluada con el nivel QM y  $E_{MM}^{Región\ QM}$  es la energía de la región QM evaluada con el nivel de cálculo MM. Este esquema se puede aplicar, en general, a un número arbitrario de regiones tratadas a diferente nivel, aunque la implementación del mismo incluye un máximo de tres.

Por lo que respecta al cálculo QM, este se realiza en principio sin tener en cuenta el entorno que forma la región MM. Es posible, sin embargo, incluir en el Hamiltoniano electrónico el efecto de polarización de la capa MM sobre la función de onda, introduciendo la interacción con las cargas parciales colocadas en las posiciones atómicas, lo que se conoce como método de la inmersión electrostática (*Electrostatic Embedding*).

La estrategia de inmersión electrostática se puede emplear, por ejemplo, para incluir el efecto del disolvente en los cálculos QM. Otra opción para dar cuenta de este efecto son los métodos de solvatación implícita [Tomasi 05], que son, de hecho, la elección preferida habitualmente. En ellos se define una cavidad que aloja al soluto y el exterior de la misma se considera como un continuo caracterizado por la constante dieléctrica, y se tiene en cuenta tanto la polarización del disolvente en la función de onda como la polarización del disolvente por parte de la función de onda, lo que se consigue mediante un procedimiento iterativo. Los distintos métodos se diferencian entre sí en la estrategia seguida para definir la cavidad y en cómo se asigna la constante dieléctrica del continuo. Entre los métodos más empleados encontramos distintas versiones del método de continuo polarizable (*Polarizable Continuum Model*, PCM) [Miertus 81] y el modelo de apantallamiento tipo conductor (*Conductor-Like Screening Model*, COSMO) [Andzelm 95].

### 3.3. MÉTODOS DE SIMULACIÓN: DINÁMICA MOLECULAR

Por otro lado, debemos disponer de métodos de simulación que proporcionen una descripción correcta de los sistemas macroscópicos, para lo que es necesario emplear un número suficientemente grande de configuraciones representativas de la PES. Los dos métodos de simulación más extendidos son el método de Monte-Carlo (MC) [Metropolis 53, Allen 87] y la dinámica molecular (*Molecular Dynamics*, MD) [Rahman 64, Allen 87]. El método de Monte-Carlo tiene como ventaja que es muy poco costoso computacionalmente y da resultados equiparables a la dinámica molecular para el cálculo de propiedades termodinámicas de equilibrio. De hecho, el método de Monte-Carlo es muy adecuado para el cálculo de propiedades de polímeros en disolución [García de la Torre 05]. Sin embargo, este método no proporciona información sobre las velocidades de las partículas, con lo que no se pueden obtener propiedades dinámicas. Por esta



razón, la dinámica molecular (DM) es el método más ampliamente utilizado en el estudio de sistemas biológicos, y es el que hemos seleccionado en este trabajo.

La dinámica molecular clásica, a la que nos referiremos aquí, se basa en la resolución de las ecuaciones del movimiento de Newton para obtener la trayectoria de los núcleos sometidos al potencial efectivo causado por la nube electrónica junto con la interacción entre núcleos, que identificamos como  $U(\mathbf{R})$  en la aproximación de Born-Oppenheimer (Ecuación (2.9)). Como ya hemos indicado en este capítulo, este potencial no tiene por qué estar descrito mecanocuánticamente y, de hecho, suele calcularse mediante las técnicas de mecánica molecular mencionadas en la Sección (3.1), dado su menor coste computacional. No obstante, para sistemas de tamaño moderado existe la posibilidad de calcular el potencial mediante métodos *ab initio* o semiempíricos [Farag 12], dando lugar a lo que se conoce como dinámica molecular de Born-Oppenheimer (*Born-Oppenheimer Molecular Dynamics*, BOMD) o Born-Oppenheimer semiempírico (*Semi-Empirical Born-Oppenheimer Molecular Dynamics*, SEBOMD). Cabe destacar que también es posible llevar a cabo una dinámica cuántica, es decir resolver la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo para propagar las coordenadas nucleares, aunque esto resulta excesivamente costoso incluso en sistemas de unos pocos átomos [Atkins 04]. Para sistemas de cierta entidad, sin embargo, sí es posible emplear métodos híbridos de simulación como el de Ehrenfest y modificaciones del mismo [Tully 98, Bastida 07]. En cualquier caso, estos métodos, aunque tienen un costo asumible para sistemas de tamaño pequeño-moderado [Soler 10], siguen siendo excesivamente costosos para los modelos biológicos que trataremos en este trabajo.

La ecuación del movimiento clásica que debemos resolver es para cada átomo  $i$  viene dada por la segunda ley de Newton y se puede expresar de la forma,

$$m_i \frac{\partial^2 \mathbf{r}_i}{\partial t^2} = \mathbf{F}_i \quad (3.15)$$

donde  $m_i$  es la masa de la partícula (átomo) y  $\mathbf{F}_i$  es la fuerza a la que está sometido el átomo  $i$  como consecuencia de todas las interacciones en que participa, que se puede calcular como sigue,

$$\mathbf{F}_i = -\frac{\partial E_{MM}}{\partial r_i} \quad (3.16)$$

donde  $E_{MM}$  es la energía potencial dada por la Ecuación (3.1).

Hay que destacar que, debido a los acoplamientos en los movimientos de todas las partículas del sistema, la Ecuación (3.15) no se puede resolver analíticamente, por lo que se debe recurrir a métodos numéricos para obtener su solución, que consisten en la propagación del movimiento de acuerdo con esta ecuación. El algoritmo que a utilizar debe cumplir ciertos requisitos, como que conserve la energía y que sea reversible en el tiempo. Lo más habitual es emplear alguno de los métodos denominados de diferencias finitas [Allen 87], que se basan en realizar un desarrollo en serie de Taylor de la posición en función del tiempo, como sigue,

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t) \Delta t + \frac{1}{2!} (\Delta t)^2 \frac{d^2 \mathbf{r}}{dt^2} \Big|_t + \dots \quad (3.17)$$

Los métodos más comúnmente empleados utilizan desarrollos de orden cúbico, como el algoritmo de Verlet [Verlet 67] y derivados del mismo, como los algoritmos *velocity-Verlet* [Swope 82] y *leap-frog* [Hockney 74]. Todos ellos son matemáticamente equivalentes, pero difieren en la precisión y eficacia computacional que ofrecen [Swope 82].

En este trabajo se han realizado las simulaciones con el programa GROMACS [Berendsen 95, Lindahl 01a, van der Spoel 05, Hess 08, Pronk 13] que utiliza el algoritmo de *leap-frog* (aunque a partir de la versión 4.5 también incluye el *velocity-Verlet*). Este algoritmo proporciona una precisión mayor que el algoritmo de Verlet original y es equivalente, cuando no introduce acoplamiento de la presión o la temperatura, al algoritmo *velocity-Verlet* [van der Spoel 10]. Con el algoritmo *leap-frog*, las posiciones se calculan para cada  $t + \Delta t$  y las velocidades se calculan en la mitad de estos intervalos, es decir a  $t + \frac{\Delta t}{2}$ , por lo que las energías cinética y potencial se obtienen a tiempos distintos, que difieren en  $\frac{\Delta t}{2}$ , lo que no conduce a errores significativos y se consigue una mayor eficiencia frente al algoritmo *velocity-Verlet* (aunque éste sí que proporciona posiciones y velocidades de forma directa a cada paso).

Es aconsejable que el paso de integración ( $\Delta t$ ) sea, al menos, un orden de magnitud menor que el periodo de los movimientos más rápidos que ocurren en el sistema que suelen ser las vibraciones de enlaces que involucran átomos de hidrógeno ( $T \sim 10$  fs), con lo que se debe emplear  $\Delta t = 1$  fs. Sin embargo, existen algunas estrategias que permiten alargar el tiempo de integración. En primer lugar, la propia elección del campo de fuerzas incide en el tiempo de integración, ya que, como discutiremos en la descripción de los entornos biológicos (Capítulo 5), las partículas con las que se modelizan no tienen por qué coincidir con los núcleos atómicos, y escogiendo entidades que engloben varios átomos (y por tanto el rápido movimiento entre ellos) se puede alargar el tiempo de integración desde 2 a 50 fs [Marrink 07] dependiendo de como se definan las partículas en el campo de fuerza.

Otra posibilidad para alargar el tiempo de integración, manteniendo una descripción a nivel atómico del sistema, consiste en congelar los movimientos más rápidos en el curso de la simulación; así, si fijamos todos los enlaces que impliquen hidrógeno, se puede extender el tiempo de simulación a 2 fs, si fijamos todos los enlaces del sistema se puede llegar hasta 4 fs [Hess 97] y si, junto a la estrategia de congelar grados de libertad, incluimos posiciones virtuales en el sistema, se pueden alcanzar los 5 fs [Hess 08]. La inclusión de estas restricciones (*constraints*) en la dinámica se realiza modificando las posiciones de los átomos tras la etapa de integración lo que, al estar acoplados los enlaces, transforma el problema en un sistema de ecuaciones no lineal [Hess 97]. Su resolución analítica es solo factible para moléculas de unos pocos átomos (p. ej. agua) como se hace en el algoritmo SETTLE [Miyamoto 92], mientras que para sistemas de mayor envergadura se puede recurrir a una resolución iterativa, tal y como se hace en el algoritmo SHAKE [Ryckaert 77]. La naturaleza iterativa de este algoritmo hace que la paralelización del mismo no sea eficiente y por esta razón han aparecido varias alternativas como los algoritmos EMM [Edberg 86] y posteriores modificaciones [Baranyai 90], “non-iterative SHAKE” [Yoneya 94] y LINCS [Hess 97]. Este último se encuentra, además, implementado en GROMACS [Lindahl 01a].

La integración directa de las ecuaciones del movimiento genera trayectorias en las que se conserva la energía, lo que da lugar a colectivos microcanónicos o *NVE*. Recordemos aquí que un

colectivo es un conjunto grande de sistemas que, aún difiriendo en su descripción microscópica, se construyen como una réplica, a nivel termodinámico (macroscópico), del sistema termodinámico real que estamos estudiando [Hill 60]. Así, un sistema definido por el número de partículas ( $N$ ), el volumen ( $V$ ) y la energía ( $E$ ), magnitudes suficientes para especificar el estado termodinámico, estará compuesto por un número muy grande de sistemas, todos con iguales valores de  $N$ ,  $V$  y  $E$ , es decir, compatibles con el sistema termodinámico en estudio. Los promedios medidos sobre todos los sistemas del colectivo permiten calcular las propiedades termodinámicas (energía, entropía...). Concretamente, para un propiedad  $A$ , su valor promedio viene dado por,

$$\langle A \rangle = \int \int A(\mathbf{r}, \mathbf{p}) \frac{e^{E(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_b T}}{\int \int e^{E(\mathbf{r}', \mathbf{p}')/k_b T} d\mathbf{r}' d\mathbf{p}'} d\mathbf{r} d\mathbf{p} = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{t} \int_{t_0}^{t_0+t} A(\tau) d\tau \quad (3.18)$$

donde  $(\mathbf{r}, \mathbf{p})$  es el espacio de fases, coordenadas y velocidades, y el término  $\frac{e^{E(\mathbf{r}, \mathbf{p})/k_b T}}{\int \int e^{E(\mathbf{r}', \mathbf{p}')/k_b T} d\mathbf{r}' d\mathbf{p}'}$  da la probabilidad de que se alcance cierta configuración en este espacio de fases. La última igualdad de esta ecuación implica que el promedio entre todos los colectivos es igual al promedio temporal de una trayectoria (suficientemente larga), lo que constituye la denominada hipótesis ergódica.

A pesar de que, conceptualmente, el colectivo microcanónico resulta accesible y sencillo, experimentalmente es extremadamente complicado conseguir las condiciones necesarias para obtenerlo, ya la energía no es un observable que se pueda medir de forma directa y, por tanto, mantenerla constante en un sistema resulta difícil. Por esta razón, para poder reproducir datos experimentales, que se obtienen, normalmente, manteniendo la temperatura constante, deben emplearse colectivos definidos por el número de partículas, el volumen y la temperatura, denominados colectivos canónicos o  $NVT$ . En algunos casos, además, la magnitud que resulta más interesante mantener constante no es el volumen, sino la presión, lo que da lugar a los colectivos isotérmicos-isobáricos o  $NpT$ .

En el curso de la simulación se deben de incorporar, por tanto, algoritmos que se encarguen de mantener una determinada temperatura y, si fuera necesario, una determinada presión, lo que se denomina termostatos y barostatos respectivamente. Con ellos debería ser posible no solo mantener constantes la presión y temperatura del experimento, sino además generar un colectivo termodinámico tipo  $NVT$  o  $NpT$ . Sin embargo, los colectivos vienen definidos por unas determinadas probabilidades termodinámicas que deben cumplir el conjunto de estados generados para poder asignarlo a un determinado tipo termodinámico y no todos los procedimientos para acoplar la temperatura o la presión conducen necesariamente a colectivos bien definidos. De hecho, no todos los algoritmos aseguran que se muestree un colectivo bien definido, o puede que el tiempo requerido para que se genere efectivamente dicho colectivo sea demasiado largo [Lingenheil 08].

En principio, podríamos pensar que, si en una simulación se mantiene constante la energía, debería de ocurrir lo mismo con la temperatura, una vez alcanzado el equilibrio. Sin embargo, si bien en sistemas pequeños puede llegar a observarse este comportamiento, pudiendo prescindirse entonces del termostato para estudiar los flujos de energía [Soler 10], para sistemas grandes, como los sistemas biológicos, la propagación de errores numéricos en el proceso de integración hacen que dicha conservación no tenga lugar y, por tanto, es necesario acoplar algún algoritmo

para mantener la temperatura [Lingenheil 08]. Estos algoritmos se basan en una modificación de las ecuaciones del movimiento que permitan, en el caso de la temperatura, obtener un factor de escalado de las velocidades y, en el caso de la presión, de las posiciones de las partículas y las dimensiones de la caja de simulación. Además, encontramos dos esquemas de acoplamiento distintos; por un lado un acoplamiento débil en el que la dinámica solo se ve ligeramente modificada, como el método de Berendsen [Berendsen 84, Berendsen 91], y por otro lado un acoplamiento fuerte en el que se pueden introducir grados de libertad adicionales que correspondan al termostato, como en el método de Nosé-Hoover [Nosé 84, Hoover 85] o el de Andersen [Andersen 80], o al pistón, como en el algoritmo de Parrinello-Rahman [Parrinello 81] o el que emplea la ecuación de Langevin para el movimiento (método del pistón de Langevin) [Feller 95].

La estrategia de Berendsen es más económica computacionalmente y constituye, de hecho, una forma muy eficaz de llevar al sistema a una determinada presión y temperatura [van der Spoel 10], pero no consigue muestrear un verdadero colectivo  $NpT$ , con consecuencias en la dinámica no muy bien descritas, por lo que no se pueden interpretar adecuadamente las fluctuaciones de las propiedades termodinámicas. El algoritmo de Nosé-Hoover, aunque llega a un colectivo conocido, introduce una mayor complejidad en el sistema y requiere un mayor coste computacional. Para calcular propiedades termodinámicas debe aplicarse el segundo tipo de métodos, aunque existen otras alternativas para acoplar el termostato, como un método de escalado de velocidades similar al de Berendsen, pero que no altera el colectivo canónico [Bussi 07]. El acoplamiento de la temperatura debe realizarse de forma separada para los grupos de especies con pocos grados de libertad por un lado (disolvente e iones) y para los de mayor número de grados de libertad (solute) por otro lado, ya que las fluctuaciones de la temperatura serán distintas en ambos casos [Lingenheil 08]. Hay que indicar que el uso de termostatos y barostatos no solo es necesario en la etapa de producción (en la que generamos los datos que posteriormente vamos a analizar) sino también para llegar a la situación de equilibrio a partir de la configuración inicial, que consistirá en una distribución más o menos ordenada de las partículas del sistema (según sea nuestro conocimiento del mismo) y en una distribución aleatoria de velocidades (siguiendo, por ejemplo, una distribución de Boltzmann a la temperatura deseada).

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, un algoritmo de dinámica molecular debe cubrir una serie de etapas en cada paso de integración. A continuación se exponen de forma esquemática los distintos pasos en una simulación usando el algoritmo de integración *leap-frog*, indicando cuáles de ellos son aplicables únicamente cuando usamos un termostato (T), un barostato (P) o cuando imponemos restricciones (C) –*constraints*– [Berendsen 84].

- [1 ] Evaluación de las fuerzas en el tiempo actual,  $F_i(t)$ .
- [2P] Evaluación de la presión instantánea a través del virial ( $\Xi(t) = f[F_i(t)]$ ),  $p_{ins} = f(\Xi(t))$
- [3P] Cálculo del factor de escalado de las posiciones:  $\mu = f(p_{ins}, p_{ref}, \tau_p)$
- [4T] Evaluación de la temperatura a la mitad del paso anterior, empleando la energía cinética,  $T(t - \frac{\Delta t}{2})$ .
- [5T] Cálculo del factor de escalado de las velocidades:  $\lambda = f(v_i, v_{ref}, \tau_T)$

- [6] Propagación de la velocidad a mitad de paso,  $v_i(t + \frac{\Delta t}{2})$  empleando las fuerzas calculadas en [1].
- [7T] Escalado de la velocidad calculada en 3 con el factor  $\lambda$  obtenido en [5T].
- [8] Propagación de las posiciones (sin restricciones).
- [9C] Aplicación de algún algoritmo que incluya las restricciones (enlaces, ángulos ...) si las hubiera (LINCS, SHAKE ...).
- [10C] Evaluación de las velocidades para los nuevos desplazamientos tras aplicar las restricciones,  $v(t + \frac{\Delta t}{2})$ .
- [11P] Actualización de las posiciones con el escalado  $\mu$  calculado en [3P].
- [12] Reemplazamiento de las coordenadas que se han salido de la caja por las correspondientes dentro de la caja de la imagen mínima.

### 3.3.1. Programas de dinámica molecular

Pese a que las ecuaciones asociadas a los métodos MM son mucho más sencillas que las de los métodos QM, y que las ecuaciones clásicas del movimiento son también conceptualmente más simples, el gran número de pasos que llegan a tener las trayectorias (normalmente en torno a las  $10^8$ ) y el tamaño de los sistemas (típicamente  $10^4$ - $10^5$  en sistemas biológicos) hace necesario el empleo de implementaciones eficientes y normalmente, paralelizadas, de todos los algoritmos que participan en la generación de una trayectoria. Por esta razón, a la hora de abordar un problema en el que se estudien sistemas de cierta envergadura, se pueden confiar las tareas de simulación a uno de los muchos programas de dinámica molecular disponibles, entre los que destacan paquetes como GROMACS [Hess 08], NAMD [Phillips 05], AMBER [Case 05], CHARMM [Brooks 09], GROMOS [Scott 99], TINKER [Ponder 87] o EGO [Eichinger 00]. Las diferencias entre ellos radican en distintos aspectos técnicos y prácticos, por ejemplo, en la forma de implementar los códigos, buscando en la mayor parte de los casos una mejor escalabilidad de los algoritmos paralelizados, siendo los cinco primeros especialmente relevantes en este sentido. Otra diferencia entre ellos está en la forma de distribución, encontrando licencias académicas de pago (CHARMM, AMBER o GROMOS), licencias académicas gratuitas pero en las que la copia y modificación están parcialmente restringidas (NAMD, TINKER) y licencias de código abierto (GNU-GPL) en las que la distribución es gratuita y se permite la libre modificación del código fuente (GROMACS, EGO). Normalmente, un equipo de investigación encargado de desarrollar un programa de dinámica molecular suele aportar también un campo de fuerza, como es el caso de los AMBER (AMBER99, AMBER03), GROMOS (GROMOS96), y CHARMM (CHARMM22, CHARMM27). Sin embargo, de forma general, cualquier paquete de dinámica molecular puede potencialmente implementar cualquier campo de fuerza, ya que los programas se distinguen entre sí, básicamente, en la forma de implementar las ecuaciones de integración del movimiento y la evaluación de las fuerzas, pero, en esencia, la metodología es la misma.

En este trabajo se ha empleado GROMACS (GROningen MACHine for Chemical Simulations) un programa ampliamente aceptado y usado, estar eficientemente paralelizado y ser fácilmente editable, tanto el código fuente en sí, como las librerías que definen los campos de fuerza y las topologías, y por estar distribuido con licencia libre. Además de disponer del programa de generación de trayectorias, GROMACS incluye una serie de herramientas de análisis que permiten obtener una gran cantidad de información de las trayectorias, como parámetros termodinámicos (potencial de fuerza media, potencial químico, fluctuaciones de energía...), estructurales (funciones de distribución radial, posiciones medias de los átomos, área por lípido, parámetro de orden...) y dinámicos (constantes de difusión, funciones de autocorrelación...). Durante el tiempo de elaboración de esta tesis, cuatro años, se han sucedido varias versiones del programa de las que se han empleado la 4.0.7 [Hess 08] y 4.5 [Pronk 13] en distintas parte del trabajo.

## CAPÍTULO 4

# Espectroscopía computacional

Una de las técnicas más útiles para explorar sistemas moleculares es la espectroscopía, que registra las variaciones que se producen en la radiación electromagnética, en función de su longitud de onda, tras interactuar con la materia. La espectroscopía computacional complementa las técnicas espectroscópicas experimentales, proporcionando los métodos y técnicas necesarios para la simulación de espectros que puedan compararse directamente con los experimentales, incluyendo las condiciones del entorno, tales como la temperatura o el disolvente. Los grandes avances que se han producido en este campo, aumentando tanto la complejidad de los modelos como el tamaño de los sistemas que son accesibles, junto con el gran progreso experimentado por las técnicas de cálculo electrónico comentadas en el Capítulo 2, sitúan el horizonte de la espectroscopía computacional en el desarrollo de herramientas capaces de ofrecer de forma automática espectros similares a los que se puedan registrar experimentalmente, conformando lo que se ha venido en llamar *espectrómetro virtual* [Barone 12]. En este capítulo revisamos los fundamentos que permiten entender la interacción de la radiación con la materia y como esta da lugar a las distintas técnicas espectroscópicas. Se presentan las ecuaciones teóricas que permiten calcular las intensidades espectrales para transiciones monofotónicas, en las formulaciones dependiente e independiente del tiempo. Tras abordar el análisis de los movimientos vibracionales, que juegan un papel relevante en la forma espectral al producir una estructura definida en las bandas espectroscópicas, se describen, finalmente, las formulaciones dependientes e independientes del tiempo para simular espectros de absorción electrónicos con resolución vibracional, empelando el modelo armónico para describir las vibraciones.

## 4.1. INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN CON LA MATERIA

La explicación por parte de Bohr de las líneas espectrales del átomo de hidrógeno constituye uno de los hitos más importantes en el desarrollo de la mecánica cuántica, y no debe extrañar que fueran precisamente datos espectroscópicos los que sirvieran para validar un modelo que trataba sobre la estructura íntima de la materia. En efecto, la espectroscopía proporciona una visión detallada del comportamiento de átomos y moléculas desvelando la estructura de niveles energéticos cuantizados, lo que aporta una información valiosa con la que contrastar los cálculos mecanocuánticos. Como contrapartida, la teoría cuántica ha ayudado a interpretar los experimentos espectroscópicos, impulsando las aplicaciones de estos métodos más allá del ámbito puramente analítico.

Pero, ¿cómo consigue la radiación extraer y transmitir la información del sistema? Teniendo en cuenta que los procesos espectroscópicos son, en esencia, fenómenos dinámicos que se producen a escala microscópica, la respuesta a esta pregunta viene de la mano de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo,

$$i\frac{\partial\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t)}{\partial t} = \hat{H}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t)\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) \quad (4.1)$$

donde como ya hemos indicado en el Capítulo 1, distinguimos expresamente las coordenadas electrónicas,  $\mathbf{r}$ , de las nucleares,  $\mathbf{R}$ . El operador Hamiltoniano depende ahora del tiempo a través del potencial generado por el campo electromagnético,

$$\hat{H}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) = \hat{H}_{mol}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) + V_{radiación}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) \quad (4.2)$$

donde  $\hat{H}_{mol}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$  es el mismo Hamiltoniano molecular definido en la Ecuación (2.2) y  $V_{radiación}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t)$  el potencial de interacción asociado a la radiación electromagnética. Para establecer la forma de este potencial, tenemos en cuenta que la radiación está formada por un campo eléctrico y otro magnético oscilando ambos con la misma frecuencia pero en planos perpendiculares y que, clásicamente, las interacciones de las cargas moleculares con los campos eléctricos y magnético vienen dadas por las ecuaciones de Coulomb y Lorentz, respectivamente. La fuerza producida por el campo eléctrico es, sin embargo, bastante más intensa que la producida por el campo magnético, por lo que podemos, en primera aproximación, despreciar el término de interacción magnético [Requena 04]. En cuanto al campo eléctrico, la expresión para una onda plana que viaja a lo largo del eje  $z$ , polarizada en el eje  $xz$  es la siguiente,

$$\mathbf{E} = \mathbf{i}E_0 \cos(\omega t - kz) \approx \mathbf{i}E_{0x} \cos(\omega t) \quad (4.3)$$

donde la fase de la onda viene determinada por la posición y el tiempo, y la variación espacial de la onda en el espacio ocupado por una molécula es despreciable. La interacción entre el sistema molecular y el campo eléctrico se puede expresar en función del momento dipolar eléctrico generado por la separación de cargas en la molécula, cuya expresión clásica viene dada, en unidades atómicas, por,



$$\boldsymbol{\mu}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \boldsymbol{\mu}_{el}(\mathbf{r}) + \boldsymbol{\mu}_{nuc}(\mathbf{R}) = -\sum_i^n \mathbf{r}_i + \sum_A^N Z_A \mathbf{R}_A \quad (4.4)$$

La interacción de la radiación queda entonces como sigue:

$$V_{radiación}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) = -\boldsymbol{\mu} \mathbf{E} = -\mu_x E_{0x} \cos(\omega t) \quad (4.5)$$

donde hemos asumido que el campo eléctrico oscila en el eje  $x$ . Esta aproximación se conoce como **aproximación dipolar**. Los procesos espectroscópicos que tienen lugar empleando esta interacción denominan **transiciones de dipolo eléctrico**, y para analizarlos es necesario resolver la Ecuación (4.1), lo que puede hacerse utilizando la teoría de perturbaciones.

En efecto, si el término de interacción,  $V_{radiación}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t)$  es suficientemente débil, entonces se puede tratar como una perturbación en el contexto de la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo [Levine 01], donde el Hamiltoniano de orden cero es el Hamiltoniano molecular, independiente del tiempo, cuyas soluciones son las funciones de onda estacionarias,

$$\Psi_n^{(0)}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) = \psi_n^{(0)}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) e^{-iE_n^{(0)}t/\hbar} \quad (4.6)$$

siendo  $n$  el nivel energético asociado a la función de onda molecular. La función de onda dependiente de tiempo se puede expresar entonces, de forma exacta, como una combinación lineal de todas las soluciones del Hamiltoniano estacionario,

$$\Psi_n(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) = \sum_n c_n \psi_n^{(0)}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) e^{-iE_n^{(0)}t/\hbar} \quad (4.7)$$

y queda completamente definida especificando los valores de los coeficientes de la combinación.  $c_n(t)$ , que en general, dependen del tiempo. La inclusión de esta solución en la Ecuación (4.1) da lugar, tras desarrollarla convenientemente [Requena 04] a una sistema de ecuaciones diferenciales acopladas, que tiene la forma,

$$i\hbar \frac{dc_m(t)}{dt} = \sum_n c_n(t) H'_{mn}(t) e^{i\omega_{mn}t} \quad m = 1, 2, 3 \dots \quad (4.8)$$

donde  $\omega_{mn} = (E_m^{(0)} - E_n^{(0)})/\hbar$ , y  $H'_{mn} = \langle \psi_m^{(0)} | V_{radiación}(\mathbf{r}, \mathbf{R}, t) | \psi_n^{(0)} \rangle$ .

Salvo para sistemas sencillos, de dos niveles, este sistema de ecuaciones acopladas, que es equivalente a la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, no tiene solución analítica exacta, por lo que debe resolverse numéricamente de forma iterativa. Concretamente, suponemos en primer lugar que los coeficientes  $c_m^{(0)}(t)$  son todos igual a cero, excepto el correspondiente a la función de onda del sistema antes de interaccionar con la radiación,  $c_n^{(0)}(t)$ , que será igual a uno, lo que constituye la aproximación de orden cero. Introduciendo estos valores en la Ecuación (4.8) podemos calcular una aproximación de primer orden a los coeficientes exactos,  $c_m^{(1)}$ . Repitiendo este proceso, es decir, introduciendo los coeficientes de primer orden en (4.8) obtendríamos la aproximación de segundo orden a los coeficientes,  $c_m^{(2)}(t)$  y así sucesivamente. Si la radiación es lo suficientemente débil y la interacción es de corta duración, entonces los coeficientes  $c_m(t)$  ( $m \neq$

$n$ ) toman efectivamente valores cercanos a cero, y la aproximación de primer orden es la adecuada para describir estos coeficientes, lo que se cumple para fuentes de radiación convencionales. Para fuentes de radiación intensas, como las de tipo láser, los coeficientes pueden variar más significativamente y serán necesarios términos de órdenes superiores para describir correctamente la función de onda, lo que es necesario, por ejemplo, en espectroscopía Raman.

Finalizada la interacción de la radiación con la materia, la función de onda queda descrita por una solución del Hamiltoniano molecular independiente del tiempo,  $\Psi_m^{(0)}$ . De acuerdo con la interpretación probabilística de la mecánica cuántica, podemos considerar el cuadrado de cada coeficiente,  $c_m(t)$ , como la probabilidad de que la función de onda resultante sea la correspondiente al nivel  $m$ , lo que da la probabilidad de que se produzca el tránsito desde la función inicial, antes de aplicar la radiación,  $\Psi_n^{(0)}$ , a la función  $\Psi_m^{(0)}$ , o el tránsito desde el nivel  $n$  al nivel  $m$ ,

$$P_{n \rightarrow m}(t) = |c_m(t)|^2 \quad (4.9)$$

donde, como vemos, la probabilidad de transición depende del tiempo. Si usamos la aproximación de primer orden,  $c_m(t) = c_m^{(1)}(t)$ , entonces la expresión final para la probabilidad de transición, empleando el potencial de interacción de la aproximación dipolar (4.5), es la siguiente [Requena 04],

$$P_{n \rightarrow m}(t) = \frac{|E_{0x}|^2 |\langle m | \hat{\mu}_x | n \rangle|^2 \sin^2(\omega_{nm} - \omega)t/2}{\hbar^2 (\omega_{nm} - \omega)^2} \quad (4.10)$$

donde la integral  $|\langle m | \hat{\mu}_x | n \rangle|$  es el momento dipolar de transición (aquí, solo la componente  $x$ ) en el que las etiquetas  $m$  y  $n$  se refieren a las funciones de onda moleculares independientes del tiempo. Recordemos además que  $\omega$  es la frecuencia con la que oscila el campo eléctrico de la radiación y  $\omega_{mn}$  se ha definido en la Ecuación (4.8). La ecuación anterior presenta un máximo en  $\omega = \omega_{mn}$ , que conduce a la ecuación fundamental de la espectroscopía (monofotónica),

$$E_m - E_n = h\nu \quad (4.11)$$

donde  $\nu = \omega/2\pi$  es la frecuencia de la radiación. Es decir, que un tránsito se produce cuando la frecuencia de la radiación multiplicada por la constante de Planck es igual a la diferencia de energía entre los niveles. Si introducimos el concepto de fotón como las partículas sin masa que forman la radiación, la ecuación anterior describe el proceso de absorción o emisión de un fotón, como consecuencia de la interacción de la radiación con la materia.

En general, las fuentes convencionales proporcionan radiación policromática, con una distribución continua de frecuencia,  $\rho(\omega)$ . Podemos calcular la probabilidad total integrando la probabilidad en todo el rango de frecuencias,  $P_{n \rightarrow m}(t) = \int_0^\infty P_{n \rightarrow m}(t, \omega) d\omega$ . Teniendo en cuenta que la probabilidad  $P_{n \rightarrow m}(t, \omega)$  define una banda estrecha en torno a  $\omega_{mn}$ , se obtiene [Requena 04],

$$P_{n \rightarrow m}(t) = \frac{\pi \rho(\omega_{mn}) |\langle m | \hat{\mu}_x | n \rangle|^2}{\varepsilon_0 \hbar^2} \quad (4.12)$$

donde hemos tenido en cuenta que como  $P_{n \rightarrow m}(t, \omega)$  es distinta de cero solo en un pequeño rango de frecuencias en torno a  $\omega_{mn}$ , podemos remplazar la función  $\rho(\omega)$  por su valor en  $\omega = \omega_{mn}$ . Para radiación no polarizada, la probabilidad de transición viene, a su vez, dada por,

$$P_{n \rightarrow m}(t) = \frac{\pi \rho(\omega_{mn}) |\langle m | \hat{\boldsymbol{\mu}} | n \rangle|^2}{6 \epsilon_0 \hbar^2} \quad (4.13)$$

donde el momento dipolar de transición,  $\langle m | \hat{\boldsymbol{\mu}} | n \rangle = \mathbf{i} \langle m | \hat{\mu}_x | n \rangle + \mathbf{j} \langle m | \hat{\mu}_y | n \rangle + \mathbf{k} \langle m | \hat{\mu}_z | n \rangle$ , que depende de la naturaleza de los estados inicial  $\Psi_n$  y final  $\Psi_m$ , es la magnitud que necesitaremos calcular para poder averiguar la intensidad del tránsito.

## 4.2. TÉCNICAS DE SIMULACIÓN DE ESPECTROS

### 4.2.1. Formulación independiente del tiempo (TI)

En espectroscopía se registran las variaciones de la intensidad de radiación que sale del sistema molecular en función de la frecuencia de la misma, de forma que se observarán señales espectrales a frecuencias que corresponden, precisamente, a la diferencia entre los distintos niveles moleculares, siendo su intensidad, en general, proporcional a la probabilidad de transición (4.13). La relación de proporcionalidad depende de la magnitud experimental que queramos simular, por ejemplo, el coeficiente de absorción molar,  $\varepsilon(\omega)$ , para espectroscopía de absorción. Una forma de simular los espectros consiste, por tanto, en calcular en primer lugar los niveles de energía con el Hamiltoniano independiente del tiempo y considerar entonces todos los posibles tránsitos, que multiplicamos por la intensidad asociada a cada uno de ellos. Si consideramos un solo estado estacionario inicial,  $\Psi_n$ , podemos representar la intensidad del espectro en función de la frecuencia como [Biczysko 11],

$$I(\omega) = C \omega^\alpha \sum_m |\langle \mathbf{n} | \hat{\boldsymbol{\mu}} | \mathbf{m} \rangle|^2 \delta(\omega_m - \omega_n - \omega) \quad (4.14)$$

donde la constante  $C$  depende de la propiedad física que estemos simulando, lo mismo que el exponente  $\alpha$ , que vale la unidad para procesos de absorción y cuatro para procesos de emisión. Por su parte,  $\delta(\omega_m - \omega_n - \omega)$  es la función delta de Dirac, con la que estamos considerando que cada banda espectral es infinitamente estrecha. A causa de la naturaleza cuántica del proceso, y de los efectos del entorno, experimentalmente se observa, sin embargo, una banda de anchura definida, que se puede representar adecuadamente mediante una función Gaussiana o Lorentziana [Requena 04] y que puede introducirse en el espectro simulado (4.14) convolucionando la función de ensanchamiento normalizada correspondiente,  $g(\omega)$ ,

$$I_{conv}(\omega) = \int_0^\infty I(\omega') g(\omega - \omega') d\omega' \quad (4.15)$$

donde  $g(\omega)$  es la función que produce el ensanchamiento observado experimentalmente.

Como hemos comentado anteriormente, la parte que determina la probabilidad de transición, y por tanto de la intensidad de transición, resulta ser el momento dipolar de transición,  $\langle m | \hat{\boldsymbol{\mu}} | n \rangle$ . Para evaluarlo, comenzamos usando la aproximación de Born-Oppenheimer, descrita en la Sección 2.1, de forma que  $\Psi^n(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \psi_{el}^i(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \psi_{nuc}^{s_i}(\mathbf{R})$ , donde el superíndice  $n$  hace referencia al estado del sistema, que corresponde al nivel nuclear  $s_i$  dentro del estado electrónico  $i$ . Podemos expresar entonces la integral del momento dipolar de transición como sigue,

$$\begin{aligned} \langle n | \hat{\boldsymbol{\mu}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) | m \rangle &= \langle \psi_{nuc}^{s_i} \psi_{el}^i(\mathbf{r}; \mathbf{R}) | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{el}(\mathbf{r}) + \hat{\boldsymbol{\mu}}_{nuc}(\mathbf{R}) | \psi_{el}^f(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \psi_{nuc}^{s_f}(\mathbf{R}) \rangle \\ &= \langle \psi_{nuc}^{s_i} \psi_{el}^i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{el} | \psi_{el}^f \psi_{nuc}^{s_f} \rangle + \langle \psi_{nuc}^{s_i} \psi_{el}^i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{nuc} | \psi_{el}^f \psi_{nuc}^{s_f} \rangle \end{aligned} \quad (4.16)$$

donde los índices  $i$  y  $f$  hacen referencia a los estados electrónicos inicial y final y, por simplicidad, hemos prescindido de la dependencia con las coordenadas en la última igualdad. Las dos integrales resultantes se pueden evaluar entonces de la forma,

$$\begin{aligned} \langle \psi_{nuc}^{s_i} \psi_{el}^i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{el} | \psi_{el}^f \psi_{nuc}^{s_f} \rangle &= \int \psi_{nuc}^{s_i} \left[ \int \psi_{el}^i \hat{\boldsymbol{\mu}}_{el} \psi_{el}^f d\mathbf{r} \right] \psi_{nuc}^{s_f} d\mathbf{R} \\ &= \int \psi_{nuc}^{s_i} \hat{\boldsymbol{\mu}}_{mn}^{el} \psi_{nuc}^{s_f} d\mathbf{R} = \langle v_i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{if}^{el} | v_f \rangle \end{aligned} \quad (4.17)$$

donde  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_{if}^{el}$  es el **momento dipolar de transición electrónico** entre los estados electrónicos inicial ( $i$ ) y final ( $f$ ), y

$$\begin{aligned} \langle \psi_{nuc}^{s_i} \psi_{el}^i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{nuc} | \psi_{el}^f \psi_{nuc}^{s_f} \rangle &= \int \psi_{nuc}^{s_i} \hat{\boldsymbol{\mu}}_{nuc} \psi_{nuc}^{s_f} \left[ \int \psi_{el}^i \psi_{el}^f d\mathbf{r} \right] d\mathbf{R} \\ &= \delta_{if} \int \psi_{nuc}^{s_i} \hat{\boldsymbol{\mu}}_{nuc} \psi_{nuc}^{s_f} d\mathbf{R} \end{aligned} \quad (4.18)$$

donde hemos tenido en cuenta la ortogonalidad de las funciones electrónicas y donde  $\delta_{if}$  es la función delta de Kronecker.

Podemos distinguir entre dos tipos de tránsitos, dependiendo de si el estado electrónico final coincide con el inicial o no. Si los tránsitos entre niveles nucleares (vibracionales y rotacionales) ocurren dentro del mismo estado electrónico, tenemos las espectroscopías de IR y de microondas. En este caso el momento dipolar de la transición viene dado por,

$$\langle n | \hat{\boldsymbol{\mu}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) | m \rangle = \langle v_i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_i(\mathbf{R}) | v'_i \rangle \quad (4.19)$$

donde se añade una prima sobre uno de los estados nucleares para indicar que son diferentes, ya que el tránsito tiene lugar entre dos niveles nucleares del mismo estado electrónico ( $i$ ), y donde  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_i$  es el valor del momento dipolar total para dicho estado, que se calcula de la forma,

$$\hat{\boldsymbol{\mu}}_i = \hat{\boldsymbol{\mu}}_{ii}^{el} + \boldsymbol{\mu}_{nuc} = \int (\psi_{el}^i)^* \boldsymbol{\mu}_{el} \psi_{el}^i d\mathbf{r} + \sum_A Z_A \mathbf{R}_A \quad (4.20)$$

Por otro lado, si el tránsito se produce entre niveles nucleares de dos estados electrónicos distintos, se trata de espectroscopía electrónica, y el momento dipolar de la transición viene dado por,

$$\langle n | \hat{\boldsymbol{\mu}}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) | m \rangle = \langle v_i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{if}^{el}(\mathbf{R}) | v_f \rangle \quad (4.21)$$

donde ahora aparece el momento dipolar de transición electrónico introducido en la Ecuación (4.17).

Como vemos, en los dos casos, hay que evaluar una integral en la que aparecen las funciones nucleares de los niveles entre los que se produce el tránsito, junto con un operador,  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_i(\mathbf{R})$  o  $\hat{\boldsymbol{\mu}}_{if}^{el}(\mathbf{R})$ , que depende de la coordenadas nucleares.

Podemos volver ahora a escribir la expresión para la intensidad espectral, usando la separación de Born-Oppenheimer, como sigue,

$$I(\omega) = C\omega^\alpha \sum_{s_i} W_{s_i}(T) \sum_{s_f} |\langle v_i | \hat{\boldsymbol{\mu}}_{if} | v_f \rangle|^2 \delta(\omega_{s_f} - \omega_{s_i} - \omega) \quad (4.22)$$

donde hemos supuesto que se trata de un proceso de absorción, y nos centramos únicamente en los tránsitos que van desde el nivel electrónico  $i$  al  $f$ , contando con la posibilidad de que partan de distintos niveles nucleares, de acuerdo con una distribución de Boltzmann en el estado electrónico inicial, incluyendo los factores de ponderación  $W_i(T)$ , que dependen de la temperatura. Esta ecuación permite simular el espectro de vibración-rotación, para el caso en el que  $i = f$ , y los espectros electrónicos con resolución vibro-rotacional para  $i \neq f$ .

#### 4.2.2. Formulación dependiente del tiempo (TD)

La Ecuación (4.22), escrita en el dominio de frecuencias, proporciona una vía para simular los espectros vibracionales o electrónicos, si somos capaces de calcular todos los niveles nucleares de los estados electrónicos inicial y final, así como las correspondientes integrales del dipolo de transición. Sin embargo, el número transiciones que hemos de considerar para conseguir reproducir los espectros experimentales aumenta significativamente con el tamaño del sistema y con la temperatura, y el elevado número de integrales que hay que calcular, incluso prescindiendo de los niveles rotacionales, llega a hacerse inabordable. En estos casos, los métodos basados en una formulación en el dominio temporal resultan ser mucho más eficientes para obtener proporcionar el espectro completamente convergido [Lami 11]. Este tipo de técnicas, tienen su origen en el trabajo pionero de Kubo y Toyozama [Kubo 55] y han sido aplicadas satisfactoriamente a sistemas moleculares por Mukamel y colaboradores [Mukamel 85, Yan 86], han suscitado un renovado interés en los últimos años [Tang 03, Ianconescu 04, Peng 10, Borrelli 11, Huh 12], al abrir la puerta a la simulación de espectros de sistemas de cierta envergadura, con un coste independiente de la temperatura.

El paso del dominio de frecuencias en la Ecuación (4.22) al dominio de tiempo requiere el uso de la transformada de Fourier. Así, por ejemplo, en el caso de la función delta de Dirac, su transformada viene dada por,

$$\delta(\omega_{s_f} - \omega_{s_i} - \omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} e^{i[\omega_{s_f} - \omega_{s_i} - \omega]t} dt \quad (4.23)$$

Por simplicidad, vamos a considerar el caso en el que se parte de un solo estado inicial, que denominamos  $\psi_{nuc}^{s_1}$ , o  $|v_g\rangle$  en la notación de Dirac. Asimismo, se puede emplear un estado intermedio,  $\varphi_d$  ( $|d\rangle$ ), definido en términos del momento dipolar de transición [Lami 11], de la forma,

$$|d\rangle = \sum_{s_f} |v_f\rangle \langle v_f | \boldsymbol{\mu}_{if} | v_g \rangle \quad (4.24)$$

cuya evolución temporal se obtiene de aplicar el propagador del Hamiltoniano no perturbado,  $e^{-i\hat{H}^{(0)}t/\hbar}$ , lo que conduce a,

$$|d(t)\rangle = \sum_{s_f} e^{-iE_{v_f}t/\hbar} |v_f\rangle \langle v_f | \boldsymbol{\mu}_{if} | v_g \rangle \quad (4.25)$$

de forma que,

$$\langle d(0) | d(t) \rangle = \sum_{s_f} e^{-iE_{v_f}t/\hbar} |\langle v_f | \boldsymbol{\mu}_{if} | v_g \rangle|^2 \quad (4.26)$$

si definimos ahora la función de correlación dipolo-dipolo,  $C_\mu$ , como,

$$\begin{aligned} C_\mu(t) &= \langle v_g | \boldsymbol{\mu} e^{-i\hat{H}^{(0)}t/\hbar} \boldsymbol{\mu} e^{i\hat{H}^{(0)}t/\hbar} | v_g \rangle = e^{iE_{v_g}t/\hbar} \langle v_g | \boldsymbol{\mu} e^{-i\hat{H}^{(0)}t/\hbar} \boldsymbol{\mu} | v_g \rangle \\ &= e^{iE_{v_g}t/\hbar} \langle d(0) | d(t) \rangle \end{aligned} \quad (4.27)$$

donde la última igualdad se satisface usando la relación de identidad,  $\sum_{s_f} |v_f\rangle \langle v_f| = 1$ . Usando entonces las Ecuaciones (4.23), (4.26) y (4.27), podemos expresar la intensidad espectral (4.22) como la transformación de Fourier de la función de correlación dipolo-dipolo,

$$I(\omega) = \frac{C\omega}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} C_\mu e^{i\omega t} dt \quad (4.28)$$

El problema consiste ahora en encontrar una expresión para la función de correlación dipolo-dipolo. Como veremos más adelante, pueden desarrollarse diferentes modelos usando la aproximación armónica.

Por su parte, en la formulación dependiente del tiempo, la incorporación del ensanchamiento se realiza por medio de una Gaussiana que se multiplica a la función de correlación, teniendo en cuenta el teorema de la convolución, que establece que una convolución en el espacio de frecuencias, corresponde a una multiplicación en el espacio de tiempo, y usando el hecho de que la transformada de Fourier de una Gaussiana es, de hecho, otra Gaussiana.

### 4.3. ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA CON RESOLUCIÓN VIBRACIONAL

En esta sección nos centramos en la aplicación de las ecuaciones obtenidas anteriormente al caso de espectroscopía electrónica con resolución vibracional, lo que implica que los estados electrónicos inicial y final son distintos y que no tenemos en cuenta los movimientos rotacionales.

#### 4.3.1. Dinámica vibracional: modos normales y relación de Duschinsky

Antes de abordar la simulación del espectro, debemos ver cómo se calculan tanto los estados electrónicos, para lo que podemos emplear las técnicas introducidas en el Capítulo 2, como los niveles nucleares que se extraen de la ecuación de Schrödinger nuclear (2.9), en la que debemos de introducir el potencial  $U(\mathbf{R})$ , es decir, la superficie de energía potencial. Incluso si se puede calcular este potencial de forma precisa en torno a la posición de equilibrio en la que se producen las vibraciones, la resolución de la ecuación de Schrödinger nuclear puede ser demasiado compleja para proporcionar una expresión analítica de la función de onda. En ese caso, la evaluación de las integrales también se complica, por lo que resulta útil recurrir a una PES simplificada, al menos como punto de partida desde el que podamos incluir posteriormente términos de corrección. En este contexto se enmarca la aproximación armónica (que puede extenderse con correcciones anarmónicas), en la que se construye una PES cuadrática para cada coordenada vibracional empleando la Hessiana calculada en el mínimo, de forma que el problema se transforme en un conjunto de osciladores armónicos. En general, dicho conjunto de osciladores armónicos estarán acoplados entre si, aunque se pueden definir unas nuevas coordenadas en las que los movimientos vibracionales estén completamente desacoplados: las coordenadas normales [French 74]. En el campo de la espectroscopía, dichas coordenadas constituyen el marco de referencia para la simulación e interpretación de las técnicas vibracionales, como IR y Raman, o cualquier espectroscopía con resolución vibracional [Requena 04].

Para evaluar los movimientos vibracionales calculamos en primer lugar la Hessiana en el mínimo de la PES en la que estemos interesados, empleando un marco de referencia adecuado. Concretamente, se emplean las coordenadas Cartesianas ponderadas en masa,  $\mathbf{q}$ , definidas de la forma,

$$\begin{aligned} q_1 &= m_1^{1/2}(x_1 - x_{1,e}) & q_2 &= m_1^{1/2}(y_1 - y_{1,e}) & q_3 &= m_1^{1/2}(z_1 - z_{1,e}) \\ & & & \dots\dots\dots & & \\ q_{3N-2} &= m_N^{1/2}(x_N - x_{N,e}) & q_{3N-1} &= m_N^{1/2}(y_N - y_{N,e}) & q_{3N} &= m_N^{1/2}(z_N - z_{N,e}) \end{aligned} \quad (4.29)$$

donde recordemos que  $N$  es el número de átomos. Los modos normales se obtienen entonces diagonalizando la Hessiana calculada en estas coordenadas,  $\mathbf{H}_{\mathbf{q}}$  [Requena 04], cuyos elementos de matriz son:

$$(H_{\mathbf{q}})_{ij} = \frac{\partial^2 U(\mathbf{q})}{\partial q_i \partial q_j} \quad (4.30)$$

Normalmente, la Hessiana se calcula inicialmente en coordenadas Cartesianas ( $\mathbf{H}_x$ ), y se transforma a las coordenadas ponderadas mediante la ecuación:

$$\mathbf{H}_q = \mathbf{m}^{-1/2} \mathbf{H}_x \mathbf{m}^{-1/2} \quad (4.31)$$

donde  $\mathbf{m}$  es una matriz diagonal que contiene las masas atómicas. La matriz  $\mathbf{H}_q$  se rota previamente para separar los movimientos de rotación y vibración, lo que se hace adoptando el marco de referencia de Eckart [Eckart 35], y los modos normales se obtienen a partir de la diagonalización,

$$\mathbf{T}^t \mathbf{H}_q \mathbf{T} = \Lambda \quad (4.32)$$

donde la matriz  $\mathbf{T}$ , de dimensión  $3N \times 3N$ , define el vector de modos normales,  $\mathbf{Q}$ , en función de las coordenadas Cartesianas ponderadas en masa como,

$$\mathbf{Q} = \mathbf{T}^t \mathbf{q} \quad (4.33)$$

y la matriz diagonal  $\Lambda$  contiene las constantes de fuerza cuadráticas,  $\lambda_i$ , asociadas a cada modo normal,  $Q_i$ . Nótese que el vector  $\mathbf{Q}$  tiene dimensión  $3N$ , mientras que el número de grados de libertad vibracional es  $3N - 6$  (o  $3N - 5$  para moléculas lineales), lo que indica que hay 6 (5) elementos que corresponden a movimientos de translación y rotación, a los que deberían corresponder frecuencias constantes de fuerza igual a cero (en la práctica se obtienen valores cercanos a cero, como consecuencia de errores numéricos).

La descripción de modos normales resulta muy útil porque, como ya hemos comentado, proporciona un modelo de osciladores desacoplados, lo que a su vez conduce a un Hamiltoniano separable, formado por la suma de los osciladores armónicos correspondientes a cada modo normal,

$$\hat{H}_{vib}(\mathbf{Q}) = \sum_i^{N_{vib}} \hat{h}(Q_i) = \sum_i^{N_{vib}} \left[ -\frac{1}{2} \frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} + \frac{1}{2} \lambda_i Q_i \right] \quad (4.34)$$

donde  $N_{vib}$  es el número de grados de libertad vibracionales ( $3N-6$  o  $3N-5$ ). La energía del sistema es entonces la suma de la energía almacenada en cada oscilador, y la función de onda el producto de las funciones propias del oscilador armónico, dada por la ecuación de autovalores,

$$\hat{h}_i(Q_i) \varphi_v(Q_i) = [(v_i + 1/2) h \nu_i] \varphi_i \quad (4.35)$$

donde  $\varphi_v(Q_i)$  es la función de onda vibracional,  $(v_i + 1/2) h \nu_i$  es la energía del oscilador, que depende del número cuántico  $v_i$ , y  $\nu_i$  es su frecuencia armónica

En algunas ocasiones puede ser útil calcular los modos normales a partir de las coordenadas internas de valencia, formadas por enlaces, ángulos y diedros que describen de forma más natural los movimientos intramoleculares. Para ello se expresan en primer lugar las coordenadas internas en función de las coordenadas Cartesianas mediante el desarrollo de primer orden [Wilson 55],



$$\mathbf{S} - \mathbf{S}^0 = \mathbf{B}(\mathbf{x} - \mathbf{x}^0) \quad (4.36)$$

donde  $\mathbf{S}$  y  $\mathbf{x}$  son los conjuntos de coordenadas internas y Cartesianas,  $\mathbf{S}^0$  y  $\mathbf{x}^0$  son los valores de equilibrio de las mismas y  $\mathbf{B}$  es la matriz de Wilson, de dimensión  $((3N - 6) \times 3N)$ . La matriz métrica de este conjunto de coordenadas se define de la forma,

$$\mathbf{G} = \mathbf{B}^T \mathbf{m}^{-1} \mathbf{B} \quad (4.37)$$

donde  $\mathbf{m}$  es la matriz diagonal de masas atómicas.

Los modos normales en coordenadas internas se obtienen entonces mediante el método GF [Wilson 55], para lo que es necesario disponer de la matriz Hessiana en coordenadas internas ( $\mathbf{F}$ ) que se puede obtener a partir de la Hessiana en coordenadas Cartesianas ( $\mathbf{H}_x$ ), mediante la expresión [Peng 96, Pulay 92],

$$\mathbf{F} = \mathbf{G}^{-1} \mathbf{B} \mathbf{m}^{-1} (\mathbf{H}_x - \mathbf{B}^{(\prime\prime)T} \mathbf{g}_{\text{int}}) \mathbf{m}^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{G}^{-1} \stackrel{*}{=} \mathbf{G}^{-1} \mathbf{B} \mathbf{m}^{-1} \mathbf{H}_x \mathbf{m}^{-1} \mathbf{B}^T \mathbf{G}^{-1} \quad (4.38)$$

donde las matrices  $\mathbf{B}^{(\prime\prime)}$  y  $\mathbf{g}_{\text{int}}$  contienen las derivadas de la matriz de Wilson con respecto a las coordenadas internas y el gradiente en coordenadas internas, respectivamente. La igualdad indicada con un asterisco solo se cumple para puntos estacionarios, en los que se anula el gradiente.

El método GF [Wilson 55] establece la ecuación secular en coordenadas internas, cuya forma es,

$$\mathbf{F} \mathbf{L} = \mathbf{G}^{-1} \mathbf{L} \mathbf{\Lambda} \quad (4.39)$$

donde  $\mathbf{L}$  es una matriz  $N_{\text{vib}} \times N_{\text{vib}}$  que contiene los modos normales en términos de las coordenadas internas,

$$\mathbf{S} = \mathbf{L} \mathbf{Q} \quad \longrightarrow \quad \mathbf{Q} = \mathbf{L}^{-1} \mathbf{S} \quad (4.40)$$

y donde queda claro que, al contrario de lo que ocurre en coordenadas Cartesianas, la matriz  $\mathbf{L}$  no es ortogonal. Cabe destacar, además, que en este caso la rotación y la translación se separen al elegir las coordenadas, por lo que las matrices tienen dimensión  $N_{\text{vib}}$ .

De forma equivalente, se pueden obtener los modos normales en coordenadas internas a partir de los modos normales calculados en coordenadas Cartesianas, obtenidos en el marco de referencia de Eckart [Reimers 01],

$$\mathbf{L} = \mathbf{B} \mathbf{m}^{-1/2} \mathbf{T} \quad (4.41)$$

donde  $\mathbf{L}$   $((3N - 6) \times (3N - 6))$  y  $\mathbf{T}$   $(3N \times (3N - 6))$  son las matrices que definen de los modos normales en coordenadas internas y Cartesianas. Esta igualdad solo es válida además en puntos estacionarios de la PES.

Las coordenadas internas son especialmente útiles para describir movimientos curvilíneos, por lo que están indicadas para los casos en los que tienen lugar grandes desplazamientos de los modos de vibración curvilíneos, como torsiones. Sin embargo, precisamente debido a la naturaleza curvilínea de estas coordenadas, aparecen nuevos términos cinéticos en el operador Hamiltoniano vibracional [Capobianco 12, Sibert 83],

$$\mathbf{H} = \mathbf{H}_0 + \Delta\mathbf{T}(\mathbf{Q}) + \mathbf{V}_{\text{kin}}(\mathbf{Q}) \quad (4.42)$$

donde  $\mathbf{H}_0$  es el Hamiltoniano del oscilador armónico (4.34) y  $\Delta\mathbf{T}(\mathbf{Q})$  y  $\mathbf{V}_{\text{kin}}(\mathbf{Q})$ , son los términos cinéticos adicionales. En el límite de amplitudes muy bajas, estos términos se anulan, y se pueden emplear las mismas ecuaciones que el caso de los modos normales expresados en coordenadas Cartesianas.

Los análisis vibracionales que acabamos de describir se refieren a un solo estado electrónico, por lo que son válidos para espectroscopías vibracionales. En el caso de transiciones entre estados electrónicos, la superficie de potencial inicial y final son distintas y es necesario realizar el análisis de modos normales en cada una de ellas por separado, obteniendo en cada caso un conjunto de modos normales distinto. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que para poder realizar las integrales del momento dipolar de transición, debemos relacionar ambos conjuntos de modos normales. Para ello hay que escoger los puntos en los que se construye la PES armónica en los dos estados que participan en la transición, entre un estado vibracional inicial,  $|1\rangle$ , y otro final,  $|2\rangle$ . En el caso del estado de partida, la opción más razonable es formar las curvas cuadráticas desde el mínimo, ya que la configuración molecular antes del tránsito se encontrara en torno a esa estructura, realizando los análisis de forma al indicado anteriormente. Sin embargo, en lo que respecta al estado excitado, hay dos opciones posibles, que son el modelo de Hessiana adiabática (*Adiabatic Hessian*, AH) y el modelo de Hessiana vertical (*Vertical Hessian*, VH) [Avila Ferrer 12]. El modelo AH supone generar la PES armónica desde el mínimo [Sharp 64], de forma similar a como se realiza en el estado electrónico de partida, mientras que el modelo VH implica reconstruir la PES del de la geometría correspondiente al mínimo del estado inicial (lo que se conoce como punto de Franck-Condon) [Cederbaum 76], para lo que es necesaria la información de la Hessiana y del gradiente del estado final en ese punto. El modelo AH presenta la ventaja de que en el mínimo nos aseguramos que la Hessiana proporcione constantes de fuerza positivas para todos los modos, lo que proporciona curvas cuadráticas convexas (enlazantes), aunque si existe un gran desplazamiento entre los estados inicial y final, puede resultar problemático relacionar los modos normales definidos en cada estado, ya que los desarrollos lineales mediante los que se representan los modos normales a partir de las coordenadas Cartesianas (Ecuación (4.33)) e internas (Ecuación (4.40)) son solo válidas en torno al punto donde se han definido, y el rango de validez depende de la habilidad de las coordenadas de referencia para representar los movimientos de los modos, aspecto en el que las coordenadas internas son superiores. El modelo VH, a su vez, tiene la ventaja de que los modos normales de los dos estados se definen en el mismo punto, lo que facilita el establecimiento de una relación fidedigna entre ellos. La región de Franck-Condon es además en este caso la más relevante para el espectro, ya que es aquella en la que está centrada la función de onda justo después de la excitación [Hazra 04]. Como desventaja, la Hessiana calculada con el modelo VH puede dar constantes de fuerza negativas, o lo que es lo mismo, frecuencias imaginarias, ya que la anarmonicidad propia

de la PES real no asegura que la forma cuadrática que se da en torno al mínimo se mantenga en regiones alejadas del mismo. De hecho, la presencia de frecuencias imaginarias con el modelo VH es un síntoma de que los tratamientos armónicos pueden ser insuficientes. Por último, conviene comentar que, aunque se pueda emplear cualquier tipo de coordenadas con ambos modelos, el cálculo de modos normales fuera de los puntos estacionarios es más complejo en coordenadas internas, por lo que el tratamiento en coordenadas internas es más complejo en el modelo VH que el modelo AH.

Una vez establecidos los modos normales en los dos estados, usando cualquiera de los modelos introducidos, es necesario relacionarlos para poder evaluar las integrales de dipolo de transición. Para ello se puede utilizar la relación de Duschinsky [Duschinsky 37], que relaciona linealmente los modos de ambos estados, de la forma,

$$\mathbf{Q}_1 = \mathbf{J}\mathbf{Q}_2 + \mathbf{K} \quad (4.43)$$

donde el tránsito se produce desde el estado vibracional inicial,  $|1\rangle$ , al estado vibracional final,  $|2\rangle$ , siendo  $\mathbf{Q}_1$  y  $\mathbf{Q}_2$  las coordenadas normales de cada estado,  $\mathbf{J}$  la matriz de Duschinsky, que indica las mezclas de modos normales entre uno y otro estado, y  $\mathbf{K}$  el vector de desplazamiento, que da cuenta de los cambios conformacionales entre los mínimos de ambos estados, que otorgan valores distintos para los modos normales en cada caso.

Tanto la matriz de Duschinsky como el vector de desplazamiento se pueden calcular usando la definición de modos normales de ambos estados [Sharp 64]. Empleando, por ejemplo, los modos normales calculados en coordenadas internas,  $\mathbf{L}_1$  y  $\mathbf{L}_2$ , podemos definir los modos de cada estado como,

$$\mathbf{Q}_1 = \mathbf{L}_1^{-1}\mathbf{S} \quad (4.44)$$

$$\mathbf{Q}_2 = \mathbf{L}_2^{-1}(\mathbf{S} + \Delta\mathbf{S}^0) \quad (4.45)$$

donde  $\mathbf{S} = \mathbf{S}_1$  y  $\Delta\mathbf{S}^0 = \mathbf{S}_2^0 - \mathbf{S}_1^0$ , son los valores de las coordenadas internas en cada conformación, y  $\Delta\mathbf{S}^0$  indica el cambio que se produce entre ambos estados. Si sustituimos estos valores en la relación de Duschinsky (4.43), obtenemos,

$$\mathbf{L}_1^{-1}\mathbf{S} = \mathbf{J}\mathbf{L}_2^{-1}(\mathbf{S} + \Delta\mathbf{S}^0) + \mathbf{K} \quad (4.46)$$

Asumiendo que la hipótesis de Duschinsky es correcta, podemos escoger el vector  $\mathbf{S}$  de forma arbitraria. Si escogemos  $\mathbf{S} = -\Delta\mathbf{S}^0$ , podemos obtener directamente el vector de desplazamiento,

$$\mathbf{K}_{\text{int}} = -\mathbf{L}_1^{-1}\Delta\mathbf{S}^0 = \mathbf{L}_1^{-1}(\mathbf{S}_1^0 - \mathbf{S}_2^0) \quad (4.47)$$

y si lo sustituimos en (4.43) y reordenamos llegamos a,

$$\mathbf{L}_1^{-1}(\mathbf{S} + \Delta\mathbf{S}^0) = \mathbf{J}\mathbf{L}_2^{-1}(\mathbf{S} + \Delta\mathbf{S}^0) \quad (4.48)$$

de donde, por comparación con la relación de Duschinsky, se puede deducir que,

$$\mathbf{J}_{\text{int}} = \mathbf{L}_1^{-1} \mathbf{L}_2 \quad (4.49)$$

Las Ecuaciones (4.49) y (4.47) nos dicen cómo determinar estos elementos a partir de los modos normales en coordenadas internas. En general, estas ecuaciones son válidas en cualquier sistema de coordenadas. En el caso de las coordenadas Cartesianas, si tenemos en cuenta que la matriz  $\mathbf{T}$  es ortonormal, podemos escribir,

$$\mathbf{J}_{\text{Cart}} = \mathbf{T}_1^t \mathbf{T}_2 \quad (4.50)$$

donde ahora  $\mathbf{T}_1$  y  $\mathbf{T}_2$  son los modos normales obtenidos en coordenadas Cartesianas ponderadas en la masa para los estados fundamental y excitado. Nótese, sin embargo, que como las condiciones de Eckart no pueden satisfacerse normalmente de forma simultánea en ambos estados, se producen errores al asumir la separación de la vibración y rotación, lo que hace que la matriz  $\mathbf{J}_{\text{Cart}}$  no sea exactamente ortogonal [Ozkan 90, Sando 01].

En cuanto a la matriz de Duschinsky en coordenadas internas, se puede expresar en función de un conjunto de coordenadas internas ortogonalizadas mediante la rotación  $\mathbf{G}^{1/2}$ ,  $\mathbf{S}' = \mathbf{G}^{1/2} \mathbf{S}$ , de forma que se pueden definir los modos ortogonalizados como  $\mathbf{L}' = \mathbf{G}^{-1/2} \mathbf{L}$ , con lo que la matriz de Duschinsky en coordenadas internas se puede escribir de la forma [Reimers 01],

$$\mathbf{J}_{\text{int}} = \mathbf{L}'^t \mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{G}_2^{1/2} \mathbf{L}'_2 \quad (4.51)$$

donde queda claro que, si las matrices métricas de las coordenadas internas de ambos estados no coinciden, la matriz de Duschinsky no será ortogonal.

Por su parte, el vector de desplazamiento en coordenadas Cartesianas viene dado por,

$$\mathbf{K}_{\text{Cart}} = \mathbf{T}_1^t (\mathbf{q}_2^0 - \mathbf{q}_1^0) \quad (4.52)$$

donde  $\mathbf{q}_1^0$  y  $\mathbf{q}_2^0$  son las coordenadas Cartesianas ponderadas de equilibrio en cada uno de los estados.

Para el modelo VH hay que tener en cuenta, como hemos comentado, el gradiente para definir los potenciales cuadráticos [Avila Ferrer 12]. En este caso se estima el mínimo de la curva y se establecen los modos normales asociados a la misma,  $\mathbf{Q}_2^{(VH)}$ , de forma que la matriz de Duschinsky queda definida en función de estos modos normales, de la forma,

$$\mathbf{Q}_1 = \mathbf{J}^{(VH)} \mathbf{Q}_2^{(VH)} + \mathbf{K}^{(VH)} \quad (4.53)$$

donde se introducen los superíndices  $(VH)$  para diferenciarlos del modelo AH, ya que ambos solo coincidirán en el caso en que las PESs exactas fueran realmente cuadráticas.

### 4.3.2. Formulaciones TI y TD en la aproximación armónica

Pasemos ahora desarrollar las ecuaciones que se utilizan para calcular el espectro con las formulaciones TI y TD cuando se emplea la aproximación armónica descrita en la sección anterior, incluyendo la relación de Duschinsky entre los modos inicial y final. Antes de ello, debemos concretar la forma que adopta el momento dipolar de transición electrónico,  $\mu_{if}$ , que, como hemos comentado, puede expresarse como un desarrollo en serie de Taylor en el que normalmente llegamos al orden lineal, de forma que si lo expresamos en función de las coordenadas normales del estado final escribimos,

$$\mu_{if} = \mu_{if}^0 + \sum_k \left( \frac{\partial \mu_{if}}{\partial (Q_f)_k} \right)_{\mathbf{Q}_f=0} (Q_f)_k \quad (4.54)$$

donde el primer término del desarrollo da lugar a la aproximación de Franck-Condon (FC), y el segundo término es la denominada contribución de Herzberg-Teller (HT), indicándose el uso de los dos términos como FCHT.

Veamos en primer lugar la expresión del espectro en la formulación independiente del tiempo. La intensidad en este caso viene dada por,

$$I(\omega) = C\omega \sum_{v,v'} W_{v'}(T) |\langle \mathbf{v}' | \hat{\mu}_{e',e} | \mathbf{v} \rangle|^2 \delta(\omega_v + \Delta E - \omega_{v'} - \omega) \quad (4.55)$$

donde ahora  $\mathbf{v}$  y  $\mathbf{v}'$  indican las funciones vibracionales, definidas por los números cuánticos que especifican la energía armónica,  $\mathbf{v} = (v_1, v_2, \dots, v_{N_{vib}})$  y los  $\mathbf{v}'$ , correspondientes a los estados electrónicos involucrados en el tránsito,  $e$  y  $e'$ . El punto clave está, como hemos dicho, en el cálculo de las integrales del momento dipolar de transición, que son:

$$\langle \mathbf{v}' | \mathbf{v} \rangle \quad (4.56)$$

para el término FC, y

$$\langle \mathbf{v}' | Q'_i | \mathbf{v} \rangle \quad (4.57)$$

para los términos HT. En ambos casos se deben expresar las funciones vibracionales en un mismo sistema de coordenadas normales, para lo que se emplea la relación de Duschinsky. Existen expresiones que permiten el cálculo de estas integrales mediante relaciones de recurrencia [Sharp 64], aunque su número puede llegar a ser muy elevado (de hecho, en el modelo armónico, existen un número infinito de niveles y, por tanto, de transiciones). Por este motivo son necesarios criterios de cribado que permitan seleccionar a priori las integrales más importantes que es necesario evaluar. Pueden usarse así los algoritmos desarrollados por Santoro y colaboradores [Santoro 07a, Santoro 07b, Santoro 08], que incluyen tanto los términos FC como los términos HT, y proporcionan un tratamiento eficiente de los casos a temperatura finita. El procedimiento se basa en clasificar las transiciones según el número de modos cuyos números cuánticos de los estados inicial y final cambian, de forma que si son no hay cambio en ningún modo, forman

la clase  $C_0$ , sin hay cambios en solo un modo, la clase  $C_1$ , y así sucesivamente. Los criterios emplean la información de las clases  $C_1$  y  $C_2$ , calculadas hasta un número máximo para cada modo excitado, para establecer qué integrales de las clases sucesivas, mucho más numerosas, son relevantes en el cálculo. Este algoritmo está implementado en el programa de licencia libre *FCclasses* [Santoro 13] y en *Gaussian* [Bloino 10].

Incluso empleando estrategias de preselección eficientes como la indicada más arriba, existe un límite físico en el que el número de integrales relevantes excede las capacidades computacionales, ya sea por el tamaño del sistema o por la temperatura. En estos casos se puede emplear la formulación dependiente del tiempo, que evita tener que calcular los estados vibracionales de forma explícita [Mukamel 85]. La intensidad se expresa ahora como la transformada de Fourier de la función de auto-corrección del momento dipolar, que llamamos  $\chi(T, t)$ <sup>1</sup>, y que depende de la temperatura como sigue,

$$I(\omega) = \frac{C\omega}{2\pi Z_v} \int \chi(t, T) e^{-it(\Delta E/\hbar - \omega)} dt \quad (4.58)$$

donde  $Z_v$  es la función de partición vibracional, que normaliza la función de correlación,  $\chi(t, T)$ , que a su vez viene dada por,

$$\chi(t, T) = \text{Tr}[\mu_{e',e} e^{-itH_e/\hbar} \mu_{e',e} e^{-(\beta - it/\hbar)H_1}] \quad (4.59)$$

donde  $\text{Tr}$  indica la traza sobre un conjunto de coordenadas espaciales,  $\beta$  es la inversa del producto del factor de Boltzmann por la temperatura,  $\frac{1}{k_B T}$ , y  $H_g$  y  $H_e$  son los Hamiltonianos electrónicos del estados fundamental y excitado.

Necesitamos, por tanto, una expresión analítica para la función de correlación  $\chi(t, T)$ , y en este sentido se han desarrollado varias formulaciones que incluyen los efectos FC [Tang 03, Ianconescu 04, Borrelli 11] y otras tantas que incluyen la contribución HT [Peng 10, Borrelli 12], que resultan ser equivalentes en cada caso [Lami 11]. Antes de concretar la forma analítica de la función de correlación, resulta conveniente introducir algunas matrices auxiliares. Concretamente se definen las matrices diagonales  $\mathbf{a}_i(\tau_i)$ ,  $\mathbf{a}_f(\tau_f)$ ,  $\mathbf{b}_i(\tau_i)$  y  $\mathbf{b}_f(\tau_f)$ , cuyos elementos diagonales vienen dados por,

$$a_k(\tau) = \frac{\omega_k}{\sin(\hbar\omega_k\tau)} \quad (4.60a)$$

$$b_k(\tau) = \frac{\omega_k}{\tan(\hbar\omega_k\tau)} \quad (4.60b)$$

donde  $\omega_k$  es la frecuencia armónica de cada oscilador.

Recordemos que estamos empleando el subíndice  $i$  para el estado inicial (estado fundamental en absorción) y el subíndice  $f$  para el final (estado excitado en absorción). Para cada estado, el parámetro  $\tau$  se define de forma diferente, como sigue:

$$\tau_i = -t - i\beta$$

---

<sup>1</sup>Esta función de correlación es la que denominamos  $C_\mu$  en la Ecuación (4.28).

$$\tau_f = t$$

A partir de las matrices diagonales anteriores introducimos además las siguientes matrices,

$$\mathbf{A}(\tau_i, \tau_f) = \mathbf{a}_f(\tau_f) + \mathbf{J}^T \mathbf{a}_i(\tau_i) \mathbf{J} \quad (4.61a)$$

$$\mathbf{B}(\tau_i, \tau_f) = \mathbf{b}_f(\tau_f) + \mathbf{J}^T \mathbf{b}_i(\tau_i) \mathbf{J} \quad (4.61b)$$

$$\mathbf{G}(\tau_f) = \mathbf{b}_f(\tau_f) - \mathbf{a}_f(\tau_f) \quad (4.61c)$$

$$\mathbf{E}(\tau_i) = \mathbf{b}_i(\tau_i) - \mathbf{a}_i(\tau_i) \quad (4.61d)$$

Podemos ahora escribir la forma analítica de la función de correlación en la aproximación FC para el momento dipolar que, de acuerdo con la derivación de Pollak y colaboradores, queda como sigue [Iancu 04],

$$\chi(t, T) = Z^{-1} \sqrt{\frac{\det(\mathbf{a}_i) \det(\mathbf{a}_f)}{\det(\mathbf{B}) \det(\mathbf{B} - \mathbf{A} \mathbf{B}^{-1} \mathbf{A})}} \exp \left\{ \frac{i}{\hbar} [\mathbf{K}^T \mathbf{E} \mathbf{J} (\mathbf{B} - \mathbf{A})^{-1} \mathbf{G} \mathbf{J}^T \mathbf{K}] \right\} \quad (4.62)$$

donde se ha omitido, por simplicidad, la dependencia de las matrices con  $\tau$ , se ha introducido la función de partición en la función de correlación, lo supone una diferencia con la definición en (4.59), de forma que esta normalizada con su valor inicial igual a la unidad, y se ha incluido la matriz de Duschinsky,  $\mathbf{J}$ , y el vector de desplazamiento,  $\mathbf{K}$ .

Shuai y colaboradores [Peng 10] han reformulado la expresión anterior para incluir en ella la contribución HT. Para ello introducen el siguiente vector y matriz,

$$\mathbf{F} = [\mathbf{K}^T \mathbf{E} \mathbf{J} \quad \mathbf{K}^T \mathbf{E} \mathbf{J}]^T \quad (4.63a)$$

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} \mathbf{B} & -\mathbf{A} \\ -\mathbf{A} & \mathbf{B} \end{pmatrix} \quad (4.63b)$$

donde  $\mathbf{F}$  es un vector ( $2N_{vib} \times 1$ ) y  $\mathbf{P}$  es una matriz ( $2N_{vib} \times 2N_{vib}$ ) (en las expresiones de Pollak la dimensión de las matrices es  $N_{vib}$ ). La expresión final queda entonces como sigue,

$$\chi(t, T) = Z^{-1} \sqrt{\frac{\det(\mathbf{a}_i) \det(\mathbf{a}_f)}{\det(\mathbf{P})}} \exp \left\{ \frac{i}{\hbar} \left[ \frac{1}{2} \mathbf{F}^T \mathbf{P}^{-1} \mathbf{F} - \mathbf{K}^T \mathbf{E} \mathbf{K} \right] \right\} \times g_\mu \quad (4.64)$$

donde,

$$g_\mu = |\vec{\mu}_0|^2 - 2 \sum_k \vec{\mu}_0 \vec{\mu}_k [(\mathbf{H}_k^{FC/HT})^t \mathbf{K}^{-1} \mathbf{F}] + \sum_{kl} \vec{\mu}_k \vec{\mu}_l [i\hbar \text{Tr}[\mathbf{G}_{lk}^{HT} \mathbf{K}^{-1}] + (\mathbf{K}^{-1} \mathbf{F})^T \mathbf{G}_{lk}^{HT} (\mathbf{K}^{-1} \mathbf{F})] \quad (4.65)$$

y donde el vector  $\mathbf{H}_k^{FC/HT}$  y la matriz  $\mathbf{G}_{lk}^{HT}$  están definidos de forma que todos sus elementos son cero, excepto los indicados por  $k$  en el vector  $\mathbf{H}$  y por  $(k, N+l)$  en la matriz  $\mathbf{G}$ . Esta expresión supone una formulación compacta para definir un mecanismo de selección de precisamente una

fila o elemento de las matrices a las que multiplican, aunque en su implementación práctica puede ser más conveniente no realizar estas multiplicaciones.

Como hemos comentado anteriormente, el desarrollo de Borrelli y colaboradores [Borrelli 12], resulta equivalente al de Shuai. Para derivarla introducimos las matrices diagonales  $\mathbf{c}_i$ ,  $\mathbf{c}_f$ ,  $\mathbf{d}_i$  y  $\mathbf{d}_f$  definidas por Lami y Santoro [Lami 11], cuyos elementos diagonales son,

$$c_k(\tau) = \omega_k \coth(i\hbar\omega_k\tau/2) \quad (4.66a)$$

$$d_k(\tau) = \omega_k \tanh(i\hbar\omega_k\tau/2) \quad (4.66b)$$

A partir de ellas se definen entonces las siguientes matrices,

$$\mathbf{C}(\tau_i, \tau_f) = \mathbf{c}_f(\tau_f) + \mathbf{J}^T \mathbf{c}_i(\tau_i) \mathbf{J} \quad (4.67a)$$

$$\mathbf{D}(\tau_i, \tau_f) = \mathbf{b}_f(\tau_f) + \mathbf{J}^T \mathbf{d}_i(\tau_i) \mathbf{J} \quad (4.67b)$$

y finalmente la expresión de Peluso y Borrelli [Borrelli 12] viene dada por,

$$\begin{aligned} \chi(t, T) = & Z^{-1} \sqrt{\frac{\det(\mathbf{a}_f) \det(\mathbf{a}_i)}{(i\hbar)^{2N} \det(\mathbf{C}) \det(\mathbf{D})}} \\ & \times \exp[-\mathbf{K}^T \mathbf{d}_f \mathbf{K} + \mathbf{K}^T \mathbf{d}_f \mathbf{J} \mathbf{D}^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{d}_f \mathbf{K}] g_\mu \end{aligned} \quad (4.68)$$

donde  $g_\mu$  responde a la expresión,

$$g_\mu = |\tilde{\mu}^0|^2 + 2 \sum_r \tilde{\mu}^0 \tilde{\mu}_r^{(1)} D_r^{HT} + \sum_{r,s} \tilde{\mu}_r^{(1)} A_{rs}^{HT} \tilde{\mu}_s^{(1)} \quad (4.69)$$

siendo  $\tilde{\mu}^0$  y  $\tilde{\mu}^{(1)}$  los momentos dipolares de orden cero, y sus primeras derivadas, respectivamente, con  $D_r^{HT} = -(\mathbf{D}^{-1} \mathbf{J}^T \mathbf{d}_f \mathbf{K})_r$  y  $A_{rs}^{HT} = -(\mathbf{D}^{-1} - \mathbf{C}^{-1})_{rs}/2 + D_r^{HT} D_s^{HT}$ . La expresión de Peluso y Borrelli se maneja computacionalmente de forma más eficiente al incluir matrices de menor dimensión en comparación con la deducción de Shuai.

En la práctica, las expresiones de la función de correlación son muy complejas como para poder calcular la transformada de Fourier analíticamente, por lo que se realiza un muestreo de la misma a distintos tiempos, generándose un conjunto al que se le aplica a continuación la transformada discreta de Fourier. En este trabajo, se han implementado los métodos TD en el código FCclasses [Cerezo 13] incluyendo los casos FC y HT, usando las expresiones obtenidas por Pollak [Ianconescu 04] y por Borrelli y Peluso [Borrelli 12], en cada caso.

Por último, es interesante destacar la complementariedad que existe entre las formulaciones TI y TD. Así, aunque la formulación TD proporcione el espectro completamente convergido, no proporciona ninguna información para asignar las transiciones que caracterizan el espectro, para lo que es necesario recurrir a técnicas TI. Asimismo, si bien los métodos TI pueden estar limitados por la convergencia de la suma sobre estados, en el caso de los espectros TD, la limitación se encuentra en la resolución del espectro, ya que cuanto mayor sea la resolución que se desee, más exhaustivo es el muestreo de la función de auto-correlación que se debe emplear, lo que aumenta su coste computacional.



## CAPÍTULO 5

# Protección en entornos biológicos: de ácidos grasos a carotenoides

Uno de los objetivos de la presente Tesis ha sido analizar algunos mecanismos de protección en entornos biológicos, como membranas celulares o fotosistemas, frente a procesos que puedan dañar los organismos. Abordamos, en concreto, dos estrategias terapéuticas diferentes, ambas basadas en la acción de moléculas específicas incorporadas a los medios biológicos como son ácidos grasos y carotenoides. Estos dos grupos de moléculas inducen efectos beneficiosos en membranas celulares, aunque sus mecanismos de acción pueden ser muy diferentes, lo que proporciona una visión más general de las posibles rutas terapéuticas. Para llevar a cabo este estudio introducimos, en primer lugar, los modelos más adecuados para tratar los entornos biológicos de interés, que, de acuerdo con el tamaño de los sistemas, se describen fundamentalmente usando la mecánica molecular. Así, con estas técnicas se evalúa la acción de dos ácidos grasos con dobles enlaces *cis*, el ácido oleico y el ácido 2-hidroxioléico, y la acción de dos carotenoides,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, en bicapas lipídicas. En ambos casos podemos identificar alteraciones estructurales como elementos clave en la acción terapéutica de estas moléculas, aunque con una diferencia esencial. En efecto, mientras que la acción beneficiosa de los ácidos grasos se basa en su capacidad para modificar la estructura de las membranas, alterando así la actividad de proteínas asociadas a la misma, en el caso de los carotenoides, es su propia capacidad antioxidante la que puede verse afectada por la conformación que adopte dentro de la membrana. Centrándonos en este aspecto de los carotenoides, a lo largo de este capítulo se describen con cierto detalle sus propiedades antioxidantes y la estrecha vinculación de la misma con la conformación del carotenoide, que puede verse perturbada significativamente a través de interacciones específicas con el entorno biológico. Tras analizar estos efectos en bicapas modelo, que emulan las características más importantes de las membranas celulares se introduce, finalmente, el estudio de los carotenoides en fotosistemas, en los que estas interacciones específicas pueden llegar a ser más relevantes en la alteración tanto de las propiedades antioxidantes como de las fotoquímicas.

## 5.1. DESCRIPCIÓN TEÓRICA DE ENTORNOS BIOLÓGICOS COMPLEJOS

El primer paso que debemos dar para abordar el estudio de cualquier proceso químico es elaborar un modelo adecuado que de cuenta, de la mejor forma posible, de lo que ocurre a escala atómica en el sistema real. Más concretamente, los dos aspectos básicos que darán forma al modelo serán los elementos con los que se representan las entidades físicas consideradas, y las ecuaciones que gobiernen las interacciones entre ellas. La selección de unos y otros vendrá dictada, principalmente, por el tamaño del sistema a estudiar y por la información en la que estemos interesados, de forma que el mejor modelo será aquel que responda nuestras preguntas sobre el sistema de la forma más eficiente.

En los problemas químicos, los átomos constituyen la unidad estructural más sencilla, por lo que el máximo nivel de detalle estructural se alcanza mediante modelos cuyos elementos se corresponden, precisamente, con los átomos del sistema. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que, normalmente, los sistemas de interés químico y biológico están formados por miles o incluso millones de átomos, por lo que no va a ser posible tomar en consideración todos los átomos. Se plantean entonces algunas simplificaciones de los modelos, que se consiguen reduciendo la resolución estructural de los mismos, perdiendo una información que, no obstante, puede no ser necesaria en algunos estudios.

En este sentido podemos clasificar los modelos según la resolución que ofrecen, siendo las representaciones de todos los átomos (*all-atoms*) las más detalladas. A partir de ellas, la reducción del número de partículas en el sistema se logra englobando en un mismo elemento del modelo, una región más amplia del sistema, que pueden incluir desde unos pocos átomos a cientos o miles. La denominación general de este tipo de modelos es la de *grano-grueso* (*coarse-grained*), y su utilidad práctica depende obviamente del nivel de detalle que ofrezcan. Así, encontramos en primer lugar modelos de átomos unidos (*united-atoms*), donde los hidrógenos alifáticos se engloban en los elementos que representan los carbonos a los que están unidos, siendo GROMOS-96 uno de los ejemplos más notables [Schmid 11]. Reduciendo algo más el nivel de detalle, tenemos los modelos cuyos elementos incluyen unos 4 o 5 átomos, como es el caso de MARTINI [Marrink 13]. La continuación del descenso hacia un menor nivel de resolución nos lleva a sacrificar progresivamente el conocimiento estructural interno de las moléculas, llegando a modelos como los de bolas y muelles o los modelos rígidos de esferas, elipses o cilindros que, aunque no se ajustan a las necesidades de nuestro estudio, pueden llegar a ser tremendamente útiles en el estudio de la dinámica macromolecular [García de la Torre 05].

Otra estrategia en la simplificación de los modelos la representan los modelos de solvatación implícita, en los que se describe el disolvente mediante un continuo sin estructura definido, básicamente, por su constante dieléctrica. Se consigue de esta forma evaluar el efecto producido por los cientos de moléculas de disolvente que rodean al soluto, sin necesidad de introducir otros tantos elementos al modelo. La simplificación y utilidad de los modelos implícitos los han dotado de gran aceptación en el marco de los métodos de la química cuántica [Miertus 81, Klamt 93, Tomasi 94] y, más recientemente, de la mecánica molecular [Onufriev 04, Pronk 13].

En lo que respecta a la forma de evaluar las interacciones, la forma más rigurosa consiste en aplicar los métodos de la mecánica cuántica, que rigen el comportamiento de la materia a escala

atómica. Esta opción supone, sin embargo, un coste computacional excesivo para el tratamiento de sistemas con cientos o miles de átomos que pueden surgir en la modelización de sistemas biológicos. En este sentido, si bien para sistemas de tamaño moderado es posible emplear métodos mecanocuánticos con una baja demanda computacional, como los semiempíricos [Farag 12], para sistemas de gran envergadura incluso los métodos mecanocuánticos simplificados resultan prohibitivos y la única opción posible es utilizar las expresiones empíricas del potencial que proporcionan los métodos de la mecánica molecular.

Son posibles, por tanto, distintos enfoques para definir las partículas del modelo y las interacciones entre ellas, lo que se concreta finalmente en los diferentes **campos de fuerza**. En lo que respecta a las funciones de potencial, encontramos campos de fuerzas *ab-initio*, semiempíricos y empíricos. En nuestro caso, el tamaño de los sistemas nos lleva a emplear la mecánica molecular, por lo utilizaremos campos de fuerza empíricos, parametrizados para describir las entidades biológicas que nos ocupen. Además, en lo que respecta a los elementos del sistema, usaremos modelos de todos los átomos y de átomos unidos, que proporcionan el nivel de detalle necesario para llevar a cabo los estudios estructurales y conformacionales de este trabajo.

En los apartados siguientes, describimos con más detalle los campos de fuerza que se han elegido o desarrollado para el estudio de los sistemas formados por membranas lipídicas con ácidos grasos o carotenoides, y los fotosistemas.

### 5.1.1. Campos de fuerza estándar

Los procesos abordados en este capítulo tienen lugar en el seno de bicapas lipídicas, que constituyen un modelo simplificado de membranas celulares ampliamente utilizado tanto en trabajos experimentales como computacionales. Los lípidos, junto con los aminoácidos, ácidos nucleicos y monosacáridos, forman uno de los elementos estructurales más comunes en los medios biológicos. Sin embargo, a diferencia de los otros tres, que dan lugar a grandes biopolímeros mediante uniones covalentes, las estructuras macromoleculares formadas por los lípidos consisten en agregados estabilizados mediante interacciones no covalentes, como fuerzas hidrofóbicas. Entre las estructuras lipídicas más usuales se encuentran las bicapas, que son la base de las membranas celulares, las cuales proporcionan una separación del medio intracelular con el exterior y actuando, además, como soporte para un gran número de proteínas que desempeñan importantes funciones fisiológicas como, por ejemplo, receptores hormonales o transportadores moleculares.

Debido al creciente interés en las membranas celulares, los campos de fuerza empíricos de los lípidos han experimentado un gran avance en la última década. Una de las estrategias más comunes para desarrollarlos ha consistido en modificar campos de fuerza existentes, por ejemplo para líquidos orgánicos o proteínas, con el fin de conseguir una descripción adecuada de las propiedades de las estructuras que forman los lípidos, como las bicapas, que vienen determinadas por interacciones acopladas entre lípidos [Anezo 03]. Resulta, por tanto, imprescindible reproducir las interacciones no covalentes que se dan entre las cadenas de lípido y, dada la peculiaridad de las mismas en comparación con las que se pueden encontrar en otras sustancias, requiere, en general, añadir parámetros adicionales a los campos de fuerza. De hecho, una de las primeras

parametrizaciones con las que se consiguió reproducir las propiedades de los lípidos de forma satisfactoria fue una modificación de los parámetros de cadena hidrocarbonadas del campo de fuerzas OPLS junto con GROMOS87, llevada a cabo por Berger y colaboradores [Berger 97], que aún sigue empleándose. Más recientemente, encontramos los campos de fuerza derivados del campo de átomos unidos GROMOS96 (G53a6), como el de Kukol [Kukol 09] y el de Poger y colaboradores [Poger 10b, Poger 10a], este último incluido en la versión actualizada del campo de fuerzas original (G54a7) [Schmid 11]. En ambos casos se mejoran las interacciones de van der Waals entre los grupos fosfatidilcolina que, en el campo de fuerzas original, daban lugar a empaquetamientos excesivamente compactos en comparación con las evidencias experimentales. En estos dos campos de fuerzas se emplean, además, las cargas parciales derivadas por Chiu y colaboradores [Chiu 95], calculadas mediante un análisis de población de Mulliken a partir de cálculos HF/6-31G(d). En lo que respecta a campos de fuerza de todos los átomos para bicapas lipídicas, la nueva parametrización de CHARMM realizada por Klauda y colaboradores [Klauda 10], conocida como CHARMM36, es una de las más empleadas ya que, además de reproducir adecuadamente las propiedades de las bicapas, es compatible con el campo de fuerzas CHARMM27 para proteínas, lo que permite tratar de forma consistente sistemas formados por los dos tipos de biomoléculas, como es el caso de las proteínas de membrana, o los fotosistemas que veremos más adelante.

Todos los campos de fuerza indicados en el párrafo anterior incluyen la parametrización de los lípidos usados en este trabajo para formar las bicapas. Se trata de los lípidos tipo fosfatidilcolina DMPC y DPPC, ampliamente empleados en un gran número de trabajos experimentales y teóricos, lo que proporciona un material de referencia importante para comparar los resultados obtenidos. La elección del campo de fuerza dependerá, entonces, de las características del sistema y de la información en la que estemos interesados, que describimos a continuación.

En el estudio de la acción de los ácidos grasos, nuestro interés se centra, por un lado, en los cambios estructurales que se pueden producir en las membranas por la presencia de una cierta cantidad de moléculas de ácido oleico y ácido 2-hidroxioléico, dos moléculas que, pese a su gran similitud estructural, han mostrado tener efectos claramente diferenciados en el seno de las membranas. El tamaño del sistema debe ser lo suficientemente grande como para dar cabida a un elevado número de cadenas de ácido graso y, por este motivo, en la elección del campo de fuerzas primaremos la simplificación del modelo con el fin de aumentar la eficiencia computacional. El modelo debe ser capaz, en cualquier caso, de dar cuenta de las diferencias estructurales de las especies en las que estamos interesados que, como ya hemos comentado son mínimas. Para ellos hemos usado un modelo de átomos-unidos, que ofrece un nivel de detalle estructural que permite diferenciar las dos moléculas bajo estudio, reduciendo notablemente el número de partículas del sistema respecto a un modelo de todos los átomos. En concreto, hemos escogido el modelo desarrollado por Kukol [Kukol 09], que reproduce fielmente las propiedades estructurales de la bicapa.

En lo que respecta a la interacción de los carotenoides con la membrana, estamos más interesados en una descripción detallada de la conformación estas moléculas, incluyendo distintos isómeros estructurales. Por esta razón, optamos en este caso por modelos de todos los átomos para describir tanto a los carotenoides como a los lípidos de la bicapa. En concreto, hemos escogido el campo de fuerzas CHARMM36 [Klauda 10] para los lípidos que, además de proporcionar

resultados estructurales cercanos a los experimentales, puede emplearse junto al campo de fuerzas CHARMM27 en el estudio de sistemas formados por bicapas lipídicas y proteínas. En este Capítulo abordamos también el estudio de carotenoides en fotosistemas que son grandes complejos proteicos embebidos en la membrana del tilacoide. En este caso, la bicapa se construye con lípidos POPC, que supone un mejor modelo para este tipo de membranas y que se tratan también con el campo de fuerzas CHARMM36. En lo que respecta al complejo proteico, debemos elegir entre los innumerables campos de fuerzas disponibles para representar péptidos y proteínas. En efecto, las proteínas han sido y son el principal objetivo de las técnicas bioinformáticas y, por esta razón, el desarrollo de campos de fuerza de proteínas está más avanzado que en cualquier otro tipo de biomoléculas. Como hemos comentado anteriormente, en este trabajo se ha escogido el campo de fuerzas CHARMM27 [Mackerell 04], un campo de fuerzas basado en su predecesor, CHARMM22 [MacKerell 98], con correcciones a las torsiones de la cadena peptídica extraídas de cálculos de mecánica cuántica.

En la modelización de los entornos biológicos, resulta clave la descripción correcta del disolvente más estrechamente asociado a la vida: el agua. Dada la importancia y ubicuidad de esta molécula, se han desarrollado distintos modelos buscando reproducir sus propiedades lo más fielmente posible optimizando el coste computacional. Como ya hemos comentado, la modelización de los disolventes puede realizarse por medio de modelos implícitos o explícitos. Así, para los cálculos mecanocuánticos hemos optado por el modelo implícito del continuo polarizable, o PCM [Miertus 81], mientras que en los cálculos de mecánica molecular se han empleado distintos campos de fuerza estándar para esta molécula. Entre ellos, el modelo más sencillo es el de carga puntual única (*Single point charge*, SPC) desarrollado por Berendsen [Berendsen 81], con el que se consigue una gran eficiencia computacional y que se suele emplear junto a campos de fuerza de átomos unidos, por lo que ha sido el elegido en los cálculos realizados con el campo de fuerzas GROMOS96. Modelos más elaborados, como el SPC extendido (SPC/E) o los TIP3P y TIP4P, proporciona una descripción más detallada a costa de una mayor carga computacional, y se suelen emplear con modelos de todos los átomos. En concreto, junto con los campos de fuerzas de CHARMM, utilizaremos el campo de fuerzas TIP3P [Jorgensen 83] o un modelo TIP3P modificado precisamente para su uso con estos campos de fuerza (CHARMM TIP3P) [Durell 94, Neria 96], ya que se ha demostrado que el empleo del modelo estándar junto con CHARMM36 puede dar lugar a resultados estructurales incorrectos en membranas [Piggot 12]. Este último ha sido, por tanto, el campo de fuerzas empleado en este trabajo para modelizar agua junto con CHARMM36.

Antes de proseguir, conviene comentar la validez de los campos de fuerza escogidos para lípidos y proteínas, que determinan la utilidad de las técnicas de mecánica molecular. Recientemente, se han producido mejoras significativas en los campos de fuerza impulsadas por la cada vez mayor duración de las simulaciones, accesible gracias a los avances en *hardware* y algoritmos, que permiten analizar los modelos empleando escalas de tiempo relevantes. En el caso de las simulaciones de bicapas, por ejemplo, en los últimos quince años los tiempos de simulación han pasado de unos pocos nanosegundos [Tieleman 97] a las centenas de nanosegundos, llegando a rebasar incluso la barrera del microsegundo. En este contexto, resultan muy interesantes los estudios comparativos recientes en los que se evalúan algunos de los campos de fuerzas de lípidos [Piggot 12] y proteínas [Beauchamp 12] más usuales incluyendo, en ambos estudios, los

empleados en este trabajo.

En lo que respecta a los campos de fuerza para lípidos, todos los modelos evaluados presentan puntos fuertes y débiles, lo que impide destacar uno en concreto frente al resto. Los parámetros de Kukol reproducen muy bien las características de DPPC aunque fallan al representar POPC, sobre todo en lo que respecta a la cadena de oleato. Conviene señalar, no obstante, que este efecto puede deberse, en parte, a un error tipográfico en el artículo original de donde Kukol tomó los potenciales de los diedros y que discutiremos en el apartado siguiente. En cuanto a CHARMM36, este campo de fuerzas consigue reproducir las propiedades de los dos tipos de bicapas, siempre y cuando se emplee el modelo de disolvente CHARMM TIP3P, como ya hemos indicado.

Por su parte, para los campos de fuerza de proteínas, la revisión llevada a cabo por Beauchamp y colaboradores, tomando como referencia datos experimentales de resonancia magnética nuclear (RMN), pone de manifiesto que, si bien campos de fuerza de AMBER más recientes (AMBER-ILDN) son los que proporcionan los mejores resultados, el campo de fuerzas CHARMM27 no queda mal parado, proporcionando también resultados aceptables. Teniendo en cuenta, además, la compatibilidad de este conjunto de parámetros con el campo CHARMM36 que empleamos para los fosfolípidos, la estrategia empleada en este trabajo se revela acertada.

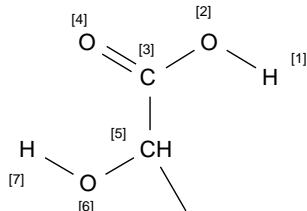
Incluimos, por último, en este apartado los parámetros correspondientes las moléculas de clorofila, que son los pigmentos más abundantes en los fotosistemas, y están encargadas de captar la luz solar y transportarla hasta los centros de reacción. Aunque no existen valores estandarizados para este tipo de parámetros, resulta interesante la disponibilidad de campos de fuerza compatibles con los campos de CHARMM, como el desarrollado por Foloppe y colaboradores [Foloppe 95]. Este campo de fuerzas, proporciona valores de los términos enlazantes basados en los correspondientes al grupo HEMO recogidos en el campo de fuerzas CHARMM, actualizados de acuerdo con la información estructural de experimentos de difracción de rayos X para clorofilas. En cuanto a las interacciones no enlazantes, los valores de los parámetros de van der Waals también se basan en los correspondientes al grupo HEMO. Por su parte, en la parametrización de Foloppe, las cargas se calculan mediante un análisis de población de Mulliken a un nivel de cálculo semiempírico, PM3, demasiado bajo entre las posibilidades actuales. De hecho, en trabajos posteriores se han obtenido distintos conjuntos de cargas basados en el ajuste del potencial electrostático, que resultan más convenientes [Ishikita 05, Madjet 06, Karki 11, Jing 12, Kim 12]. En este trabajo hemos optado por las cargas derivadas por Ishikita et al. [Ishikita 05] junto con los parámetros de Foloppe, como sugieren Jing y colaboradores [Jing 12].

### **5.1.2. Parametrización de ácidos grasos con un modelo de átomos unidos.**

Como ya hemos comentado, las simulaciones de las bicapas formadas por ácidos grasos insertados en la bicapa lipídica se realizan usando un modelo de átomos unidos, recurriendo al campo de fuerzas desarrollado por Kukol para representar a los lípidos. Los parámetros que se empleen para los ácidos grasos deben de ser, por tanto, compatibles con los de Kukol. Con este objetivo, el campo de fuerzas para los dos ácidos grasos se ha construido tomado como referencia

**Tabla 5.1** – Valores de las cargas parciales de las cabezas polares de ácido oleico (OA) y 2-hidroxioléico (2OHOA) calculados de acuerdo con la metodología de Chiu [Chiu 95].

Átomo	OA	2O-OA
[1]	0.5	0.5
[2]	-0.7	-0.7
[3]	0.8	0.8
[4]	-0.6	-0.6
[5]	–	0.2
[6]	–	-0.7
[7]	–	0.5



los parámetros del fosfolípido 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) derivados por el mismo autor [Kukul 09], ya que una de las cadenas esterificadas del mismo es precisamente el ácido oleico. La principal variación introducida respecto a los parámetros originales de GROMOS96 consiste en la reparametrización de los términos diédricos, de acuerdo con el ajuste del potencial asociado a los barridos de los ángulos diedros de la cadena realizados por Bachar y colaboradores mediante cálculos B3LYP/6-31G(d) [Bachar 04]. Desafortunadamente, el artículo de Bachar contiene un error tipográfico en la definición de uno de los diedros asociados al doble enlace que se mantiene en el artículo de Kukul, lo que da lugar a una parametrización incorrecta. Este error fue detectado y corregido por los propios autores [Bachar 10] después de la publicación del artículo de Kukul, aunque, desafortunadamente, en la corrección se introduce otro error en la expresión del potencial, concretamente en el valor de los ángulos de desfase, para el potencial que depende de  $\phi_2$ , cuya forma correcta debe ser (en kJ/mol):

$$V(\phi_2) = -5,685 + 7,470[1 + \cos(\phi_2)] + 3,9000[1 + \cos(2\phi_2) + 1,100[1 + \cos(3\phi_2 - 180)]] \quad (5.1)$$

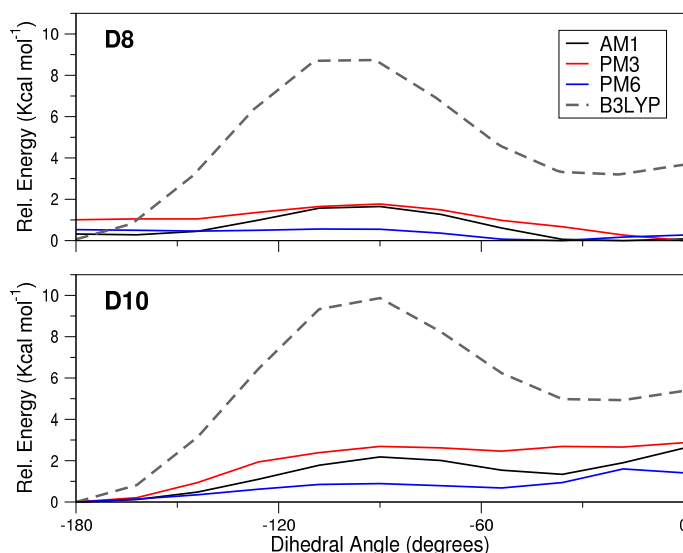
En este estudio hemos empleado, por tanto, los parámetros enlazantes y de van der Waals de la cadena de oleato de POPC dados por Kukul, con los parámetros de la Ecuación (5.1) para el correspondiente término diédrico. El grupo ácido se consideró protonado, como cabe esperar de acuerdo con sus valores de pKa, y los parámetros enlazantes y de van der Waals se tomaron, por analogía, de los parámetros correspondientes al campo de fuerzas GROMOS96 (G53a6). Idéntico protocolo se siguió para asignar los parámetros del grupo hidroxilo en el ácido 2-hidroxioléico, añadiendo además un término para dar cuenta de la quiralidad del carbono C2 que, en los campos de fuerza de átomos unidos, se especifica mediante un diedro impropio, cuyo valor se toma también de los parámetros estándar de GROMOS.

Ya que la cabeza polar de los ácidos grasos se encuentra esterificada en POPC, resulta necesario recalcular las cargas parciales de las cadenas libre. Dicha carga, en concreto, se han obtenido, de acuerdo con la estrategia de Kukul, siguiendo el procedimiento establecido por Chiu y colaboradores [Chiu 95] que, como ya hemos comentado, consiste en realizar un análisis de población de Mulliken sobre la función de onda obtenida de un cálculo HF/6-31G(d), que hemos realizado sobre las estructuras optimizadas de los dos ácido grasos, mostrando los valores resultantes en la Tabla 5.1.

### 5.1.3. Parametrización de carotenoides con un modelos de todos los átomos.

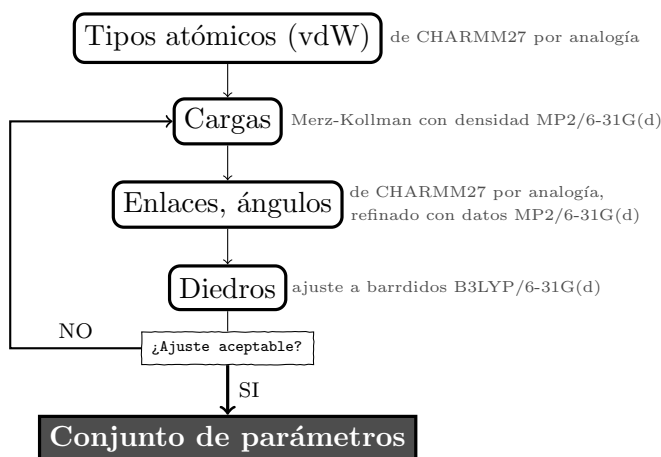
En el estudio de los carotenoides,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, estamos interesados en evaluar la dependencia de sus propiedades con la estructura que adopta la cadena conjugada, por lo que necesitamos un modelo capaz de reproducir acertadamente el espacio conformacional asociado a la rotación de los diedros a lo largo de dicha cadena. Por esta razón, resulta más acertado recurrir a un modelo de todos los átomos que, de acuerdo con la elección para los lípidos de la membrana, sea compatible con el CHARMM36. En este apartado analizamos distintas posibilidades para representar a los carotenoides y, finalmente, desarrollamos en detalle un nuevo campo de fuerzas para estas moléculas.

Consideremos, en primer lugar, la posibilidad de emplear técnicas híbridas QM/MM basadas en la evaluación de parte de las interacciones mediante cálculos mecanocuántico. Este enfoque, en el que se aúnan los métodos de la mecánica cuántica para carotenoides con campos de fuerzas de mecánica molecular para los lípidos y el disolvente, puede resultar muy útil teniendo en cuenta la naturaleza cuántica de los efectos de conjugación de enlaces a lo largo de la cadena conjugada. Las simulaciones requieren, sin embargo, la evaluación de las interacciones una gran número de veces, por lo que resulta imprescindible que el método mecanocuántico tenga un coste computacional moderado, lo que descarta los métodos *ab-initio* o DFT, y deja los métodos semi-empíricos como la única alternativa posible. Desafortunadamente, en este trabajo hemos comprobado que los métodos semi-empíricos más comunes como AM1, PM3 o PM6, no son capaces de reproducir el perfil de potencial asociado a la rotación de los diedros definidos en la cadena conjugada de  $\beta$ -caroteno que se obtiene con métodos más elevados, como B3LYP/6-31G(d), subestimando claramente las barreras de energía e incluso localizando los mínimos en conformaciones diferentes, como se aprecia en la Figura 5.1. Cabe esperar, por tanto, que este campo de fuerzas semi-empírico de lugar a un muestreo incorrecto y por ello lo hemos descartado.



**Figura 5.1** – Perfiles de energía calculados con distintos métodos semiempíricos (AM1,PM3,PM6) y uno DFT (B3LYP/6-31G(d)) para los diedros D8 y D10 de  $\beta$ -caroteno (definidos en el texto).





**Figura 5.2** – Esquema seguido para la obtención de los parámetros del campo de fuerzas para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina.

Llegamos entonces a la conclusión, entonces, de que la mejor opción consiste en emplear un campo de fuerzas empírico y encontramos distintas posibilidades a la hora de seleccionar el que mejor se adapte a nuestro caso. Por un lado, existen algunos campos de fuerza “genéricos”, como GAFF[Wang 04] o CGenFF [Vanommeslaeghe 10], que incluyen mecanismos de parametrización de nuevas moléculas, aunque suelen estar orientados a moléculas pequeñas, como fármacos que interactúan con proteínas. Por otro lado, existe también una parametrización dentro del campo de fuerzas CHARMM específica para algunos derivados de retinol [Loccisano 05], en la que se incluyen los efectos de la alternancia del orden de enlace, que pueden ser extrapolada fácilmente a los carotenoides de nuestro estudio. No obstante, recordemos que en este trabajo estamos especialmente interesados en un correcto muestreo de la rotación de los enlaces de la cadena conjugada, para lo que necesitamos que los potenciales asociados a dichas rotaciones obtenidos con el campo de fuerzas se aproximen a los valores de referencia, que son los potenciales calculados a nivel B3LYP/6-31G(d). Estudios anteriores en nuestro grupo de investigación indican que este nivel de cálculo es muy adecuado para explorar el espacio conformacional de los carotenoides [Cerón-Carrasco 09a]. De esta forma, hemos desarrollado una parametrización de estas moléculas primando en los ajustes la reproducción adecuada de los perfiles energéticos de estos diedros obtenidos con los cálculos DFT.

Con objeto de conseguir un campo de fuerzas consistente con el escogido para las membranas y los complejos fotosintéticos (ambos parte de CHARMM), la parametrización de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina se ha llevado a cabo siguiendo el esquema de parametrización que se muestra en la Figura 5.2, adaptado del protocolo propuesto por Vanommeslaeghe y colaboradores [Vanommeslaeghe 10] para parametrizar compuestos genéricos compatibles con CHARMM. En primer lugar, seleccionamos los valores de los parámetros de Lennard-Jones entre los correspondientes a las partículas análogas ya definidas en el campo de fuerzas original [MacKerell 98], como se indica en la Tabla 5.2. La elección de estos parámetros vienen guiada por analogía, aunque para algunos de ellos como los de tipo aromático que representan los carbonos de la cadena conjugada, la equivalencia no es exacta. Sin embargo, en lo que respecta a los paráme-

**Tabla 5.2** – Descripción de las partículas empleadas en el campo de fuerzas de carotenoides, incluyendo los tipos atómicos de CHARMM que se han asignado en cada caso.

Átomo	Posición	Tipo atómico CHARMM
C	Cadena conjugada	CA (carbono aromático)
H	Cadena conjugada	HP (hidrógeno aromático)
C	CH <sub>3</sub> Anillo	CT3 (carbono <i>sp</i> <sup>3</sup> con 3 hidrógenos)
C	CH <sub>2</sub> Anillo	CT2 (carbono <i>sp</i> <sup>3</sup> con 2 hidrógenos)
C	CH <sub>1</sub> Anillo	CT1 (carbono <i>sp</i> <sup>3</sup> con 1 hidrógeno)
C	C Anillo <sup>a</sup>	CT1 (carbono <i>sp</i> <sup>3</sup> sin hidrógenos)
H	Anillo ionona	HA (hidrógeno no polar)
O	Hidroxilo Anillo <sup>b</sup>	OH1 (oxígeno hidrofílico)
H	Hidroxilo Anillo <sup>2</sup>	H (hidrógeno polar)

<sup>a</sup> Al no existir un carbono similar en CHARMM, se emplea el mismo tipo que para CH<sub>1</sub>.

<sup>b</sup> Solo en zeaxantina.

tros de Lennard-Jones, tanto este tipo atómico como, por ejemplo, los asociados a los carbonos conjugados propuestos en el nuevo campo de fuerzas de MacKerell y su equipo [Loccisano 05], resultan ser muy similares, lo que apoya la selección hecha aquí entre los elementos originales del campo de fuerzas.

Las cargas parciales se calculan mediante ajustes al potencial electrostático obtenido usando la función de onda MP2/6-31G(d), de acuerdo con el esquema de Merz-Singh-Kollman [Singh 84, Besler 90]. Posteriormente, se imponen algunos ajustes adicionales, como la asignación de la misma carga a átomos equivalentes de la molécula, ya sea por simetría o por rotación, y otras restricciones típicas del campo de fuerzas CHARMM, como que las cargas de los hidrógenos aromáticos estén próximas a 0.09 u.a. para HP y 0.114 u.a. para HA. Aunque el protocolo de CHARMM implica refinar las cargas para reproducir las interacciones entre las especies a parametrizar y las moléculas de agua, en este trabajo nos hemos quedado con las cargas asignadas inicialmente en el ajuste al potencial electrostático, lo que se justifica de acuerdo con carácter no polar de los carotenos y con que el esquema de ajuste de cargas de Merz-Singh-Kollman proporciona, en general, un buen conjunto de cargas parciales iniciales en el protocolo CGenFF [Vanommeslaeghe 10]. Por su parte, en el caso del grupo polar hidroxilo, sus cargas se refinan a partir de la correspondiente al tipo atómico OH1 en el campo de fuerzas CHARMM, manteniendo en todo caso la electroneutralidad de la molécula. En la Tabla 5.3 se incluyen las cargas parciales obtenidas siguiendo este esquema para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina (la numeración se corresponde con la indicada en la Figura 5.22).

Los parámetros enlazantes iniciales se han tomado del campo de fuerzas CHARMM por analogía y, en el caso de los correspondientes a la cadena conjugada, algunos de ellos se han ajustado a los perfiles energéticos resultantes de barridos conformacionales obtenidos mediante cálculos MP2/6-31G(d), que es el método teórico propuesto en el protocolo CGenFF [Vanommeslaeghe 10], para el modelo de polieno reducido: 4-metil-2,4,6-octatrieno. En la Tabla 5.4 se incluyen los parámetros correspondientes a los enlaces y ángulos obtenidos en este trabajo.

**Tabla 5.3** – Cargas parciales empleadas para describir las interacciones electrostáticas para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, obtenidas como se indica en esta Tesis y de acuerdo con la parametrización de Loccisano y colaboradores.

Átomo	Zeaxantina	$\beta$ -Caroteno	Retinol <sup>a</sup>
C1	0.72	0.50	0.00
C2	-0.47	-0.23	-0.18
HR21	0.10	0.09	0.09
HR22	0.10	0.09	0.09
C3	0.41	-0.01	-0.18
H31	-0.01	0.09	0.09
H32	–	0.09	0.09
C4	-0.35	-0.23	-0.18
H41	0.11	0.09	0.09
H42	0.11	0.09	0.09
C5	0.39	0.24	0.00
C6	-0.54	-0.46	0.00
C7	0.12	0.10	-0.15
H7	0.08	0.14	0.15
C8	-0.36	-0.32	-0.15
H8	0.16	0.14	0.15
C9	0.25	0.24	0.00
C10	-0.31	-0.32	-0.15
H10	0.15	0.14	0.15
C11	0.00	0.00	-0.15
H11	0.13	0.14	0.15
C12	-0.35	-0.32	-0.15
H12	0.17	0.14	0.15
C13	0.28	0.24	0.00
C14	-0.29	-0.32	-0.15
H14	0.13	0.14	0.15
C15	-0.09	-0.10	–
H15	0.15	0.14	–
C31	-0.49	-0.46	-0.27
H311	0.11	0.09	0.09
H312	0.11	0.09	0.09
H313	0.11	0.09	0.09
C32	-0.49	-0.46	-0.27
H321	0.11	0.09	0.09
H322	0.11	0.09	0.09
H323	0.11	0.09	0.09
C33	-0.47	-0.40	-0.27
H331	0.12	0.09	0.09
H332	0.12	0.09	0.09
H333	0.12	0.09	0.09
C34	-0.35	-0.28	-0.27
H341	0.10	0.09	0.09
H342	0.10	0.09	0.09
H343	0.10	0.09	0.09
C35	-0.32	-0.28	-0.27
H351	0.09	0.09	0.09
H352	0.09	0.09	0.09
H353	0.09	0.09	0.09
O1	-0.67	–	–
HO1	0.41	–	–

<sup>a</sup>Tomada de la parametrización de CHARMM [Loccisano 05]

**Tabla 5.4** – Parámetros empíricos de los términos asociados a enlaces y ángulos para describir las interacciones de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina. En la definición de cada uno de los términos se especifican los átomos que forman los enlaces ( $i - j$ ) y los ángulos ( $i - j - k$ ) así como el tipo de enlace usando la nomenclatura “-” para enlace sencillo y “=” para enlace doble.

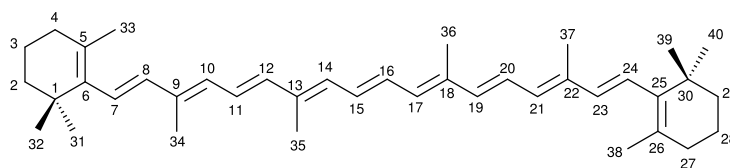
Enlaces: $V_{ij}^{bond} = \frac{1}{2}k_b(r_{ij} - b_0)^2$				
Definición	$b_0$ (nm)	$k_b$ (kJ mol <sup>-1</sup> nm <sup>-1</sup> )		
CA=CA*	0.135	255224.0		
CA-CA*	0.143	220000.0		
CT1-CA#	0.149	192464.0		
CT2-CA	0.149	192464.0		
CT3-CA	0.149	192464.0		
CT2-CT1	0.1538	186188.0		
CT2-CT2	0.153	186188.0		
CT3-CT1	0.1538	186188.0		
CT3-CT2	0.1528	186188.0		
HA-CT1	0.1111	258571.2		
HA-CT2*	0.110	258571.2		
HA-CT3*	0.110	269449.6		
HP-CA*	0.109	284512.0		
OH1-CT1	0.142	358150.4		
OH1-H	0.096	456056.0		

Ángulos + Urey-Bradley: $V_{ijk}^{angle} = \frac{1}{2}k_\alpha(\alpha_{ijk} - \alpha_{ijk}^0)^2 + k_{UB}(r_{ik} - r_{ik}^0)^2$				
Definición	$\alpha^0$ (grados)	$k_\alpha$ (kJ mol <sup>-1</sup> grados <sup>-1</sup> )	$r_{1,3}^0$ (nm)	$k_{UB}$
CA=CA-CA*	123.00	334.7200	0.246	29288.0
CT3-CA $\simeq$ CA*	124.00	383.2544	0.254	29288.0
HP-CA $\simeq$ CA*	120.00	251.04	0.210	18409.6
HP-CA-CT3#	118.00	251.04	0.210	18409.6
HA-CT3-CA	107.50	412.5424	0.0	0.0
CT2-CA $\simeq$ CA	122.30	383.2544	0.0	0.0
CT1-CA $\simeq$ CA#	122.30	383.2544	0.0	0.0
CT2-CA-CT3#	122.30	383.2544	0.0	0.0
CT2-CT1-CA#	107.50	433.4624	0.0	0.0
CT3-CT1-CA#	107.50	433.4624	0.0	0.0
CT2-CT2-CA#	107.50	433.4624	0.0	0.0
HA-CT2-CA	107.50	412.5424	0.0	0.0
CT2-CT2-CT1	113.50	488.2728	0.2561	9338.688
CT2-CT2-CT2	113.60	488.2728	0.2561	9338.688
CT3-CT1-CT2	114.00	446.4328	0.2561	6694.4
CT3-CT1-CT3	114.00	446.4328	0.2561	6694.4
HA-CT2-CT1	110.10	279.74224	0.2179	18853.104
HA-CT2-CT2	110.10	221.752	0.2179	18853.104
HA-CT2-HA	109.00	297.064	0.1802	4518.72
HA-CT3-CT	110.10	279.74224	0.2179	18853.104
HA-CT3-HA	108.40	297.064	0.1802	4518.72
H-OH1-CT1	106.00	481.16	0.0	0.0
HA-CT1-CT2	110.10	288.696	0.2179	18853.104
HA-CT2-CT1	110.10	279.74224	0.2179	18853.104
OH1-CT1-CT2#	110.10	633.4576	0.0	0.0
OH1-CT1-HA	108.89	384.0912	0.0	0.0
CT2-CT1-CT2#	111.00	446.4328	0.2561	6694.4
CT1-CT2-CA#	107.50	433.4624	0.0	0.0
CT1-CT2-CT#	107.50	433.4624	0.0	0.0

\*Modificado respecto CHARMM27.

# Añadido respecto a CHARMM27.



**Figura 5.3** – Estructura de  $\beta$ -caroteno indicando las etiquetas sobre los átomos de carbono.

A partir de aquí, se fijan los parámetros enlazantes asociados a los enlaces y ángulos, centrándonos en los términos diédricos, y realizando todos los cálculos para la molécula de  $\beta$ -caroteno. Como ya hemos comentado, la parametrización de los diedros se ha realizado tomando como referencia los barridos de potencial a lo largo de las rotaciones de los enlaces de la cadena conjugada calculados empleando B3LYP/6-31G(d). La elección de este nivel de cálculo queda respaldada por los buenos resultados que proporciona este funcional en base a estudios conformacionales y espectroscópicos previos con distintos carotenoides [Requena 08, Cerón-Carrasco 09a, Cerón-Carrasco 10a, Cerón-Carrasco 10b]. Para cada rotación, los barridos se llevan a cabo fijando el valor del diedro correspondiente en pasos equiespaciados de  $18^\circ$ , lo que da un total de 20 conformaciones, y optimizando el resto de la estructura en cada una. Concretamente, nos hemos centrado en los diedros involucrados en la rotación alrededor de los enlaces sencillos de la cadena conjugada, que son los diedros C5C6C7C8 (D6), C7C8C9C10 (D8), C9C10C11C12 (D10), C11C12C13C14 (D12), C13C14C15C16 (D14), y los equivalentes por simetría (las etiquetas sobre los carbonos son las indicadas en la Figura 5.3). Las rotaciones alrededor de los enlaces dobles se han llevado a cabo de forma similar.

Los datos generados se emplean entonces para determinar los términos del potencial diédrico de tipo coseno. Para ello se llevan a cabo barridos de los mismos diedros, calculando el potencial de mecánica molecular en cada paso mediante el campo de fuerzas en desarrollo, en el que los parámetros de los diedros se modifican para proporcionar el mejor ajuste con los potenciales B3LYP. Para los términos asociados a los dobles enlaces, cuya rigidez da lugar a barreras mucho mayores que, en la práctica, son menos relevantes en el estudio conformacional, se realiza este ajuste en un solo paso, mientras que en el caso de los diedros asociados a enlaces sencillos, se llevó a cabo un proceso iterativo en el que se modificaron tanto los términos de los diedros como algunos cargas parciales, hasta conseguir el mejor ajuste. Los parámetros resultantes de este protocolo son los que se muestran en la Tabla 5.5. Como cabe esperar, estos parámetros son los que presentan las mayores diferencias respecto a los valores originales de CHARMM.

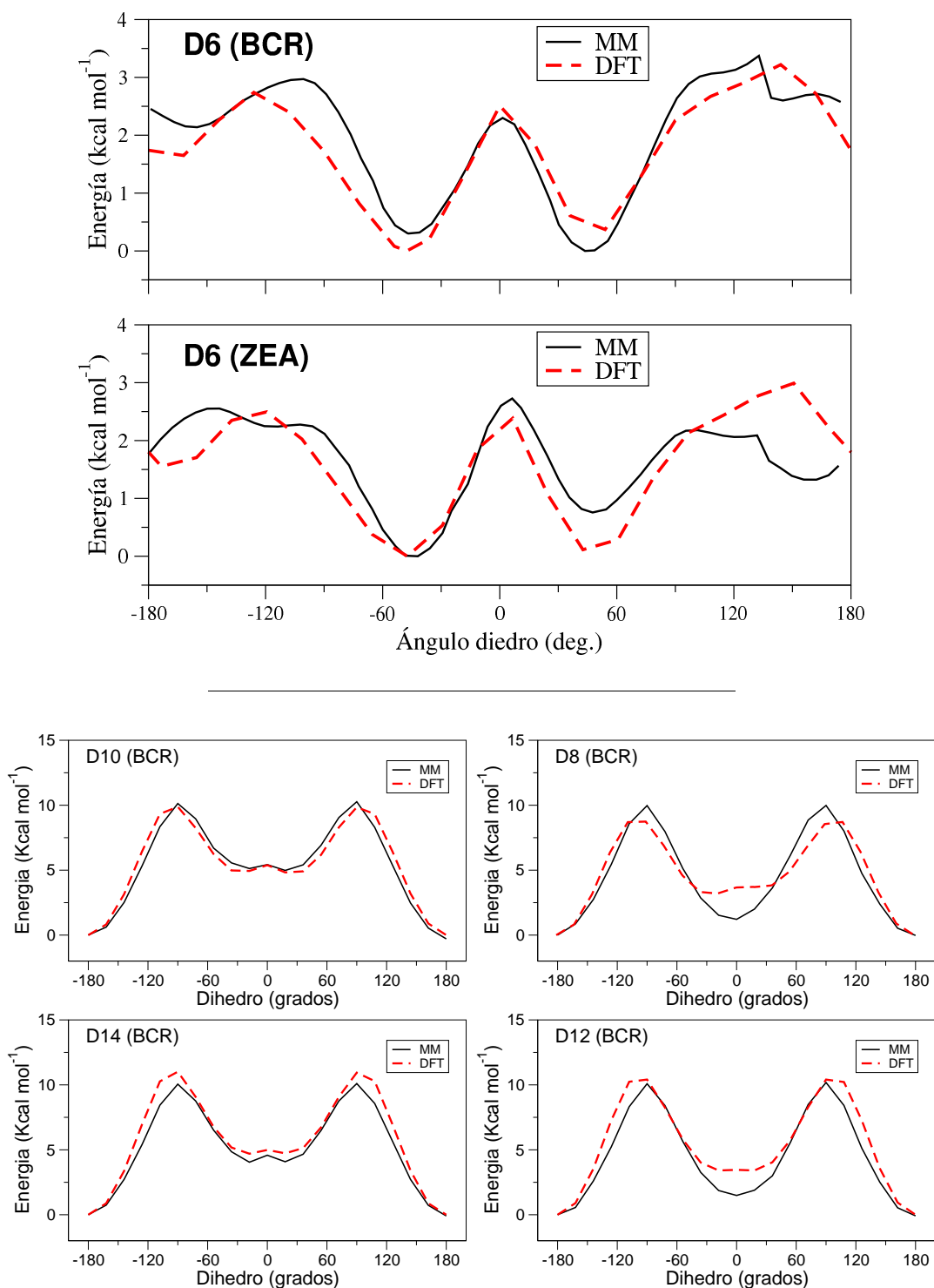
Los potenciales asociados a las rotaciones alrededor de los enlaces sencillos de la cadena obtenidos con el campo de fuerzas se muestran en las Figura 5.4, junto a los resultantes del cálculo B3LYP/6-31G(d). Concretamente, se muestran los barridos de todos los diedros asociados a los enlaces sencillos de  $\beta$ -caroteno (D6, D8, D10, D12 y D14), centrándonos en el diedro del extremos de la cadena, el D6, que se muestra también para zeaxantina y que se calcula empleando los mismos parámetros derivados para  $\beta$ -caroteno. En todos los casos se observa que los potenciales calculados con el campo de fuerzas para  $\beta$ -caroteno se ajustan bastante bien a los obtenidos mediante DFT. Vemos también en la Figura 5.4 que los barridos para los diedros D8, D10,

**Tabla 5.5** – Parámetros empíricos de los términos asociados a los diedros para describir las interacciones de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina. En la definición de cada uno se especifican los átomos que forman los enlaces ( $i-j-k-l$ ) así como el tipo de enlace usando la nomenclatura de “-” para enlace sencillo y “=” para enlace doble.

Diedros: $V_{ijkl}^{dihed} = \frac{1}{2}k_{\theta}(1 + \cos(n\theta_{ijkl} - \theta_{ijkl}^0))$			
Definición	$\theta^0$ (grados)	$k_{\theta}$ (kJ mol <sup>-1</sup> grados <sup>-1</sup> )	Mult.( $n$ )
CA=CA-CA=CA*	180.0	5.639	2
HP-CA-CA-HP*	180.0	5.373	2
CA=CA-CA-HP*	180.0	7.409	2
CA=CA-CA-CT3*	180.0	5.665	2
HP-CA-CA-CT3*	180.0	7.067	2
CA-CA=CA-CA*	180.0	23.3467	2
CT2-CA=CA-CT1#	180.0	23.3467	2
CT3-CA=CA-CT1#	180.0	23.3467	2
CT2-CA=CA-CA*	180.0	23.3467	2
CT-CA=CA-CA1#	180.0	23.3467	2
CT3-CA=CA-CA*	180.0	23.3467	2
HP-CA=CA-CA*	180.0	31.6310	2
HP-CA=CA-CT#	180.0	31.6310	2
HP-CA=CA-CT2*	180.0	31.6310	2
HP-CA=CA-CT3*	180.0	31.6310	2
HP-CA=CA-HP*	180.0	18.0749	2
HA-CT3-CA=CA*	180.0	0.494	3
HA-CT3-CA-CA*	0.0	0.494	3
CT2-CT1-CA-CA#	0.0	0.8368	3
CT3-CT1-CA-CA#	0.0	0.8368	3
X-CT1-CT2-CT2*	0.0	0.60	3
X-CT1-CT2-HA*	0.0	0.00	3
X-CT1-CT3-HA*	0.0	0.60	3
X-CT2-CT2-X	0.00	0.81588	3
X-CT2-CA-X	0.00	0.0	6
X-CT3-CA-X	0.00	0.0	6
H-OH1-CT1-CT2#	0.00	5.56472	1
H-OH1-CT1-CT2#	0.00	0.75312	2
H-OH1-CT1-CT2#	0.00	1.33888	3
HA-CT1-CT2-CA	0.00	0.16736	3
X-CT1-OH1-X	0.00	0.58576	3
X-CT1-CT2-CT1#	0.00	0.60	3
X-CT1-CT2-X	0.00	0.8368	3

\*Modificado respecto CHARMM27.

#Añadido respecto a CHARMM27.



**Figura 5.4** – Perfiles de energía potencial asociados a la rotación de los enlaces sencillos de la cadena conjugada: del D6 al D14 para  $\beta$ -caroteno (BCR) y el D6 para zeaxantina (ZEA) calculados con el campo de fuerzas desarrollado en este trabajo (MM) y con el funcional B3LYP con la base 6-31G(d) (DFT).

D12 y D14 se aproximan razonablemente bien a los calculados con DFT, aunque la región *cis* para los D8 y D12 se encuentra algo subestimada en el cálculo de mecánica molecular. Las barreras energéticas, desde la conformación más estable, se reproducen bastante bien, y resultan ser mucho mayores que la correspondiente al diedro D6. De hecho, este diedro, que da cuenta de la rotación del anillo de  $\beta$ -ionona, debe poseer una gran movilidad en la dinámica del carotenoide, debido a su baja barrera energética, y adquiere, por tanto, una gran importancia en la caracterización conformacional de esta molécula. Debido a ello, en la Figura 5.4 analizamos los perfiles energéticos asociados a este diedro tanto para  $\beta$ -caroteno como para zeaxantina. Como podemos observar, en los dos casos los potenciales asociados a este diedro calculados con el campo de fuerzas (MM) se ajustan bastante bien a los perfiles obtenidos con DFT, con barreras energéticas similares aunque, en el caso de zeaxantina, el mínimo MM asociado al confórmero *trans* se encuentra algo desplazado con respecto al cálculo mecanocuántico.

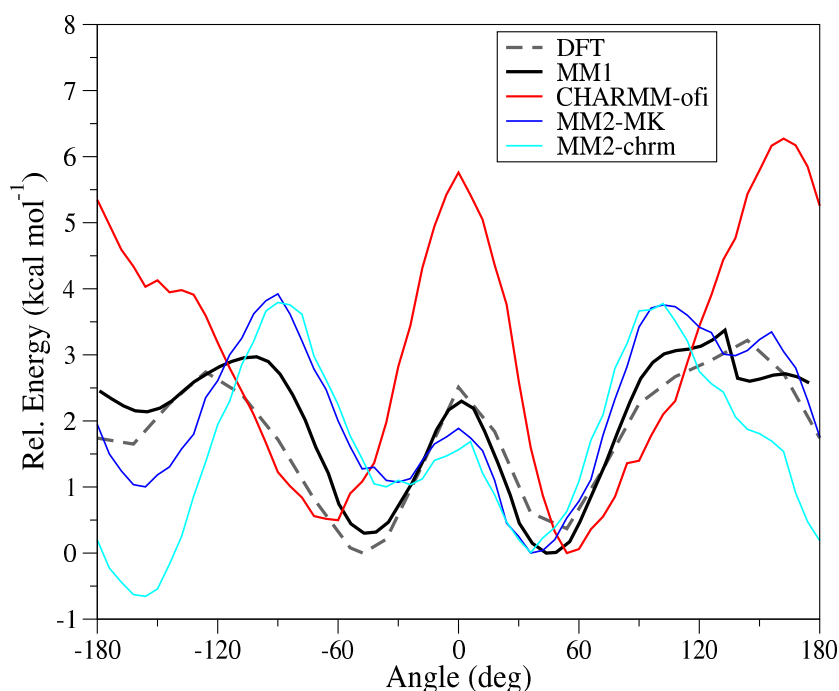
### Validación del campo de fuerzas

En este apartado analizamos detenidamente las propiedades del campo de fuerzas desarrollado en esta sección, denotado ahora como MM1, que comparamos con el conjunto de parámetros que forman parte de la distribución del campo de fuerzas CHARMM [Loccisano 05] (CHARMM-offi), que han sido diseñados especialmente para describir sistemas conjugados. El campo de fuerzas de Loccisano y colaboradores añade dos nuevos tipos atómicos para los carbonos de la cadena conjugada con objeto de describir la alternancia del orden de enlace, CC1A y CC1B, de forma que los enlaces entre dos elementos del mismo tipo son dobles, y entre tipos distintos, sencillos. Las cargas se asignan mediante unas sencillas reglas consistentes con las cargas del resto del campo de fuerzas CHARMM, en las que los hidrógenos alifáticos tienen carga 0.09 y los de la cadena conjugada 0.15, mientras que los carbonos contrarrestan la carga de los hidrógenos de forma que cada unidad  $\text{CH}_x$  tiene carga nula. En la distribución se incluyen los parámetros para retinol, que se pueden adaptar fácilmente a  $\beta$ -caroteno. En la Tabla 5.3 comparamos, por ejemplo, las cargas que proporciona este campo de fuerzas frente a las obtenidas en nuestra parametrización, donde se aprecian algunas diferencias, aunque, en ninguno de los dos casos se observa una gran separación de cargas.

Ya que los parámetros MM1 se centran en la reproducción los potenciales de los diedros, por su importancia en el estudio conformacional, y los de Loccisano y colaboradores pueden presentar algunas mejoras por la introducción de nuevos tipos atómicos específicos, puede resultar interesante construir un campo de fuerzas tomando de cada uno de ellos los aspectos más interesantes, es decir, los potenciales de los diedros de MM1 junto con los términos de la distribución de CHARMM para ángulos y enlaces, incluyendo el ingenioso sistema para describir la alternancia de orden de enlace con los dos tipos atómicos CC1A y CC1B. Denominamos a este campo de fuerzas MM2, del que damos dos versiones que se diferencian en la estrategia para determinar las cargas parciales, que se obtienen bien con las sencillas reglas indicadas anteriormente para el campo de fuerzas CHARMM (MM2-chrm) o bien con el esquema Merz-Singh-Kollman (MM2-MK), como se ha seguido para el MM1.

Para comenzar la comparación de los distintos campos de fuerza indicados, MM1, CHARMM-offi, MM2-chrm y MM2-MK, en la Figura 5.5 se muestra el perfil de energía potencial asociado a





**Figura 5.5** – Perfil de energía potencial asociado a la rotación del diedro D6 en  $\beta$ -caroteno calculado con los campos de fuerzas empíricos indicados en este apartado (MM1, CHARMM-ofi, MM2-chrm y MM2-MK) y con el funcional B3LYP con la base 6-31G(d) (DFT).

la rotación del diedro D6 calculado con todos los modelos, que, tal y como hemos comentado, es el que experimenta una mayor movilidad y, por tanto, es el más relevante para realizar un estudio conformacional. En esta figura podemos observar cómo el perfil energético obtenido con el campo de fuerzas desarrollado en este trabajo se ajusta mucho mejor al calculado con DFT, tal como cabe esperar, ya que los potenciales DFT han sido, precisamente, el objetivo en nuestro ajuste, mientras que los incluidos en CHARMM estarán obtenidos de forma más general asegurando la compatibilidad con el resto de elementos del campo de fuerzas. En cuanto al campo de fuerzas híbrido descrito en el párrafo anterior, si bien las barreras energéticas son más similares a las obtenidas con el método DFT y el campo de fuerzas aquí desarrollado, la estabilidad relativa de cada mínimo varía sustancialmente. Además, el uso de un conjunto de cargas u otro resulta también clave, observándose que las cargas derivadas del análisis de Merz-Kollman-Sing son indispensables para obtener un perfil energético correcto. Hay que tener en cuenta que, dada la poca diferencia energética existente entre las distintas conformaciones, la modificación de los parámetros da lugar a grandes variaciones del potencial, como ocurre al cambiar el conjunto de cargas. Esto sugiere que los parámetros para describir este diedro no son totalmente transferibles y que, por ejemplo, se requieran nuevos cambios para acomodar los actualizaciones realizadas en el campo de fuerzas. En cualquier caso, los nuevos parámetros desarrollados (MM1) resultan los más útiles para evaluar la conformación de los carotenoides en medios biológicos, aunque es posible adaptar el campo de fuerzas híbrido para poder conseguir reproducir el mismo potencial, labor que queda fuera del alcance del presente trabajo.

Para analizar con más en detalle los términos de enlaces y ángulos de los distintos campos de

fuerza hemos calculado la Hessiana para un polieno lineal con 11 dobles enlaces conjugados, en lugar de una molécula de caroteno, para evitar que los efectos estéricos afecten a las conclusiones, ya que en el caso del polieno lineal todos los métodos dan lugar prácticamente a la misma estructura optimizada. Una vez calculada la Hessiana, nos fijamos en las constantes de fuerza asociadas a los enlaces ( $k_b$ ) y ángulos ( $k_\alpha$ ) para comparar los distintos modelos, ya que dichas constantes permiten localizar de forma concreta los términos más problemáticos del potencial empírico. Estas constantes de fuerza quedan definidas de la forma:

$$k_b = \frac{\partial^2 V}{\partial r_b^2} \quad (5.2a)$$

$$k_\alpha = \frac{\partial^2 V}{\partial \alpha^2} \quad (5.2b)$$

es decir, son los términos diagonales de la Hessiana expresada en coordenadas internas que, de acuerdo con el procedimiento indicado en el Capítulo 4, se calculan partiendo de la correspondiente matriz en coordenadas Cartesianas, que proporcionan los programas GROMACS (para el cálculo de mecánica molecular) y Gaussian09 (para los cálculos mecanocuánticos). De echo, hemos calculado como valor de referencia las constantes de fuerza a nivel MP2/6-31G(d). Este método proporciona frecuencias próximas a las experimentales si se escalan con un factor adecuado, de 0.943 [Scott 96]. Consecuentemente, teniendo en cuenta la relación entre las constantes de fuerza y las frecuencias, debemos aplicar un factor de 0.89 a las constantes de fuerza [Vanommeslaeghe 10].

En la Tabla 5.6 comparamos las constantes de fuerza calculadas para el polieno con  $N_{dobles} = 11$  con cada modelo empírico (MM1, CHARMM-ofi, MM2-chrm y MM2-MK) con los valores de referencia, MP2/6-31G(d), usando como criterio la desviación cuadrática media:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \langle x \rangle)^2}{N}} \quad (5.3)$$

donde  $x_i$  y  $\langle x \rangle$  son los valores de cada elemento medido y el promedio, respectivamente, y  $N$  es el número de elementos. Se han calculado los valores de RMSD de las constantes de fuerza para todos los enlaces y ángulos de la molécula, y para las frecuencias vibracionales que, en ninguno de los casos resultaron tomar valores imaginarios, lo que confirma que con todos los métodos se obtuvo un mínimo.

Como vemos en la Tabla 5.6, los desplazamientos son muy similares para todos los modelos empíricos, lo que indica que el modelo MM1 desarrollado en este trabajo conduce a resultados espectroscópicos comparables a los obtenidos con la parametrización de Loccisano y colaboradores. Asimismo, se observa que los desplazamientos de las constantes de fuerza tanto de los enlaces como de los de ángulos parecen bastante altos, y de hecho suponen un desplazamientos relativo de en torno al 40% en el caso de los enlaces y de más de 2000% en el caso de los ángulos. Como hemos comentado, el hecho de usar las constantes de fuerza en coordenadas internas permite identificar los términos del potencial más problemáticos. En concreto, un análisis pormenorizado de las constantes de fuerza muestra que los mayores errores, respecto a los valores de referencia, se producen en los enlaces y ángulos que contienen un enlace sencillo dentro de

la cadena conjugada, es decir  $=C-C=$  y  $=C-C=C-$ , con errores relativos de hasta 60% en las constante de fuerza de enlaces y de hasta 4000% en ángulos. Esto indica que tanto el potencial desarrollado en este trabajo, como el distribuido en CHARMM, deben ser refinados para su uso en aplicaciones espectroscópicas, poniendo de relieve, además, que las modificaciones deben de realizarse en los términos relacionados con los enlaces conjugados. Aún así, los errores globales en las frecuencias armónicas obtenidos con los modelos aquí presentados son relativamente bajos, indicando que la dinámica vibracional está moderadamente bien descrita.

Al margen de los valores concretos de las constante de fuerza de los enlaces, un aspecto muy importante es el efecto de la conjugación a lo largo de la cadena de los carotenoides o polienos, que reduce el orden de los enlaces dobles y aumenta el de los enlaces sencillos conforme nos adentramos en el núcleo de la cadena conjugada [Kuki 91, von Doering 95].

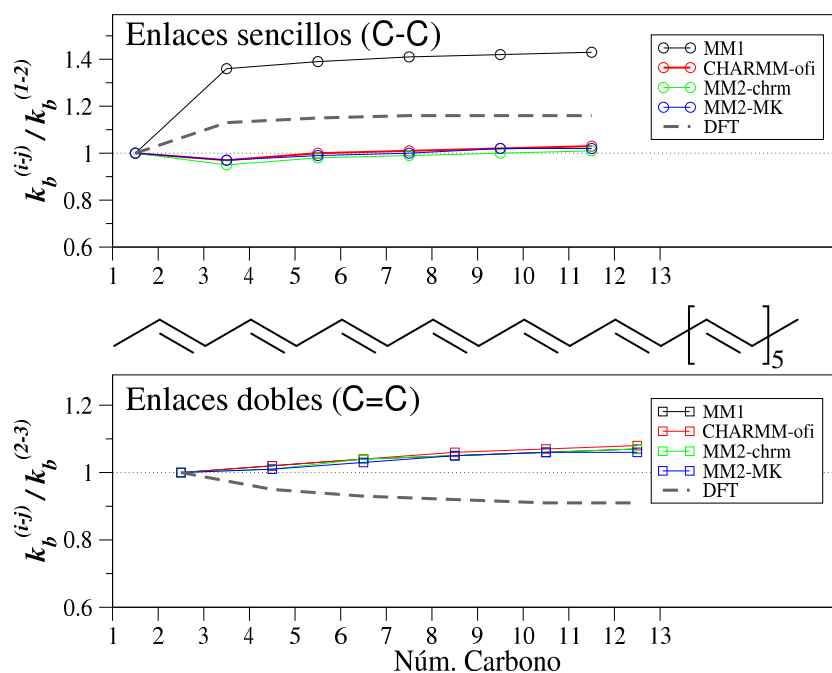
En la Figura 5.6 se muestran los valores relativos de las constantes de enlace para los distintos enlaces sencillos y dobles desde el extremo al núcleo del polieno con  $N_{dobles} = 11$ . Como cabe esperar, los resultados obtenidos con DFT reproducen el efecto de conjugación indicado, mostrando un incremento de la fuerza de enlace de los enlaces sencillos y una disminución de la fortaleza de los enlaces dobles hacia el interior de la cadena conjugada. Sin embargo, los potenciales empíricos fallan a la hora de dar cuenta de la variación de la fuerza de los enlaces a lo largo de la cadena. Especialmente relevante es el caso de los dobles enlaces, donde la variación de las constantes de fuerza muestra una tendencia contraria al efecto de la conjugación para los potenciales empíricos. Esta contradicción se puede relacionar con la naturaleza eminentemente cuántica de la conjugación, que no puede ser descrita correctamente mediante unos pocos parámetros empíricos, ya que, por ejemplo, se emplean los mismos parámetros enlazantes a lo largo de la cadena conjugada.

Nos encontramos, por tanto, ante una limitación inherente a los métodos empíricos. No obstante, y como ya hemos comentado, la reducción del coste computacional puede compensar esta falta de precisión si el modelo, con sus limitaciones, es capaz de responder adecuadamente a nuestras preguntas sobre el sistema. En nuestro caso estamos interesados en la dinámica conformational asociada a los diedros de la cadena por lo que, de acuerdo con los ajustes presentados en la Figura 5.4, el modelo MM1 parece satisfacer nuestras necesidades adecuadamente.

Por último, con el fin de evaluar el espacio configuracional muestreado con nuestro campo de fuerzas en el curso de una simulación, hemos llevado a cabo una dinámica corta de la molécula

**Tabla 5.6** – Desviación media (RMSD) de las constantes de fuerza de enlaces y ángulos calculadas con los modelos empíricos en comparación con los valores MP2 escalados.

Campo de Fuerzas	RMSD		
	$k_b$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{nm}^{-2}$ )	$k_\alpha$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{rad}^{-2}$ )	Frecuencias ( $\text{cm}^{-1}$ )
MM1	156260.7	17545.3	10.5
CHARMM-ofi	156929.0	17875.4	11.5
MM2-chrm	153055.1	17968.1	8.7
MM2-MK	153080.6	17979.8	8.7



**Figura 5.6** – Representación gráfica de los valores de las constantes de fuerza de enlace relativa, la del enlace  $(i - j)$  dividida por la del enlace más externo del mismo tipo: (1-2) para enlaces sencillos (arriba) y (2-3) para dobles (abajo), para el polieno lineal con  $N_{dobles} = 11$ . Se incluye la estructura de parte de esta cadena para indicar la posición de cada carbono.

de  $\beta$ -caroteno en agua, con un paso de integración de 1 fs, empleando el campo de fuerzas MM1 para el potencial del caroteno y el modelo TIP3P para las moléculas de agua. Como referencia, realizamos la misma simulación con un campo de fuerzas híbrido QM/MM, en el que las interacciones en el caroteno se evalúan con un método DFT, B3LYP/3-21G(d), las de las moléculas de agua con el potencial empírico TIP3P y las interacciones entre ambos se tratan con el esquema ONIOM. Como hemos comentado, el uso de potenciales DFT introduce un elevado coste computacional, lo que limita la duración de las simulaciones. Por esta razón, la dinámica de referencia solo se propagó durante 80 picosegundos, lo que permite validar el comportamiento dinámico más rápido, es decir, las oscilaciones respecto a la conformación inicial.

La Figura 5.7 muestra la variación de los ángulos de los diedros de la cadena conjugada que son el aspecto estructural en el que hemos centrado nuestro estudio. Más concretamente, en la figura comparamos la evolución de los valores de estos diedros a lo largo de la simulación realizada con el potencial híbrido QM/MM y con el campo de fuerzas MM1. Como podemos apreciar en la figura, en las dos simulaciones el diedro D6 oscila en torno a una conformación intermedia entre *cis* y *trans* y este diedro es, además, el que muestra una mayor variabilidad, aunque sin llegar a cambios conformacionales entre distintos mínimos. Podemos concluir que las simulaciones llevadas a cabo con el modelo QM/MM y el modelo MM1 dan lugar a una dinámica conformacional muy similar en el curso de esta corta simulación, en la que los ángulos diedros oscilan en torno a, prácticamente, los mismos valores, con un rango de dispersión muy similar, lo que apoya la validez del modelo desarrollado para el estudio conformacional de carotenoides.

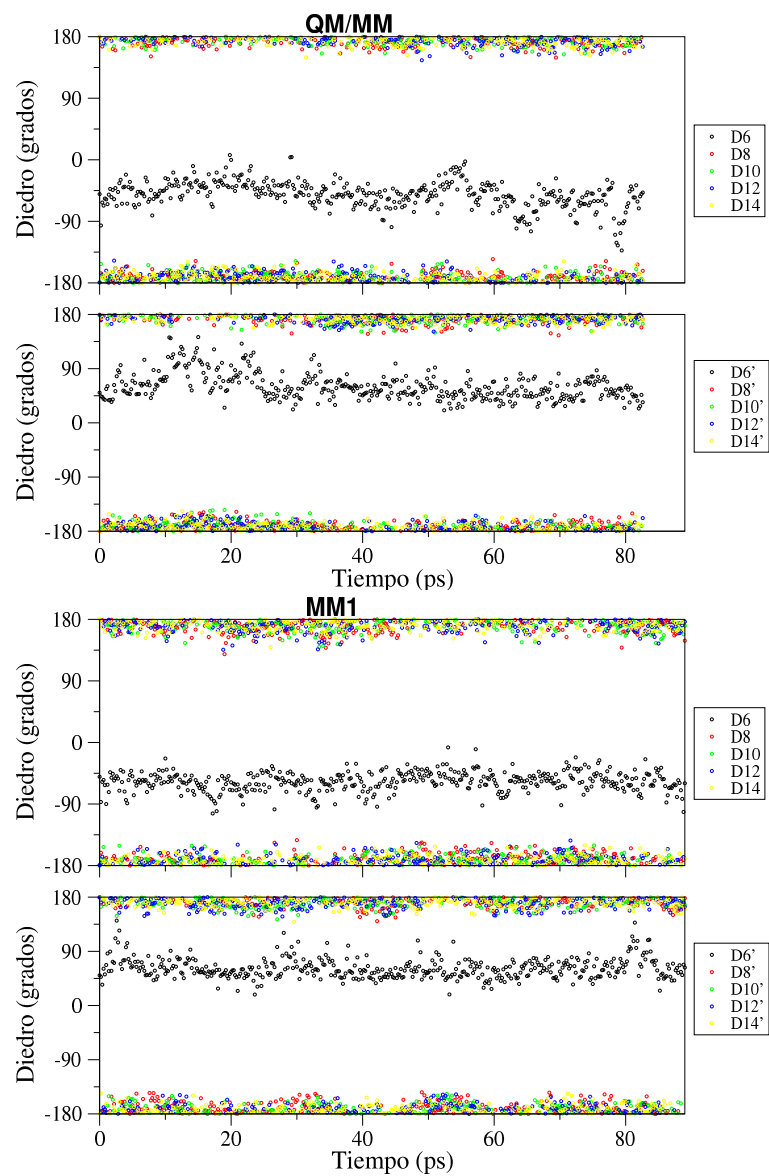
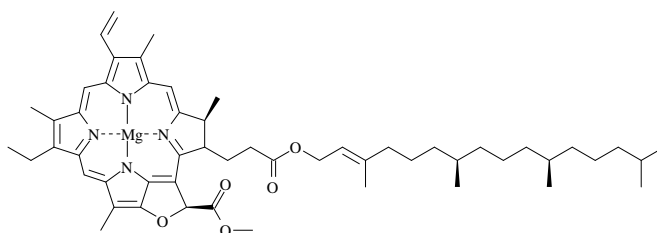


Figura 5.7 – Evolución de los valores de los diedros definidos a lo largo de la cadena conjugada.

#### 5.1.4. Modelización de fotosistemas

Otro tipo de sistemas biológicos que abordamos en ese trabajo son los fotosistemas que se encargan de la captación de luz que activa el transporte de electrones, iniciando así la fotosíntesis. En este caso, al margen de los parámetros necesarios para describir las interacciones moleculares, la modelización supone un reto importante debido a la complejidad del sistema, tanto en su estructura como en su composición. En efecto, los fotosistemas, formados principalmente por el complejo proteico, se caracterizan por contener en su interior una gran cantidad de moléculas que se encargan de captar la luz y transformarla eficientemente en energía química. Uno de los componentes más importantes son, de hecho, los pigmentos que se encuentran dispersos por el fotosistema para aumentar la absorción de radiación. Como ya hemos comentado, los carotenoides son un tipo de estos pigmentos, aunque los más abundantes son las clorofilas, un grupo de moléculas caracterizadas por un anillo de porfirina en el que se localiza un átomo de magnesio, como se muestra en la Figura 5.8. Otro componentes de los fotosistemas son las filoquinonas, que forman parte de la cadena de transporte de electrones, los clústeres de sulfuro de hierro (II),  $Fe_4S_4$ , y los lípidos dispersos en el complejo.



**Figura 5.8** – Estructura molecular de la molécula de clorofila A.

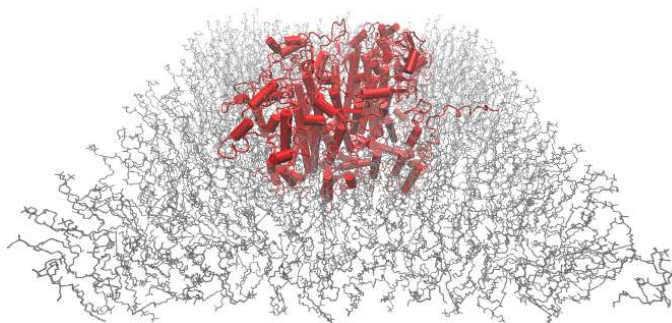
Dada la abundancia de las clorofilas, el volumen que ocupan dentro del fotosistema y el papel predominante dentro de los mismos, un modelo razonable de los estos complejos debe incluir necesariamente a estas moléculas. Del resto de compuestos, si bien pueden llegar a desempeñar funciones relevantes dentro del fotosistema, no cabe esperar que afecten decisivamente a la conformación de los carotenoides, que es lo que nos interesa en este trabajo, por lo que podemos prescindir de ellos con el fin de facilitar el modelados del sistema.

Incluso con estas simplificaciones, la modelización debe afrontar el problema de la limitada resolución de las técnicas de determinación estructural, como difracción de rayos-X o resonancia magnética nuclear (RMN). Es necesario entonces, en primer lugar, reconstruir la zonas incompletas del fotosistema mediante técnicas de modelado por homología. Para ello se emplea el programa SwissPDB [Guex 97], que permite reparar de forma sencilla la estructura de los residuos incompletos. En cuanto a las las moléculas de clorofila algunas partes del anillo de porfirina no se encuentran a veces en la estructura cristalográfica y, en todos los casos, la cadena de fitol está ausente debido su gran flexibilidad que impide localizarla experimentalmente en una región concreta del espacio. Para reconstruir estas zonas se ha desarrollado un procedimiento específico consistente en leer, en primer lugar, la conectividad e hibridación de cada átomo de una estructura completa de clorofila que se usa como plantilla, y emplear después esa información

para asignar la posición de los átomos ausentes, cumpliendo la conectividad e hibridación de la plantilla. Para las regiones incompletas del anillo de porfirina, esta información recoloca los átomos en una posición específica, pero para el caso de la cadena de fitol, que es una cadena hidrocarbonada flexible, son posibles un gran número de conformaciones, y hemos escogido la que da lugar a un menor impedimento estérico dentro del complejo, de acuerdo con un criterio de distancias atómicas. Esta metodología ha sido implementada en un programa FORTRAN que ha resultado ser suficientemente flexible como para poder reconstruir todas las clorofilas en diversos fotosistemas, dando lugar a configuraciones iniciales sin solapamientos atómicos. El programa se ha escrito, además, de forma que sea sencillo adaptarlo a la reconstrucción de otras moléculas de tamaño medio empleando la plantilla correspondiente. Tanto las estructuras cristalográficas como las resultantes tras la reconstrucción no contiene átomos de hidrógeno, dada la imposibilidad de determinar su posición cristalográfica, por lo que estos se añaden posteriormente mediante el programa *grompp*, incluido en el paquete de programas GROMACS.

A continuación, el fotosistema puede introducirse dentro de una bicapa que simule la membrana del tilacoide en la que se encuentran inmersos estos sistemas, siendo la bicapa de POPC un buen modelo en este sentido [Damjanović 02]. Para insertar el fotosistema recurrimos al protocolo propuesto por Kandt y colaboradores [Kandt 07], que ha sido implementado por los mismos autores en el código *inflategro*.

De esta forma conseguimos construir un modelo para el fotosistema, como el que se muestra en la Figura 5.9, que resulta adecuado para el análisis conformacional de los carotenoides y supone un punto de partida para modelos más elaborados que sirvan para evaluar los distintos procesos que tienen lugar en estos sistemas.



**Figura 5.9** – Fotosistema embebido dentro de una membrana de POPC mediante el procedimiento *inflategro*.

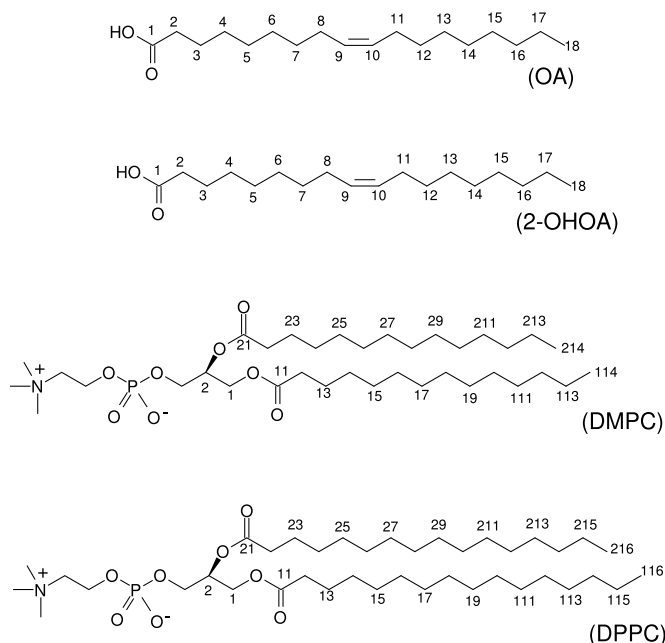
## 5.2. ÁCIDOS GRASOS TRANS EN MEMBRANAS CELULARES: TERAPIAS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA

Comenzamos investigando el efecto de los ácidos grasos *trans* dentro de las membranas modelo. La actividad terapéutica de estos ácidos se enmarca dentro de las llamadas terapias de lípidos de membrana (TLM), en las que se busca conseguir cambios en la actividad de proteínas asociadas a las membranas celulares mediante alteraciones estructurales inducidas en estas últimas [Escribá 06]. Esta aplicación terapéutica está motivada por la gran cantidad de proteínas que interactúan con membranas celulares, entre las que encontramos proteínas periféricas y de transmembrana, y constituye una alternativa a la modificación convencional de proteínas por interacción directa de los fármacos con las mismas. Los fármacos empleados en las terapias de membrana deben de ser capaces de interactuar con las mismas cambiando su estructura de forma significativa. Además, dada la gran diversidad de estructuras y composición lipídica de las membranas, este tipo de tratamientos tienen, potencialmente, una alta selectividad y, de hecho, se ha mostrado que una de las moléculas más prometedoras, el ácido 2-hidroxioléico, afectan de forma diferenciada a células sanas y tumorales [Martínez 05, Borchert 08].

El desarrollo racional de este tipo de fármacos requiere comprender los procesos involucrados en las distintas etapas del mecanismo, desde las modificaciones estructurales que se producen en la membrana tras la interacción con el fármaco, hasta la cascada de fenómenos fisiológicos que se suceden y desembocan, finalmente, en la acción farmacológica buscada [Escribá 06]. En este trabajo nos centramos en el primero de estos pasos, tratando de esclarecer los cambios que ocurren en la membrana tras la inserción en la misma de las moléculas terapéuticas. Concretamente, nos hemos centrado en dos ácidos grasos con una insaturación *cis* en la cadena: el ácido oleico (OA) y el ácido 2-hidroxioléico (2OHOA), ya que dicha insaturación se revela indispensable para la acción beneficiosa de estas moléculas [Pagnan 89, Vicario 98]. Las estructuras de estas dos moléculas se muestran en la Figura 5.10. La primera de ellas se encuentra presente en grandes cantidades y de forma natural en el aceite de oliva y es, de hecho, uno de los principales agentes identificados en las bondades de la Dieta Mediterránea, en la que el aceite de oliva ocupa un lugar destacado. La segunda molécula es un derivado del ácido oleico que, pese a la similitud estructural con este, muestra una mayor actividad terapéutica en distintos ámbitos, como en tratamientos antitumorales o combatiendo la hipertensión [Alemany 04, Alemany 06, Martínez 05, Borchert 08]. Tanto es así, que este ácido graso ha sido patentado con el nombre de Minerval [Escriba 02], convirtiéndose en el ejemplo más relevante de este tipo de terapias.

En este contexto, nuestro trabajo aborda el efecto diferenciado que provocan los dos ácidos grasos inmersos dentro de membranas celulares. Para ello, evaluamos sistemas en los que los ácidos grasos se insertan en bicapas lipídicas formadas por lípidos del tipo fosfatidilcolina (PC), como 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC). Este tipo de bicapas han sido ampliamente utilizadas como membranas modelo en estudio teóricos y experimentales, y se diferencian en la longitud de las colas lipídicas, como se observa en la Figura 5.10, lo que permite evaluar el efecto del espesor de la bicapa en los resultados. Además, con el fin de investigar el proceso por el cuál los ácidos grasos acaban





**Figura 5.10** – Estructuras moleculares de los dos ácidos grasos y los dos fosfolípidos estudiados en este trabajo, indicando la numeración empleada para los etiquetar los carbonos en los análisis realizados.

dentro de la membrana, hemos llevado a cabo simulaciones en las que los ácidos grasos se sitúan, inicialmente, en el exterior de la misma.

En los siguientes dos apartados se presentan los cálculos realizados para dilucidar el efecto de los dos ácidos grasos en la membrana. En el primero de ellos introducimos los detalles computacionales de las simulaciones, y en se detallan los resultados obtenidos.

### 5.2.1. Detalles Computacionales

Los sistemas bicapa fosfolipídica/ácido graso estudiados han sido: DMPC/OA, DMPC/2OHOA, DPPC/OA y DPPC/2OHOA. Estos se han construido a partir de las bicapas ya equilibradas con 128 moléculas de DMPC o DPPC (64 en cada lado), tomadas de un trabajo de Kukol [Kukol 09], incorporando dentro de ellas las cadenas de ácido graso de forma aleatoria hasta las concentraciones del 0 (membranas DMPC y DPPC puras), 3, 6, 11, 20, 33 y 45%. Se ha considerado también una concentración del 100% (membrana OA y 2OHOA puras), generando las bicapas a partir de cadenas individuales de los ácidos grasos mediante el programa *Packmol* [Martínez 09b].

Las simulaciones se han realizado con el programa GROMACS-4.0.7 y en cada caso, se ha llevado a cabo un equilibrado previo, de 0.5 ns, con un paso de integración de 1 fs, en condiciones *NVT* usando el termostato de Berendsen [Berendsen 84] ( $\tau_T = 0,1$  ps), hasta alcanzar los 314 K, que es la tempera a la que las bicapas se encuentran en la fase fluida que es la más

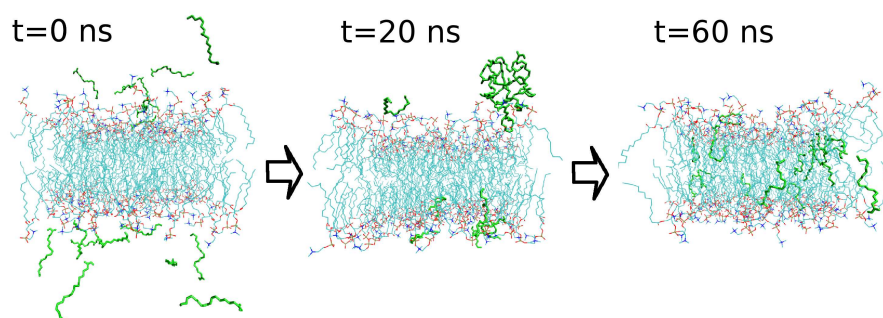
relevante biológicamente. Se continua con 1 ns en condiciones  $NpT$ , a la misma temperatura y una presión de 1 atmósfera, empleando el mismo termostato, junto con el barostato de Berendsen [Berendsen 84] ( $\tau_p = 1$  ps) y un paso de integración de 4 fs, que resulta estable al aplicar conjuntamente restricciones sobre todos los enlaces con el algoritmo LINCS [Hess 97]. Aunque el termostato y barostato de Berendsen resultan de gran utilidad para llevar los sistemas a condiciones de equilibrio, dan lugar a un colectivo termodinámico que no está bien definido y, por esta razón, una vez alcanzados los valores adecuados de presión y temperatura, cambiamos el algoritmo del termostato por el de Nosé-Hoover [Nosé 84, Hoover 85] ( $\tau_T = 1$  ps) y el del barostato por el de Parrinello-Rahman [Parrinello 81] ( $\tau_P = 2$  ps), continuando el equilibrado durante 10 ns más. La etapa de producción, en la que exportamos configuraciones para realizar los posteriores análisis se extendió finalmente durante 90 ns, manteniendo en todo caso las restricciones sobre los enlaces y empleando un paso de integración de 4 fs.

En cuanto a las simulaciones del proceso de inserción, la configuración inicial se construye colocando cadenas de ácido graso, OA o 2OHOA, de forma aleatoria en el exterior de la membrana pura de 128 lípidos DMPC, con una relación entre las cadenas de ácido graso y las de fosfolípido es de 11:89. El sistema se equilibra siguiendo un protocolo similar al indicado anteriormente y las simulaciones se extienden durante un máximo de 60 ns. Para asegurar la validez de los resultados, las simulaciones se han repetido cuatro veces por sistema partiendo de distintas distribuciones iniciales de los ácidos grasos, encontrando en todos los casos un comportamiento similar que, en la mayoría de ellos, conduce a la inserción de los ácidos en el tiempo de simulación. No resulta necesario realizar las simulaciones con DPPC, ya que cabe esperar que la inserción en este tipo de membranas siga un patrón similar debido a la semejanza las superficies las bicapas de DMPC y DPPC.

### 5.2.2. Efecto de los ácidos grasos sobre las membranas

En primer lugar, nos centramos en las trayectorias que simulan el proceso de inserción de los ácidos grasos desde la fase acuosa al interior de la bicapa, que indican el camino que siguen los ácidos grasos hasta introducirse en la membrana. En la Figura 5.11 se muestran tres conformaciones tomadas a lo largo de una de estas trayectorias. Se observa que, partiendo de una conformación inicial en la que las cadenas de ácido oleico se encuentran inicialmente distribuidas de forma aleatoria en la fase acuosa, en el curso de la dinámica las moléculas de ácido graso forman agregados que se aproximan a la superficies de la membrana y acaban introduciéndose en ella en los tiempos simulados.

Esta sucesión de etapas es común en los dos ácidos grasos, como hemos comprobado realizando un total de cuatro para simulaciones para para uno de ellos, siempre con la misma concentración. No obstante, conviene aclarar que no en todos los casos se observa la inserción dentro de los 60 ns simulados. Concretamente, en el caso del ácido 2-hidroxioléico la inserción no tiene lugar en dos de estas simulaciones lo que pone de manifiesto una posible diferencia entre las dos moléculas. El mayor tiempo de vida de los agregados formados por 2OHOA apunta a una mayor estabilidad de los mismos, lo que concuerda con el mayor número de interacciones polares entre las distintas cadenas como consecuencia de la presencia del grupo hidroxilo. Cabe destacar,



**Figura 5.11** – Conformaciones capturadas a lo largo de una trayectoria de inserción del ácido oleico en la membrana, en un instante inicial (izquierda), intermedio (centro) y final (derecha) de la dinámica.

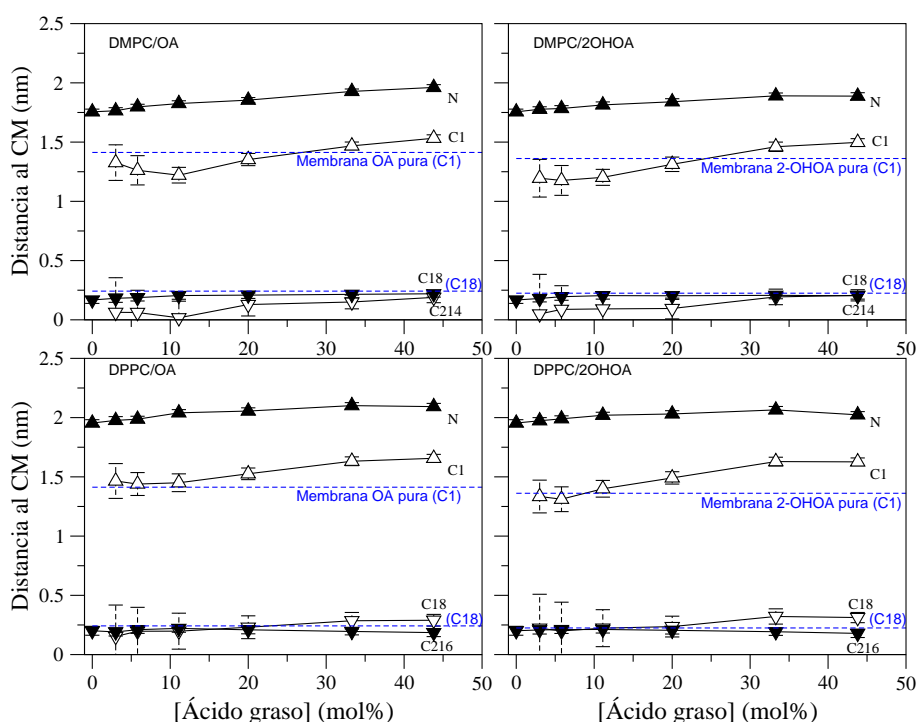
sin embargo, que el proceso de inserción transcurre de forma similar en ambos casos, y una vez que el agregado comienza a dispersarse en la bicapa, se produce la completa incorporación de todos los ácidos grasos que lo formaban.

Este mecanismo que conlleva la formación previa de agregados de ácido graso, da lugar a una distribución heterogénea de las moléculas al insertarse en la membrana, con microdominios que poseen una alta concentración. Este comportamiento encaja con los datos experimentales, que ponen de manifiesto una separación de fases en este tipo de bicapas [Inoue 01, Ongpipattanakul 91, Busquets 94], lo que, sin embargo, no se ha podido reproducir mediante simulaciones en las que los ácidos grasos se colocan inicialmente dispersos dentro de la membrana [Peters 09, Notman 07]. Además, el proceso de inserción ocurre en nuestras simulaciones de forma espontánea, lo que concuerda que este proceso de inserción haya mostrado estar favorecido termodinámicamente mediante estudios en bicapas modelo [Hoyrup 01] y explica los altos grados de incorporación de los ácidos grasos ingeridos en la dieta, que acaban finalmente dentro de las membranas plasmáticas [Escudero 98].

Una consecuencia importante de la separación de fases mostrada anteriormente, es la aparición de regiones en la membrana con una alta concentración de ácido graso. Este hecho da por bueno el rango de concentraciones de ácido graso en la membrana utilizado en este trabajo ya que, aunque puede sobrepasar la cantidad de ácido graso que se incorpora a la membrana, es útil para describir regiones con una alta densidad local de estas moléculas.

A continuación, analizamos los sistemas en los que los ácidos grasos OA y 2OHOA se encuentran inicialmente dispersos dentro de las bicapas de DMPC y DPPC, atendiendo a alteraciones de la membrana tanto estructurales, centradas en los cambios de la distribución de los lípidos en la membrana, como dinámicas, asociadas a los procesos de transporte.

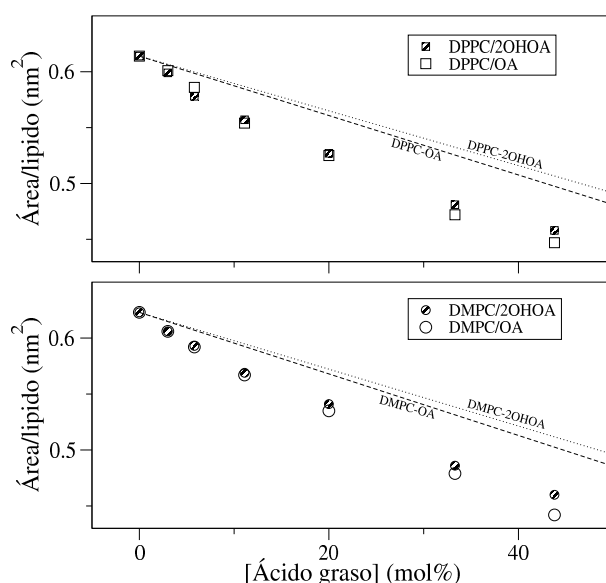
Comenzamos analizando las propiedades estructurales que se extraen de las posiciones que ocupan los átomos en el curso de la dinámica. Hemos seleccionado algunos átomos que son claros indicadores de las dimensiones de la membrana y de la posición de los ácidos grasos en la misma, como son los nitrógenos (N) de los grupos colina y los carbonos extremos de las colas hidrofóbicas (C214 para DMPC y C216 para DPPC)) para los fosfolípidos, y los carbonos extremos (C1 y



**Figura 5.12** – Posiciones atómicas promedio respecto al centro de masas (CM) para algunos elementos seleccionados en los sistemas formados por un fosfolípido (DMPC o DPPC) con distintas concentraciones de ácido graso (OA o 2OHOA). Las líneas horizontales azules marcan las posiciones atómicas promedio de membranas formadas únicamente por el ácido graso.

C18) para las cadenas de ácido graso. Para todos estos átomos calculamos su posición respecto del centro de masas de la membrana, en la dirección del eje normal, y realizamos a continuación el promedio sobre todos los átomos equivalentes a lo largo de la simulación. Así, por ejemplo, la distancia entre los nitrógenos de cada bicapa da una idea del espesor de la misma. En la Figura 5.12 se representan estas posiciones, donde hemos añadido además las desviaciones estándar encontradas mediante las barras de error. En este sentido, debemos recordar que los promedios se han realizado sobre los átomos equivalentes en la membrana, que suponen un número constante en el caso de los fosfolípidos (128), pero que varía para los ácidos grasos con cada concentración. Los sistemas con baja concentración dan por tanto peores estadísticas, hasta el punto de obtener, en el caso de la menor concentración de ácido graso (3%), una desviación excesivamente alta. Puesto que estos valores están sujetos a un error demasiado alto, hemos decidido eliminar este punto de todas las gráficas.

La Figura 5.12 muestra en primer lugar que al aumentar la concentración de ácido graso, tanto las bicapas de DMPC como las de DPPC se ensanchan al estirarse las cadenas de fosfolípido, como se deduce del cambio que se produce en la posición de los átomos de nitrógeno mientras queda fija la posición de los carbonos terminales (C214 y C216). Asimismo, se observa un desplazamiento del carbono carboxílico (C1) del ácido graso en el mismo sentido, que mantiene prácticamente su distancia con el átomo N de la cabeza polar de la bicapa, tanto en la bicapa de DMPC como en la de DPPC. En este último caso, el extremo de la cadena de ácido graso



**Figura 5.13** – Área por lípido promedio obtenidos para los diferentes sistemas formados por los fosfolípidos y los ácidos grasos, para distintas concentraciones de ácido grasos. Las líneas rectas indican el comportamiento de una mezcla ideal.

también se desplaza, ligeramente, hacia arriba. Todo esto apunta a que su localización en la membrana viene marcada por las interacciones que se producen entre los grupos carboxilo de los ácidos grasos y las cabezas polares de la bicapa.

Centrándonos en los puntos de mayor concentración y comparando el efecto de ambos ácidos grasos, se aprecia que la distancia C1(ácido graso)-N(fosfolípido) es ligeramente menor en el caso de 2OHOA, lo que puede deberse a la interacción adicional del grupo hidroxilo de 2OHOA con la región polar de la bicapa. Esta diferencia estructural entre los ácidos grasos es la única apreciable entre ellos y, aunque no es muy significativa, pone de manifiesto un comportamiento diferenciado entre ambos que concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores [Cordomi 10].

Los datos incluidos en la Figura 5.12 proporcionan información de las posiciones atómicas en el eje normal a la bicapa, lo que incluye su espesor. También es importante la estructura en el plano paralelo a la membrana, que queda caracterizada mediante el área por lípido. En este trabajo hemos calculado el área por lípido en los sistemas mezclados como el área promedio del plano  $xy$  de la caja de simulación dividida por el número de fosfolípidos y ácidos grasos en la membrana. En la Figura 5.13 mostramos los resultados obtenidos para los sistemas estudiados, junto con el perfil lineal que cabría esperar para una disolución ideal entre ambos lípidos.

Los valores de área por lípido calculados en las bicapas homogéneas de DMPC y DPPC son de  $0.62 \text{ nm}^2$  en los dos casos, lo que concuerda bien con el valor experimental de  $0.62$  y  $0.63 \text{ nm}^2$  para DMPC y DPPC, respectivamente [Nagle 00, Kucerka 05]. En cuanto a la variación con la concentración, nuestros valores concuerdan también con los obtenidos anteriormente para sistemas similares formados por fosfolípido y ácido oleico, también mediante dinámica molecular [Notman 07, Peters 09]. Se observa además que el área por lípido disminuye al aumentar la concentración, como resultado de introducir cadenas que ocupan un menor espacio transversal.

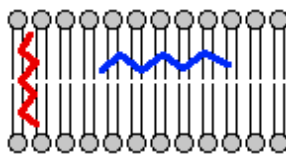
La disminución no sigue, sin embargo, una tendencia lineal, como cabría esperar si las áreas por lípido fueran aditivas, lo que indica que no forman una mezcla ideal, siendo las bicapas mezcladas más compactas. Esto pone de manifiesto que las interacciones entre lípidos son comparativamente mayores en las mezclas, con respecto a los sistemas homogéneos, lo que apunta a que se trata de disoluciones favorecidas termodinámicamente, como se ha comprobado experimentalmente [Hoyrup 01]. Nuevamente observamos que el efecto de los ácidos grasos OA y 2OHOA es muy similar, ya que solo se encuentran diferencias apreciables a altas concentraciones que, aun no siendo muy significativas, se pueden volver a relacionar con la distinta interacción entre las regiones polares ácidos grasos y fosfolípidos.

A continuación, nos centramos en la estructura que adoptan las cadenas de los lípidos y ácidos grasos dentro de la membrana, que queda descrita por el parámetro de orden. Esta propiedad da cuenta de la orientación relativa de los grupos metileno de las cadenas hidrocarbonadas proporcionando así información sobre el grado de orden de las cadenas en la bicapa. Hemos calculado, concretamente, el parámetro de orden de deuterio,  $S_{CD}$ , que, en muestras deuteradas, especifica la orientación relativa de los enlaces C-D con respecto a la dirección normal de la membrana [Tieleman 96] y que se puede medir experimentalmente mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN). Los valores experimentales permiten contrastar por tanto la calidad de los resultados obtenidos en las simulaciones para el parámetro de orden  $S_{CD}$ , que pueden calcularse a partir de su relación con los elementos del tensor de parámetro de orden [Egberts 88] mediante la expresión:

$$S_{CD} = \frac{1}{3}(2S_{xx} + S_{yy}) \quad (5.4)$$

donde los elementos de dicho tensor vienen dados por  $S_{ii} = \frac{1}{2}\langle 3\cos^2\theta_i - 1 \rangle$  ( $i = x, y$ ), siendo  $\theta_i$  el ángulo que forma la dirección normal a la bicapa con el  $i$ -ésimo eje molecular, y donde  $\langle \dots \rangle$  indica el promedio sobre el tiempo de simulación y sobre las moléculas equivalentes. Los ejes moleculares se definen siguiendo las convenciones usuales, incluyendo las específicas para carbonos insaturados cuando corresponde [Heller 93]. En concreto, para carbonos alifáticos, el eje  $x$  es el eje a lo largo del vector que une los hidrógenos, H-H y el eje  $y$  es la bisectriz del ángulo H-C-H, mientras que para carbonos insaturados, el eje  $z_k$  (siendo  $k$  el índice del carbono sobre el que medimos el parámetro) es el que sigue al vector que va de  $C_{k+1}$  a  $C_k$ , el eje  $x$  es el perpendicular al plano definido por el vector H-C y el eje  $z_k$ , y el eje  $y$  es perpendicular al plano definido por  $x$  y  $z_k$ . De acuerdo con la orientación relativa de los ejes moleculares, los parámetros de orden toman valores en el rango comprendido entre 1, cuando el eje C-D promedio es paralelo a la normal, y -0.5, cuando el eje C-D promedio es perpendicular a la normal, y se anula cuando los ejes moleculares adoptan una orientación aleatoria. En la Figura 5.14 se muestra un esquema de los dos casos extremos.

Veamos entonces los resultados obtenidos para el parámetro de orden en los sistemas estudiados, lo que permite analizar el efecto de la concentración de ácido graso en la estructura interna de la membrana. Comenzamos mostrando los valores correspondientes a las cadenas de DMPC y DPPC en la Figuras 5.15 y 5.16, en las que se incluyen, respectivamente, los parámetros de orden de los carbonos correspondientes a cada una de las cadenas del fosfolípido  $sn1$  y  $sn2$ . En el caso de membranas puras de DMPC o DPPC, los valores simulados concuerdan bien con



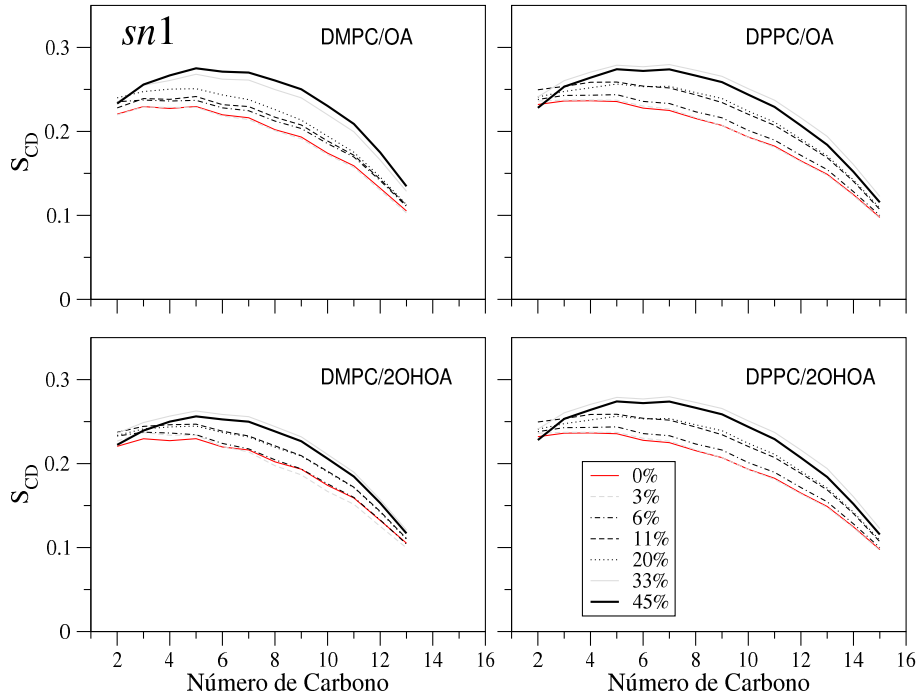
**Figura 5.14** – Representación esquemática de una cadena con  $S_{CD} = -0,5$  (rojo) y  $S_{CD} = 1$  (azul).

los los experimentales [Douliez 95, Petrache 00] y muestran un perfil en el que el parámetro disminuye conforme nos adentramos en el interior de la bicapa. Al encontrarse presente el ácido graso en grandes concentraciones, se observan variaciones importantes, principalmente, en los carbonos centrales. Este comportamiento es, de hecho, el esperado, si tenemos en cuenta la gran perturbación que provoca en esta región el doble enlace *trans* de los dos ácidos grasos estudiados. Cabe destacar también que el efecto producido por los dos ácidos grasos, OA y 2OHOA, es muy similar, lo que se justifica teniendo en cuenta que el origen de los cambios está en el efecto del doble enlace, que es el mismo en ambos casos.

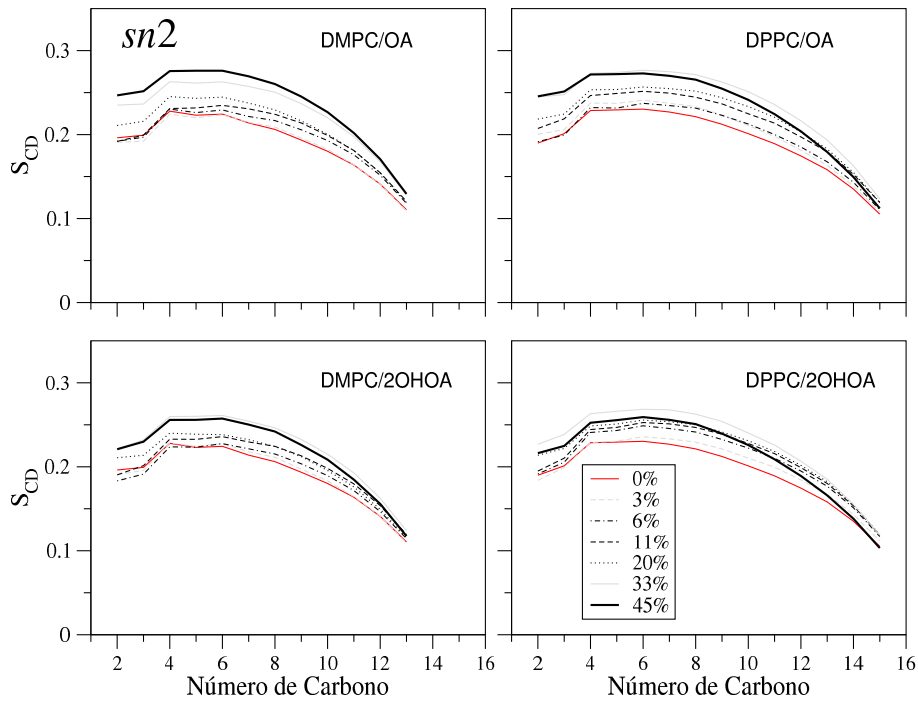
Por lo que respecta a los parámetros de orden correspondientes a los ácidos grasos, el perfil de los mismos no varía cualitativamente al aumentar su concentración en las membranas, poniendo de manifiesto en todos los casos el efecto del doble enlace, que produce un cambio brusco del parámetro de orden entre el carbono 9 y el 10. Los resultados, además, son prácticamente idénticos en DMPC y DPPC, indicando que las cadenas se encuentran en un entorno similar en ambas membranas, lo que concuerda con el hecho de que queden ancladas a la región polar de la membrana por la interacción del grupo carboxilo, tal y como hemos encontrado en el análisis de las posiciones atómicas. En cambio, la variación respecto al perfil en membranas puras de ácido graso sí presenta diferencias notables. Concretamente, se observan valores del parámetro de orden menores en las membranas puras de ácido graso, excepto en el entorno del doble enlace, donde los valores son muy similares en todos los casos. El aumento observado dentro de las membranas de fosfolípido se puede relacionar, también, con el entorno de bicapas ya que, al ser más anchas que las de formadas únicamente por ácido graso, permiten que las cadenas se orienten con más libertad dando lugar a un aumento del valor de  $S_{CD}$ . Comparando los perfiles de OA y 2OHOA, resulta interesante destacar que, si bien ambos perfiles son muy similares en membranas puras, al introducirse en las bicapas de DMPC o DPPC se observa una diferencia entre ellos dentro de las bicapas de PC, precisamente, en torno a los grupos carboxilo (C1 a C4). Este resultado pone de relieve, nuevamente, ligeras diferencias en la interacción de los ácidos grasos con las cabezas polares de la bicapa, que indicativas de cómo el grupo hidroxilo sobre el carbono 2 en 2OHOA lleva a una interacción diferenciada con la región polar de la bicapa.

Los análisis estructurales muestra que el grupo hidroxilo en 2OHOA interacciona de forma diferente con las cabezas polares de la bicapa que, en última instancia, son responsables de la distinta posición que adoptan dentro de la membrana. Aún así, el comportamiento de ambos ácidos grasos es muy similar y, para investigar más en profundidad otros aspectos diferenciadores, analizamos a continuación algunos procesos dinámicos que tienen lugar en el seno de la bicapa, como son la difusión de las cadenas y la permeabilidad de la membrana a sustancias externas.

En el caso de la difusión de las propias cadenas dentro de la membrana, que da una idea de

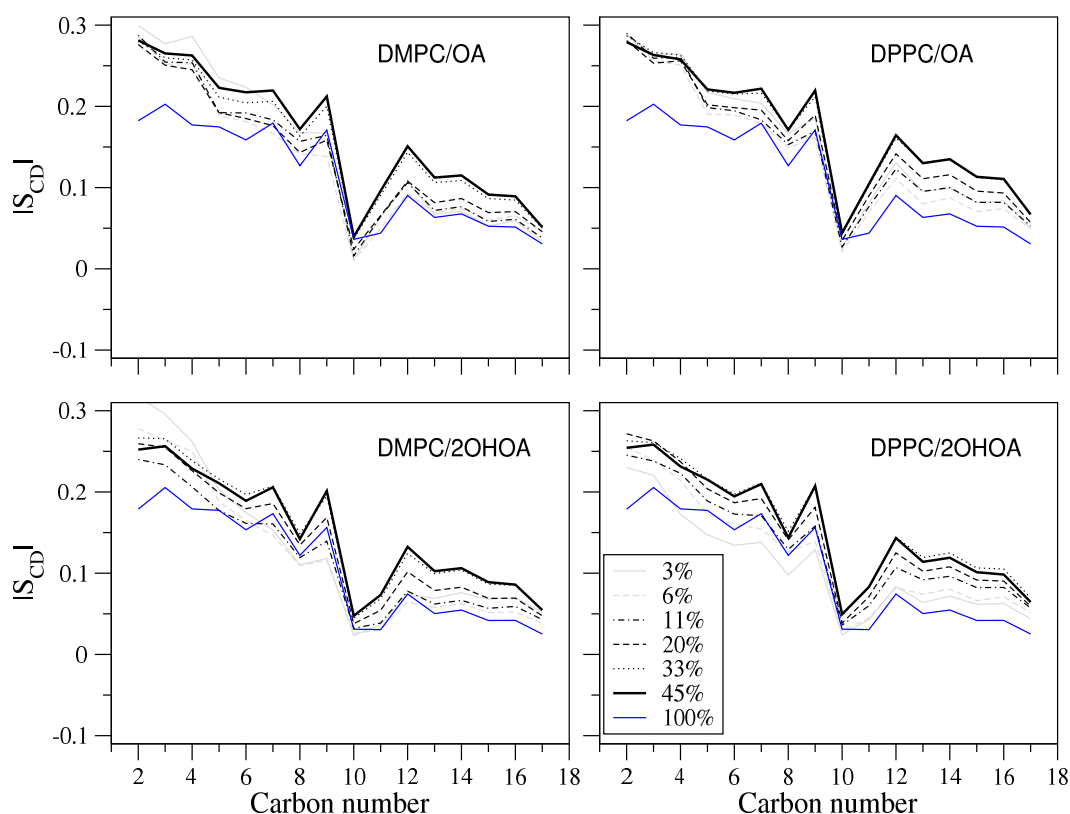


**Figura 5.15** – Parámetro de orden calculado para las cadenas *sn1* de los fosfolípidos en bicapas formadas por DMPC o DPPC junto con los ácidos grasos OA o 2OHOA en diferentes concentraciones.



**Figura 5.16** – Parámetro de orden calculado para las cadenas *sn2* de los fosfolípidos en bicapas formadas por DMPC o DPPC junto con los ácidos grasos OA o 2OHOA en diferentes concentraciones.

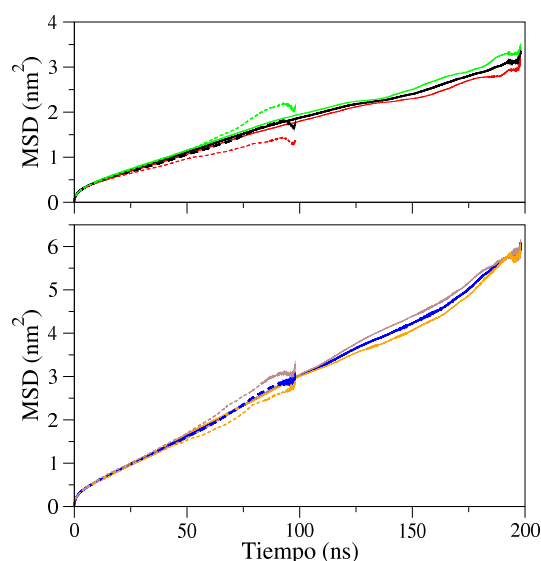




**Figura 5.17** – Parámetro de orden calculado para las cadenas de OA y 2OHOA en bicapas formadas por DMPC o DPPC y el ácido graso correspondiente en diferentes concentraciones.

la fluidez de las mismas, hemos calculado el coeficiente de autodifusión lateral de las cadenas de ácido graso y fosfolípido, medido en el plano paralelo a la bicapa, que se obtiene a partir de la pendiente del desplazamiento cuadrático medio (MSD) de las cadenas frente al tiempo, que, de acuerdo con la relación de Einstein para el movimiento Browniano en dos dimensiones, es igual a un cuarto del valor de la pendiente de dicha representación. El cálculo del MSD de las moléculas de ácido graso se ha realizando promediando los desplazamientos de los átomos de todos los fosfolípidos, lo que equivale a promediar los desplazamientos de los centros de masas de las cadenas [Wohlert 06]. Hemos eliminado, además, el movimiento lateral relativo entre los centros de masas de las dos monocapas, que se asocia a artefactos de la simulación [Anezo 03, Wohlert 06, Patra 04, Lindahl 01b], calculando de forma separada las curvas MSD en cada monocapa y sustrayendo el movimiento de su centro de masas. De esta forma, el valor final del coeficiente se calcula como la media de los resultados obtenidos en cada capa tomando y la incertidumbre asociada a la medida se toma como la mitad de la diferencia entre los valores medidos en cada capa.

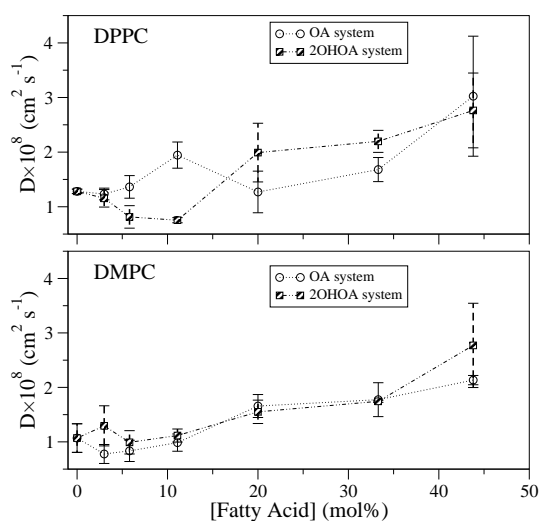
Dada la naturaleza estocástica del movimiento Browniano a tiempos largos, para obtener resultados aceptables hay que promediar sobre un gran número de trayectorias que se extiendan durante tiempos suficientemente largos [Wohlert 06]. Una estrategia para conseguir aumentar el número de trayectorias a partir de una misma dinámica consiste en tomar diferentes puntos de



**Figura 5.18** – Curvas de desplazamiento cuadrático medio (MSD) calculadas para las cadenas de OA y DPPC en una bicapa DPPC/OA (55:45) a partir de 100 o 200 ns de una misma simulación.

referencia a lo largo de la simulación, siempre que no estén correlacionados entre si. En nuestro caso, hemos tomado puntos de referencia cada 10 ps, lo que da 10000 curvas MSD frente a tiempo, a lo largo de los 100 ns simulados, que finalmente promediaremos. Cada curva MSD se extiende durante un tiempo dado por  $t_{total} - t_{ref}$ , donde  $t_{total}$  es el tiempo total simulado y  $t_{ref}$  es el tiempo en el que se toma la estructura de referencia. Conforme aumenta  $t_{ref}$ , la curva MSD resultante se extiende, por tanto, durante un tiempo menor, es decir, las trayectorias son cada vez más cortas. Como resultado, en la curva promedio final, disponemos de menos puntos en la región de tiempos altos para realizar los promedios y los valores de MSD serán más erráticos. Hemos realizado simulaciones de 100 ns y hemos extendido el tiempo de simulación hasta 200 ns en uno de los sistemas, DPPC/OA (55:45), para comprobar que proporcionan unos promedios adecuados de las curvas de desplazamientos. Los resultados de la curva de MSD para las cadenas de OA y DPPC se muestran en la Figura 5.18, donde se comprueba que, si bien las simulaciones de 100 ns presentan una mayor variabilidad entre los resultados de las dos monocapas, la curva promedio apenas se ve modificada, por lo que los valores obtenidos con 100 ns de simulación se consideran suficientes para este estudio.

Podemos apreciar también en la Figura 5.18 que la pendiente de la curva es diferente a tiempos cortos. En efecto, el régimen Browniano se manifiesta a tiempos suficientemente largos, mientras que a tiempos cortos, el comportamiento es marcadamente diferente [Wohlert 06], por lo que debemos descartar la primera parte de la curva. Además, teniendo en cuenta los promedios más pobres que se obtienen para tiempos muy largos, prescindimos también de la última parte de la curva. Concretamente, el cálculo de la pendiente para obtener los coeficientes de difusión se ha llevado a cabo en la región entre 20 y 80 ns. De esta forma, se han calculado los valores de estos coeficientes para las cadenas de OA o 2OHOA y de DMPC o DPPC. Hay tener en cuenta, además, que se debe realizar el promedio de las curvas MSD sobre toda las moléculas equivalentes en la membrana, por lo que los promedios serán mejores cuanto mayor



**Figura 5.19** – Valores de los coeficientes de autodifusión lateral de las cadenas de fosfolípido (DMPC o DPPC), obtenidas en todas las simulaciones realizadas.

sea el número de moléculas involucradas. Como ocurría en el cálculo de las posiciones atómicas, este número es el mismo en todas las simulaciones para las moléculas de fosfolípido (128), pero varía con la concentración para los ácidos grasos. Por esta razón, las curvas MSD promedio para las cadenas de ácido graso obtenidas para los sistemas donde la concentración de estos es muy baja son excesivamente variables. Esto impide la comparación entre los valores de los coeficientes de difusión de OA y 2OHOA en los sistemas de distinta concentración y únicamente presentamos los correspondientes al sistema en el que la concentración es mayor (45 %) y que tiene, por tanto, las mejores estadísticas. Los valores que se obtienen son  $[4,7 \pm 0,2] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (DMPC/OA),  $[4,6 \pm 0,6] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (DMPC/2OHOA),  $[6,8 \pm 0,9] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (DPPC/OA) y  $[6,7 \pm 0,1] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (DPPC/2OHOA). De estos resultados se puede concluir que los dos ácidos grasos muestran un movilidad similar, que es mayor en la membrana más ancha (DPPC) en la que deben tener mayor libertad de movimiento. En todo caso los valores observados son significativamente inferiores a los obtenidos en las membranas puras de ácido graso, que son  $[63 \pm 6] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (OA) y  $[66 \pm 9] \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (2OHOA).

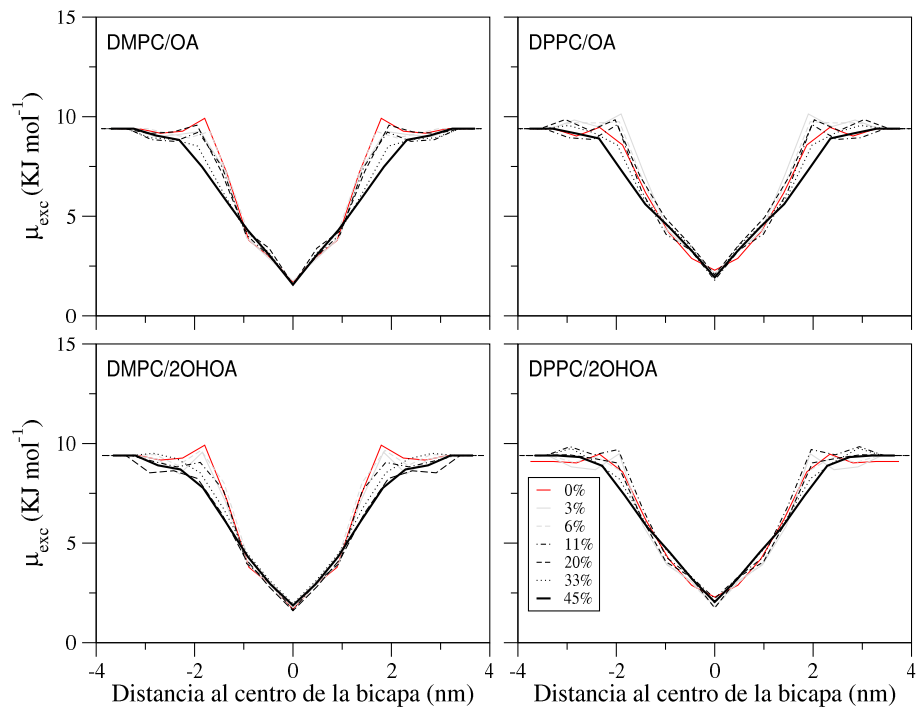
En cuanto a la difusión de las cadenas de fosfolípido, en la Figura 5.19 se representan los valores encontrados para todos los sistemas estudiados. Como se observa en esta figura, la tendencia general es un aumento de los coeficientes de autodifusión de los fosfolípidos con la concentración de los dos ácidos grasos. Este comportamiento resulta similar para DMPC y DPPC, y el efecto producido por OA y 2OHOA es también muy parecido. En consecuencia, si bien no es posible establecer una diferencia clara entre los dos ácidos grasos, sí que resulta evidente el efecto fluidizante producido por ambas especies, que concuerda con resultados previos de simulaciones para membranas formadas por DPPC y OA realizados por Notman y colaboradores [Notman 07] y que se pueden relacionar con una modulación estructural de la membrana asociada con los efectos terapéuticos. El aumento de la difusión a altas concentraciones de ácido graso, junto con el empaquetamiento inducido por la reducción del área por lípido, pueden jugar un papel importante en el comportamiento de las fases, por ejemplo en la estabilización de la fase L- $\alpha$

[Barceló 04].

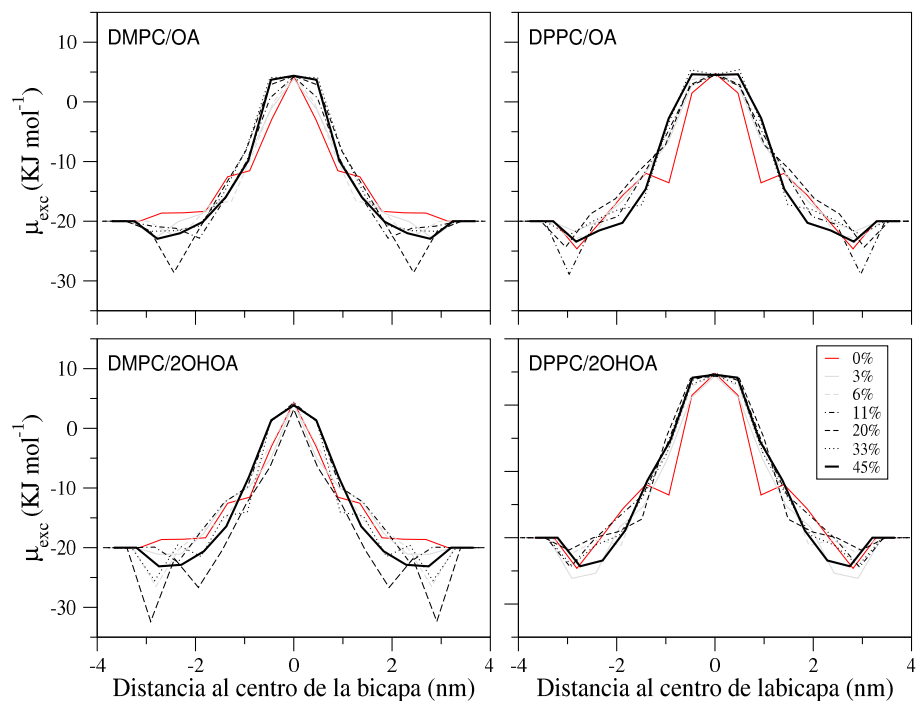
La otra propiedad dinámica analizada ha sido la permeabilidad de las bicapas a partículas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, escogiendo en cada caso una molécula sencilla representativa de cada polaridad, como son metano como partícula hidrofóbica y agua como hidrofílica. La permeabilidad se puede estudiar analizando el perfil energético asociado a la partícula a lo largo de la dirección normal a la bicapa. Así, hemos calculado el potencial químico en exceso asociado a la inserción de la molécula mediante el método de Widom [Widom 63], con la modificación propuesta por Notman y colaboradores [Notman 07], que consiste en cortar la celda de simulación en porciones transversales y limitar las inserciones a una de estas regiones, de forma que realizando inserciones sucesivas en todas las porciones obtenemos el perfil del exceso de potencial químico a lo largo de la normal a la membrana. En la Figuras 5.20 y 5.21 se muestran, respectivamente, los perfiles asociados a la inserción de una molécula de metano y agua en los distintos sistemas estudiados.

Como cabe esperar, la diferencia más notable entre los perfiles de potencial de ambas partículas se localiza en la región interna de la bicapa donde, de acuerdo con la naturaleza hidrofóbica de las cadenas lipídicas, la inserción de moléculas apolares como metano esta favorecida, y la inserción de partículas polares como el agua no lo está. Centrándonos en la inserción de metano (Figura 5.20), vemos que la región menos favorecida es, como cabe esperar, la correspondiente a las cabezas polares de la bicapa, produciendo una pequeña barrera frente a la inserción de estas partículas en las membranas de fosfolípido puras. Al añadir cadenas de ácido graso, OA o 2OHOA, en la bicapa, se observa que esta barrera desaparece, de forma que la inserción en la bicapa desde la fase acuosa pasa a convertirse en un proceso sin impedimentos cinéticos. El mismo efecto se observa independientemente del tipo de fosfolípido (DMPC o DPPC) y ácido graso (OA o 2OHOA), y la reducción del potencial en la región polar se acentúa conforme aumenta la concentración de este último. Puede concluirse, por tanto, que la reducción de la pequeña barrera se debe a los cambios que conlleva la inclusión de las cadenas de ácido graso en la región polar, lo que concuerda con los cambios estructurales observados en los análisis anteriores.

Por lo que respecta a la inserción de las cadenas hidrofílicas, el potencial químico presenta una barrera de más de 20 kJ/mol ( $\sim 5$  kcal/mol) en la región central de la bicapa, indicando que la penetración de este tipo de moléculas no es un proceso probable. La inserción de los ácidos grasos no modifica la altura de esta barrera, aunque sí produce un ensanchamiento de la misma, lo que se puede relacionar con los cambios estructurales que se ocurren en el interior de la membrana, como son el mayor empaquetamiento mostrado en las medidas de área por lípido y en la modificación de los parámetros de orden asociados a los carbonos del interior de la bicapa.



**Figura 5.20** – Perfil de potencial químico en exceso ( $\Delta\mu_{exc}$ ) asociado a la inserción de una partícula de metano a lo largo de la dirección normal de la bicapa.



**Figura 5.21** – Perfil de potencial químico en exceso ( $\Delta\mu_{exc}$ ) asociado a la inserción de una partícula de agua a lo largo de la dirección normal de la bicapa.

### Efecto diferenciado de OA y 2OHOA en bicapas fosfolipídicas

Los resultados de las simulaciones realizadas en los distintos sistemas bicapa fosfolipídica/ácido graso, con distinta composición relativa muestran cómo la inclusión de los ácidos grasos provoca alteraciones importantes en la estructura y dinámica de las bicapas, que es precisamente donde radica de su utilidad en las terapias de lípidos de membrana (MLT). Así, al aumentar la concentración de ácido graso se aprecia una reducción en el área por lípido y una modificación significativa de los parámetros de orden en el seno de la membrana, acompañadas de un aumento en la fluidez de la misma. Esto evidencia cambios estructurales en la membrana que incidirán sobre la fase de la misma, por ejemplo estabilizando la fase L- $\alpha$ , que se ha asociado experimentalmente con el efecto de estos ácidos grasos. Estas alteraciones se pueden entender teniendo en cuenta la pequeña área trasversal de las cadenas de ácido graso y la conformación retorcida que adopta el mismo debido el doble enlace *cis*, siendo ambas características comunes a los ácidos oleico y 2-hidroxioléico.

Sin embargo, dada su desigual eficacia en las terapias de membrana, deben de existir aspectos que diferencien el efecto de OA y 2OHOA sobre las membranas. Una inspección más detallada pone de relieve algunas diferencias ligeras entre ellos que podrían ser responsables, en última instancia, de la superior acción terapéutica del 2OHOA. Como cabe esperar, estas diferencias tienen su origen en la interacción de las regiones polares de los ácidos grasos, que en el caso del 2OHOA incluye un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo ácido carboxílico. Así, por ejemplo, se observan diferencias en la posición de los ácidos grasos a lo largo del eje normal a la bicapa y en los parámetros de orden de los carbonos próximos al grupo carboxilo de los ácidos. Estos efectos pueden suponer modificaciones en las propiedades superficiales de la bicapa, que son muy importantes en la interacción de la superficie con las proteínas de membrana, tanto de transmembrana como periféricas.

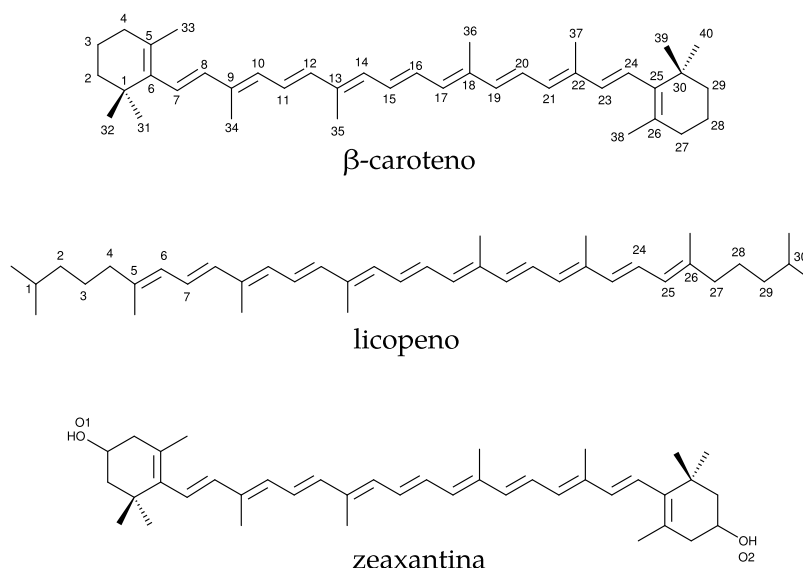
Otro aspecto que puede diferenciar la acción de los ácidos grasos OA y 2OHOA es el proceso de inserción de los mismos en la membrana. Según hemos indicado, el mecanismo seguido, que hemos conseguido simular con nuestro modelo, implica la formación de agregados de ácidos grasos que, tras interactuar con la superficie de la membrana, acaban fusionándose con ella, dando lugar a microdominios con una alta concentración de ácido graso donde los efectos de estas moléculas son más pronunciados. En este sentido, se ha observado un mayor tiempo de vida de los agregados de 2OHOA, antes de integrarse en la membrana, lo que puede propiciar que alcancen un tamaño más grande, dando lugar, finalmente, a dominios de alta concentración más extensos. Se produciría de esta forma un efecto terapéutico diferenciado, relacionado con la distinta composición resultante de las membranas tras la ingesta del ácido graso, más bien que con su efecto sobre la membrana, que es, de hecho muy similar.

Para avanzar en el conocimiento de estos procesos es necesario comprender cómo las alteraciones en las membranas repercuten en los procesos fisiológicos asociados a las mismas. Esto implica el estudio de las proteínas de membrana que participan en ellas, si bien trabajo queda fuera del alcance de la presente Tesis. En cualquier caso, en este estudio hemos conseguido identificar distintos efectos estructurales y dinámicos que pueden asociarse con la acción terapéutica de estas moléculas, introduciendo distintos mecanismos posibles que pueden estar en el origen de las MLT y que serán explorados en trabajos futuros.

### 5.3. ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE CAROTENOIDES EN ENTORNOS BIOLÓGICOS

En esta sección nos centramos en las propiedades antioxidantes de los carotenoides, que tienen su origen en su estructura electrónica y que juegan un papel importante tanto en fotosistemas como en tejidos de otros organismos. Cabe destacar, además, que las propiedades antioxidantes se han relacionado con la conformación que adoptan estos pigmentos, lo que incluye tanto los distintos isómeros estructurales que se han identificado como las estructuras torsionadas que pueden formarse mediante las interacciones de los carotenoides con los complicados entornos biológicos.

Prestaremos una atención especial, precisamente, a esta relación entre conformación y poder protector en sistemas concretos, como membranas celulares o fotosistemas, donde las propiedades antioxidantes de los carotenoides juegan un importante papel biológico. Para realizar estos estudios, nos hemos centrado principalmente en la molécula de  $\beta$ -caroteno, aunque en algunos casos se han considerado moléculas que poseen alguna analogía estructural con este caroteno, como su isómero de cadena abierta, el licopeno, y la xantofila que presenta una estructura muy similar a  $\beta$ -caroteno, pero con dos grupos hidroxilo en los anillos de ionona, la zeaxantina. Las estructuras de todas estas moléculas se muestran en la Figura 5.22.



**Figura 5.22** – Estructuras moleculares de los tres carotenoides estudiados en esta sección:  $\beta$ -caroteno, licopeno y zeaxantina, indicando con las etiquetas los átomos sobre los que se centra la atención en este trabajo.

### 5.3.1. Detalles Computacionales

Comenzamos esta sección caracterizando las propiedades antioxidantes de los carotenoides, mediante cálculos DFT. Para ello, calculado en primer lugar el potencial de ionización ( $IP$ ) y la energía de afinidad electrónica ( $EA$ ) *verticales*, es decir, la que se obtiene sin relajar las estructuras de los cationes y aniones resultantes de la eliminación o adición de un electrón, que se calculan como  $IP = E_{cation} - E_{neutral}$  y  $EA = E_{neutral} - E_{anion}$ . En estas expresiones  $E_{neutral}$ ,  $E_{cation}$  y  $E_{anion}$  son las energías de las especies neutra, catiónica y aniónica, respectivamente, que se han calculado mediante el funcional B3LYP con la base 6-311++G(d,p), incluyendo el efecto del disolvente (agua o benceno) mediante el modelo PCM en la formulación IEFPCM [Miertus 81, Scalmani 10]. En general, las conformaciones sobre las que se calcularon estas energías corresponden a estructuras optimizadas empleando el mismo funcional y la base más modesta 6-31(d), o bien a estructuras resultantes de barridos de coordenadas internas, en concreto diedros, en los que se optimizan el resto de coordenadas para cada valor fijado del diedro, usando el mismo nivel de cálculo y modelo de disolvente. Cabe destacar que la combinación de este funcional y base ha sido ampliamente validada para el estudio de carotenoides en trabajos previos de nuestro grupo de investigación [Requena 08, Cerón-Carrasco 09a, Cerón-Carrasco 10a, Cerón-Carrasco 10b].

Una vez caracterizadas las propiedades electrónicas de los carotenoides mediante métodos cuánticos, es posible emplear los valores obtenidos como referencia en la parametrización de campos de fuerza empíricos, que es precisamente la base del procedimiento descrito en la sección 5.1.3. Si a estos parámetros obtenidos para los carotenoides añadimos los recogidos para el resto de elementos del sistema en campos de fuerza estándar, como CHARMM36 para lípidos, CHARMM27 para péptidos y TIP3P para las moléculas de agua, disponemos entonces de parámetros empíricos para describir las interacciones moleculares en sistemas biológicos de gran envergadura, como membranas celulares o sistemas fotosintéticos. Esto permite la evaluación de la energía potencial en tiempos extremadamente cortos, comparados con los requeridos por las técnicas QM, reteniendo, en parte, la calidad de los cálculos más avanzados empleados en los ajustes, lo que abre la puerta al empleo de métodos de simulación eficientes y precisos.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio conformacional de dos carotenoides,  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, en bicapas lipídicas, que son un buen modelo para membranas celulares, aprovechándonos del hecho de que los aspectos conformacionales, principalmente los potenciales asociados a los diedros, han sido el objetivo principal en la parametrización de los carotenoides. En concreto, hemos realizado simulaciones de dinámica molecular de sistemas en los que un carotenoide se encuentra inicialmente inmerso en la membrana celular en distintas disposiciones, empleando para ello un modelo de todos los átomos en el que los lípidos quedan caracterizados por el campo de fuerzas CHARMM36, los moléculas de agua que rodean la membrana por el campo de fuerzas TIP3P, adaptado para su uso con los campos de fuerza CHARMM (CHARMM-TIP3P) y finalmente el campo de fuerzas obtenido en esta Tesis para los carotenoides (MM1 de la Sección 5.1.3). Las simulaciones se han realizado usando el programa GROMACS-4.5.5 siguiendo un protocolo similar al descrito para las simulaciones con ácidos grasos. En primer lugar, la estructura inicial se equilibra mediante una simulación  $NVT$  hasta alcanzar la temperatura objetivo de 314 K, a la que las membranas se encuentran en su fase fluida, empleando



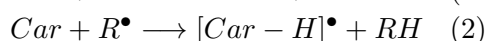
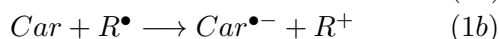
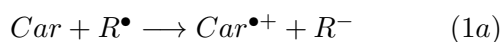
el termostato de Berendsen [Berendsen 84] ( $\tau_T = 0,1$  ps) aplicándose de forma independiente a las moléculas de disolvente y al resto del sistema, con un paso de integración de 1 fs hasta completar 100 ps. Se continúa entonces con una simulación  $NpT$  en la que se añade el barostato de Berendsen [Berendsen 84] ( $\tau_p = 1,0$  ps) de forma semi-isotrópica ( $p_x = p_y \neq p_z$ ), fijando la longitud de todos los enlaces que involucran hidrógenos mediante el algoritmo LINCS [Hess 08], y usando un tiempo de integración de 2 fs hasta alcanzar los 5 ns. Tras estas etapas de equilibrado se cambia el termostato por el de Nosé-Hoover [Nosé 84, Hoover 85] ( $\tau_T = 1,0$  ps) y el barostato por el de Parrinello-Rahman [Parrinello 81] ( $\tau_p = 2,0$  ps), con lo que se asegura el muestreo de un colectivo  $NpT$ . Se mantienen las restricciones a los enlaces que involucran hidrógeno y el tiempo de integración de 2 fs, hasta completar 100 ns de simulación en cada sistema, si bien dos de ellas se han extendido hasta 200 ns para comprobar la convergencia de las propiedades calculadas.

Se han realizado simulaciones adicionales en las que se mejora el muestreo a lo largo de una coordenada concreta mediante la técnica de *Umbrella Sampling* [Patey 73, Torrie 74, Torrie 77], que consiste en añadir un potencial armónico centrado en un punto de la coordenada ( $W$ ) seleccionada,  $V_{bias} = k(W - W^0)^2$  durante la simulación. Para ello se ha empleado el paquete de programas GROMACS-4.5.5, tanto para simulaciones como para procesar los resultados mediante el método de análisis de histogramas ponderados (*Weight Histogram Analysis Method*, WHAM) [Kumar 92], que proporciona el potencial de fuerza media (PMF) eliminando el efecto del potencial añadido. El procedimiento debe adaptarse al sistema concreto que se estudie, por lo que los detalles se concretan en el apartado en el que se emplee esta metodología.

Por último, presentamos los estudios conformacionales iniciales realizados de los carotenoides en sistemas fotosintéticos, que se han limitado a optimizaciones estructurales empleando el campo de fuerzas aquí desarrollado para los carotenoides.

### 5.3.2. Cuantificación del carácter antioxidante de carotenoides

Para diferenciar el carácter antioxidante de los carotenoides, hemos de encontrar, en primer lugar, un parámetro que podamos relacionar directamente con esta propiedad. lo que supone un reto de especial envergadura si tenemos en cuenta la diversidad y complejidad de los mecanismos que acaban marcando las propiedades antioxidantes de una molécula. Los tres mecanismos que se han propuesto en este sentido se basan en las posibles reacciones entre los carotenoides ( $Car$ ) y una especie radicalaria ( $R^\bullet$ ), e incluyen la transferencia de carga (1), en la que los carotenoides pueden tanto ceder como aceptar un electrón, la abstracción de hidrógenos alílicos (2) y la adición radicalaria (3) [Galano 07, Cerón-Carrasco 10a], todos ellos indicados en el siguiente esquema:



Cuando se considera la interacción específica entre un carotenoide y un radical concreto, un enfoque acertado consiste en analizar de forma separada cada una de las reacciones indicadas

arriba, calculando la correspondiente superficie de energía potencial para determinar la viabilidad de cada uno de los mecanismos según el cambio en energía libre y la energía de activación de los mismos [Cerón-Carrasco 10a]. Al tener que concretar la especie radical frente a la que reacciona el carotenoide, este protocolo resulta sin embargo excesivamente específico y no se ajusta a las necesidades del presente estudio, en el que tratamos de evaluar de forma más general las propiedades antioxidantes de estas especies, con el interés de comparar la acción de diferentes conformeros de una misma molécula. Para ello necesitamos identificar una propiedad que caracterice de forma general la capacidad de los carotenoides para desactivar especies potencialmente dañinas como especies reactivas de oxígeno (ROS), u otros radicales. En este sentido, cabe destacar que en cualquiera de los mecanismos mencionados arriba, existe una interacción de tipo electrostático que impulsa la reacción. Parece razonable, por tanto, emplear como parámetros característicos del poder antioxidante aquellos relacionados con los procesos de transferencia electrónica, que constituyen una propiedad inherente del carotenoide, al margen de la naturaleza de la especie reactiva a la que se enfrenten.

En este contexto, la capacidad de una molécula para dar o aceptar carga se suele caracterizar mediante el potencial de ionización ( $IP$ ) y la energía de afinidad electrónica ( $EA$ ). En algunos casos, sin embargo, los procesos de transferencia de carga involucran la interacción entre las especies dadoras yceptoras, y quedan descritos de forma más adecuada mediante modelos de transferencia parcial de carga [Maynard 98, Parr 99]. Pueden emplearse entonces los índices de electrofilia propuestos por Parr y colaboradores [Parr 99], que miden precisamente la capacidad de la molécula para seguir procesos de transferencia parcial de carga. El modelo de Parr se basa en la determinación del flujo de electrones entre la molécula y un entorno ideal capaz, tanto de dar, como de aceptar cualquier cantidad de electrones, incluyendo valores no enteros. Este modelo ha sido revisado y actualizado recientemente por Gázquez y colaboradores [Gázquez 07], introduciendo los parámetros conocidos como poder electrodador ( $\omega^-$ ) y potencial electroceptor ( $\omega^+$ ) para caracterizar por separado los procesos de donación y recepción de cantidades fraccionales de carga electrónica. Estos parámetros se definen de la forma:

$$\omega^- = \frac{(\mu^-)^2}{\eta^-} \approx \frac{(3IP + EA)^2}{16(IP - EA)} \quad (5.5)$$

$$\omega^+ = \frac{(\mu^+)^2}{\eta^+} \approx \frac{(IP + 3EA)^2}{16(IP - EA)} \quad (5.6)$$

donde  $\mu^-$  y  $\mu^+$  dan cuenta de la primera derivada de la energía con respecto al número de electrones evaluado por la izquierda y derecha, mientras que  $\eta^-$  y  $\eta^+$  son las correspondientes derivadas segundas. Estos parámetros aparecen en las expresiones para el cambio de energía asociado a los procesos de cesión ( $\Delta E^-$ ) y recepción ( $\Delta E^+$ ) de carga, de forma que  $\Delta E^- \propto \omega^-$  y  $\Delta E^+ \propto -\omega^+$ . Los procesos de cesión de carga se ven por tanto favorecidos conforme disminuye  $\omega^-$ , mientras que los de recepción de carga se ven favorecidos cuando aumenta  $\omega^+$ .

En principio, tanto los parámetros de transferencia total de carga ( $IP$  y  $EA$ ) como los de transferencia parcial ( $\omega^-$  y  $\omega^+$ ) pueden usarse para determinar el carácter antioxidante de los carotenoides. Para identificar qué parámetro es el más adecuado en los sistemas que nos ocupan, comparamos los resultados obtenidos para los mismos con los datos experimentales

encontrados en la bibliografía. Como ya hemos comentado, estamos interesados en emplear los parámetros de transferencia para distintas geometrías de la misma molécula, por lo que hemos recavado información experimental sobre el carácter antioxidante relativo de distintas conformaciones. Hemos calculado estos parámetros electrónicos para diferentes conformeros de  $\beta$ -caroteno, incluyendo el más estable, el *all-trans-s,s'-cis*, y las estructuras resultantes de la isomerización de uno (*monocis*) o dos (*dicis*) dobles enlaces a lo largo de la cadena conjugada. Concretamente, hemos considerado todos los isómeros *monocis*, los 7-, 9-, 11-, 13- y 15-*cis*, y varios *dicis*, como son los 9,9', 7,13', 9,13, 9,15, 9-13', 11,11' y 13,15 *dicis*. Este conjunto de isómeros es suficiente para comparar los datos obtenidos con la información experimental disponible, y permite además clasificar los isómeros estudiados, que son los más estables, en función de su acción antioxidante.

Los cálculos se han realizado sobre cada estructura optimizada como se indica en la sección 5.3.1, y los resultados se muestran en la Tabla 5.7, en la que se incluyen todos los parámetros analizados:  $IP$ ,  $EA$ ,  $\omega^-$  y  $\omega^+$ . Teniendo en cuenta que los medios biológicos pueden variar desde entornos hidrofóbicos, como el interior de una membrana celular, a entornos puramente polares, como el seno de una disolución acuosa, hemos realizado los cálculos incluyendo el efecto de un disolvente hidrofóbico (benceno) y otro polar (agua), junto con los cálculos en vacío.

Vemos en primer lugar en la Tabla 5.7 que las diferencias entre los valores de los distintos parámetros,  $IP$ ,  $EA$ ,  $\omega^-$  y  $\omega^+$ , calculados para los distintos isómeros son del orden de  $10^{-2}$  –  $10^{-1}$  eV o de entre décimas a unidades de kcal/mol, lo que está en el límite de la precisión de los métodos DFT. Por este motivo, hemos comprobado si las tendencias observadas son reproducibles con otros métodos de cálculo. Para ello, hemos recalculado los parámetros de una selección de compuestos que muestran claramente las tendencias relativas (*all-trans*, 9-*cis*, 9,13'-*dicis* y 11,11'-*dicis*), empleando dos métodos de cálculo adicionales, como son un cálculo DFT con otro funcional (PBE0) y un cálculo MP2 con la aproximación “density-fitting” (DF) [Werner 03] para aligerar la evaluación de integrales multicentro. Este segundo cálculo se ha realizado usando el programa *Molpro* [Werner 10]. Estos cálculos adicionales confirman la validez de las tendencias relativas, ya que se mantienen con todos los métodos.

Vemos también en la Tabla 5.7 que los valores relativos de  $\omega^-$  y  $\omega^+$  están controlados por las diferencias  $IP - EA$  que aparecen en el denominador, lo que hace que los dos parámetros varíen de forma similar entre los distintos isómeros, de forma que cuanto menor es la diferencia entre  $IP$  y  $EA$ , mayores son los valores de  $\omega^-$  y  $\omega^+$ . Se observa, sin embargo, un efecto contradictorio ya que los parámetros  $IP$  y  $\omega^-$  siguen tendencias opuestas entre conformeros, aunque los dos describen el proceso de cesión de carga por parte del carotenoide.

**Tabla 5.7** – Potencial de ionización ( $IP$ ), energía de afinidad electrónica ( $EA$ ), poder electrodonador ( $\omega^-$ ) y poder electroaceptor ( $\omega^+$ ), en eV, para todos los isómeros *monocis* y los isómeros *dicis* más estables de  $\beta$ -caroteno calculados en benceno, agua y en vacío. Se incluye también la energía relativa de los isómeros.

Isómero	Benceno				Agua				Vacío					
	$IP$	$EA$	$\omega^-$	$\omega^+$	$IP$	$EA$	$\omega^-$	$\omega^+$	$\Delta E_{corr}^a$	$IP$	$EA$	$\omega^-$	$\omega^+$	
<i>all-trans</i>	5.06	2.22	6.67	3.02	4.66	2.80	9.49	5.75	0.00	5.34	1.21	4.50	1.22	
<i>7-cis</i>	5.09	2.21	6.63	2.98	4.69	2.80	9.43	5.69	5.41	5.38	1.19	4.48	1.20	
<i>9-cis</i>	5.07	2.18	6.55	2.92	4.67	2.78	9.32	5.60	1.19	5.36	1.18	4.45	1.18	
<i>11-cis</i>	5.07	2.22	6.68	3.03	4.66	2.82	9.56	5.82	5.46	5.35	1.22	5.51	1.22	
<i>13-cis</i>	5.10	2.17	6.50	2.87	4.69	2.76	9.19	5.47	1.22	5.38	1.16	4.43	1.16	
<i>15-cis</i>	5.11	2.18	6.55	2.91	4.70	2.79	9.33	5.59	2.69	5.39	1.16	4.44	1.17	
<i>7,13'-dicis</i>	5.13	2.16	6.48	2.84	4.71	2.76	9.16	5.42	6.51	5.42	1.14	4.42	1.14	
<i>9,13'-dicis</i>	5.11	2.13	6.40	2.78	4.70	2.74	9.04	5.32	2.11	5.40	1.13	4.39	1.13	
<i>9,15'-dicis</i>	5.12	2.15	6.45	2.82	4.71	2.76	9.15	5.41	3.53	5.41	1.13	4.40	1.13	
<i>9,13'-dicis</i>	5.11	2.13	6.40	2.78	4.70	2.74	9.03	5.31	2.08	5.41	1.12	4.39	1.12	
<i>11,11'-dicis</i>	5.06	2.22	6.67	3.03	4.66	2.82	9.62	5.88	10.66	5.35	1.22	4.52	1.23	
<i>13,15'-dicis</i>	5.14	2.14	6.41	2.78	4.73	2.74	8.99	5.26	3.67	5.42	1.13	4.40	1.13	
<i>9,9'-dicis</i>	5.09	2.15	6.44	2.82	4.68	2.75	9.14	5.43	1.89	5.39	1.14	4.41	1.14	

<sup>a</sup> Energía relativa con corrección en el punto cero (ZPE) tomadas en su mayoría de Cerón-Carrasco et al. [Cerón-Carrasco 09a].

Para comparar nuestros resultados con los experimentales, hemos de establecer en primer lugar los efectos que gobiernan, en los experimentos, la reactividad de los carotenoides en su acción protectora, concretando si actúan cediendo o aceptando electrones. Cabe destacar al respecto que los carotenoides ceden electrones en la mayoría de las reacciones frente a radicales como, por ejemplo, en el caso de la desactivación del radical  $\text{N}_2\text{O}^\bullet$  [Cerón-Carrasco 10a], habiendo además evidencias de subproductos catiónicos en procesos antiradicales [Han 06, Han 10], por lo que parece más acertado establecer un criterio del carácter antioxidante basado en los parámetros  $IP$  y  $\omega^-$ . Como hemos visto en la Tabla 5.7, los valores de estos parámetros siguen tendencias opuestas, lo que conduce a conclusiones dispares respecto a la viabilidad del proceso de cesión electrónica. En los dos casos, cuanto menor es el valor de  $\omega^-$  y  $IP$ , mayor es el carácter antioxidante, y de acuerdo con esto, si seguimos, por ejemplo, la escala marcada por  $IP$ , el isómero *all-trans* sería uno de los que tienen mayor capacidad antioxidante, cuando resulta ser uno de los de menor capacidad de acuerdo a los valores relativos de  $\omega^-$ . Para resolver este conflicto entre ambos modelos, comparamos las predicciones de cada uno de ellos con los datos experimentales disponibles [Levin 94, Levin 97, Böhm 02, Müller 11, Jaime 07]. Algunos estudios apuntan a que el isómero *9-cis* de  $\beta$ -caroteno es más antioxidante que el isómero *all-trans* [Levin 94, Levin 97, Jaime 07], y otros que algunos isómeros *monocis* de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno y licopeno, como los *9-cis*, *13-cis* y *15-cis*, exhiben un carácter antioxidante mayor que el *all-trans* [Böhm 02, Müller 11]. Estos datos concuerdan con las predicciones basadas en el parámetro  $\omega^-$ , según las cuales los isómeros *monocis* *9-cis*, *13-cis* y *15-cis* tienen valores menores de  $\omega^-$  y, por tanto, son mejores antioxidantes que el *all-trans*. El modelo basado en el potencial de ionización, por el contrario, contradice las evidencias experimentales. Estos resultados ponen de manifiesto la validez del poder electrodador,  $\omega^-$ , como modelo predictivo para evaluar el carácter antioxidante de los carotenoides.

Por otro lado, si bien los carotenoides suelen actuar cediendo electrones, se han descrito también situaciones en las que muestran una acción antireductora, es decir, capacidad para aceptar electrones, como, por ejemplo, en la reacción frente al anión radical superóxido [Galano 10] proponiéndose entonces que en entornos no polares, como los de las membranas, los procesos de recepción de carga deben de jugar un papel importante desactivando esta especie frente a la peroxidación de lípidos. Para evaluar este proceso debemos de emplear los parámetros  $EA$  y  $\omega^+$  que, en este caso, muestran, como vemos en la Tabla 5.7, la misma tendencia, que es, de hecho, la opuesta a la escala que se deriva de  $\omega^-$ .

Tras confirmar la ventaja de usar  $\omega^-$  para cuantificar el carácter antioxidante, podemos ahora emplearlo para establecer el orden relativo de la actividad antioxidante de los isómeros del  $\beta$ -caroteno incluidos en la Tabla 5.7, lo que puede ofrecer una herramienta útil en el análisis conformacional de carotenoides en sistemas biológicos. En dicha tabla se recogen los valores calculados en diferentes entornos, como son un disolvente polar, agua, otro no polar, benceno, y en vacío, encontrándose que las tendencias generales se mantienen en los tres casos, con solo ligeras modificaciones, lo que facilita el establecimiento de una escala antioxidante. En efecto, como ya hemos indicado, los entornos biológicos presentan una gran complejidad y, en muchas ocasiones, no pueden considerarse ni puramente hidrofílicos ni puramente hidrofóbicos. Por esta razón, a la hora de establecer una escala antioxidante, hemos decidido ordenar las especies en función del valor de  $\omega^-$  promedio entre el obtenido en agua y el obtenido en benceno. Finalmente,

la escala obtenida es la siguiente:

13,15-*dicis*  $\gtrsim$  9,13'-*dicis*  $\gtrsim$  9,13-*dicis* > 9,9'-*dicis*  $\gtrsim$  9,15-*dicis*  $\gtrsim$  7,13'-*dicis* > 13-*cis*  $\gtrsim$  9-*cis*  $\gtrsim$  15-*cis* > 7-*cis* > *all-trans* > 11-*cis* > 11,11'-*dicis*.

Esta escala indica, como vemos, que los isómeros *dicis* son mejores antioxidantes que los *monocis*, con la notable excepción del 11,11'-*dicis* que, junto con el 11-*cis*, tiene el peor carácter antioxidante, seguidos por el isómero *all-trans*.

### 5.3.3. Relación entre conformación y carácter antioxidantes en carotenoides

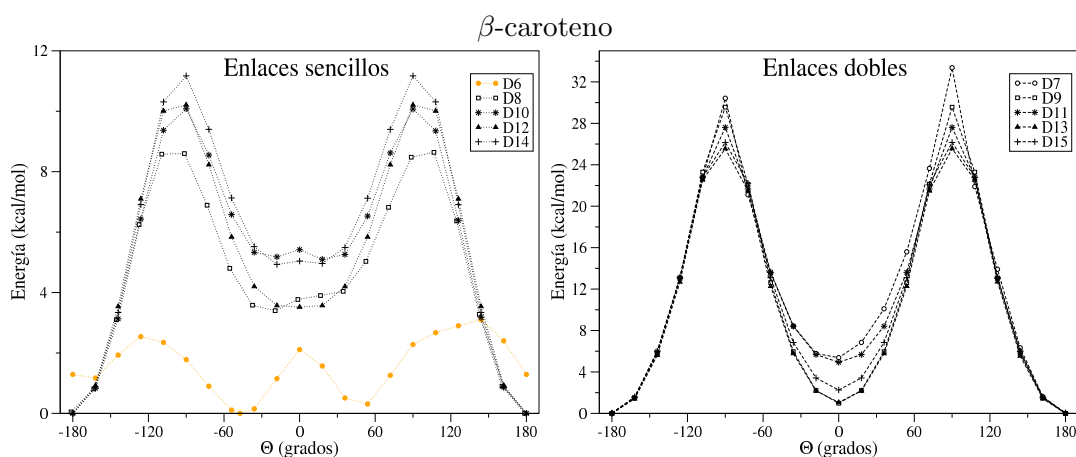
Sin duda, el aspecto estructural más importante de los carotenoides es la larga cadena hidrocarbonada en la que se alternan los dobles enlaces, C=C, con los enlaces sencillos, C-C, dando lugar a un largo sistema conjugado. Precisamente, esta conjugación marca las interesantes propiedades electrónicas que determinan su carácter antioxidante. De hecho, la extensión de este sistema  $\pi$ -conjugado se relaciona directamente con propiedades involucradas en los procesos de transferencia de carga, tales como el potencial de ionización (*IP*) o la energía de afinidad electrónica (*EA*). Teniendo en cuenta, entonces, que una conjugación efectiva del sistema  $\pi$  requiere que todos los carbonos se encuentren en el mismo plano, la conformación de la cadena, descrita en función de los diedros entre los carbonos, C-C-C-C, determina la longitud efectiva del sistema conjugado y, por tanto, afecta decisivamente al carácter antioxidante de los carotenoides.

Las perturbaciones conformacionales de la cadena conjugada juegan un papel importante en la alteración de las propiedades electrónicas y espectroscópicas de los carotenoides [Cogdell 87, Polívka 10]. Por este motivo, con el fin de analizar la capacidad antioxidante de los mismos en sistemas biológicos, donde las interacciones en los complejos entornos de membranas o fotosistemas pueden llegar a modificar la conformación de los carotenoides significativamente, comenzamos analizando las estructuras intermedias que resultan de la rotación de todos los enlaces, C-C y C=C, a lo largo la cadena conjugada de los carotenoides que escogemos para este estudio:  $\beta$ -caroteno y licopeno, cuyas estructuras aparecen en la Figura 5.22.

Nos hemos centrado principalmente en la molécula de  $\beta$ -caroteno y hemos tenido en cuenta tanto los enlaces sencillos como los dobles a lo largo de la cadena conjugada. Así, hemos realizado barridos conformacionales alrededor de los diedros asociados a enlaces sencillos, definidos por los carbonos C5C6C7C8 (D6), C7C8C9C10 (D8), C9C10C11C12 (D10), C11C12C13C14 (D12) y C13C14C15C15' (D14), y los enlaces dobles, definidos por C6C7C8C9 (D7), C8C9C10C1 (D9), C10C11C12C13 (D11), C12C13C14C15 (D13) y C14C15C15'C14' (D15).

En la Figura 5.23 mostramos los perfiles de energía potencial para  $\beta$ -caroteno en función de los ángulos diedros, tanto para enlaces sencillos (izquierda) como para enlaces dobles (derecha), teniendo en cuenta los efectos del disolvente (agua) mediante el modelo PCM. Hemos comprobado, además, que estos perfiles son prácticamente idénticos a los obtenidos en fase gas, lo que indica que el disolvente no afecta de forma significativa a la estabilidad relativa de las distintas conformaciones.

En el caso de la rotación alrededor de los enlaces sencillos podemos observar en la Figura 5.23 que en todos los casos se pueden identificar tres mínimos a lo largo de la rotación del diedro,



**Figura 5.23** – Energía potencial calculada para en las distintas conformaciones obtenidas de la rotación de los enlaces sencillos (izquierda) y dobles (derecha) de la cadena conjugada de  $\beta$ -caroteno en agua.

cuyos datos especificamos en la Tabla 5.8: uno de ellos corresponde a la conformación *trans* del doble enlace y los otros dos desviados, con signo positivo y negativo, de la conformación *cis*. Estos perfiles vienen marcados por el efecto de la conjugación, que se maximiza para conformaciones *cis* y *trans*, y por efectos estéricos, que son los responsables de las desviaciones respecto a la conformación *cis* y de que, en la mayoría de los casos, la región *cis* sea la de mayor energía. Se observa una notable excepción en el caso del diedro D6, que corresponde al enlace que conecta el voluminoso anillo de  $\beta$ -ionona con el resto de la cadena conjugada. Los efectos estéricos son mayores, lo que da lugar a desviaciones más grandes respecto a la conformación *cis* y, además, hace que la conformación *trans* sea la de mayor energía.

Para los diedros D8 a D14, las interacciones estéricas que producen las desviaciones en la región *cis* vienen determinadas por los sustituyentes (-H y -CH<sub>3</sub>) sobre los carbonos. Así, la presencia de grupos metilo en los carbonos C9 y C13 da como resultado la mayor energía en esta región para los diedros D10 y D14, en comparación con los diedros D8 y D12. Del mismo modo, en el diedro D8 se observa una apreciable asimetría de la curva de potencial producida por la perturbación del grupo  $\beta$ -ionona que, dada su falta de simetría estructural, da lugar a interacciones estéricas ligeramente diferentes a cada lado de la conformación *cis*. Este efecto diferenciador se pierde, sin embargo, para las rotaciones más internas, ya que al encontrarse el anillo más alejado del diedro en cuestión, se reduce este efecto.

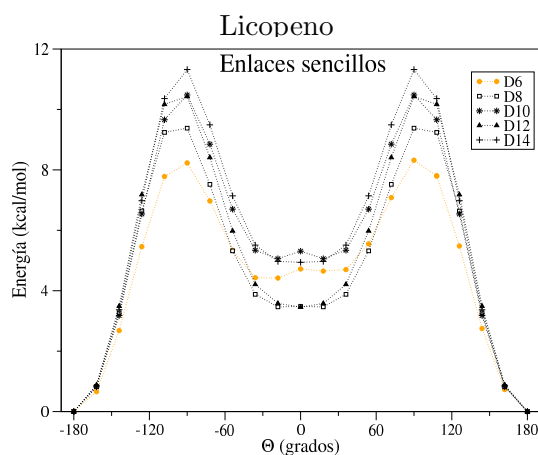
Los cálculos para licopeno, que se muestran en la Figura 5.24, permiten comprender el origen de estos efectos estéricos, ya que su estructura es similar a la de  $\beta$ -caroteno, pero sin anillos de  $\beta$ -ionona, lo que elimina la interacción estérica de los mismos con la cadena. En efecto, tal y como se aprecia en la Figura 5.24, el potencial asociado al diedro D6 presenta una forma similar al resto y el potencial asociado a D8 también pierde la “asimetría” que tiene en  $\beta$ -caroteno. Sin embargo, los efectos estéricos asociados a los sustituyentes sobre los carbonos (-H y -CH<sub>3</sub>) se mantienen, como cabía esperar.

Las barreras energéticas a lo largo de las rotaciones son significativamente menores en el caso

**Tabla 5.8** – Conformaciones correspondientes a mínimos de la superficie de energía potencial, obtenidos de las rotaciones de los enlaces sencillos de la cadena conjugada que se muestra en la Figura 5.23.

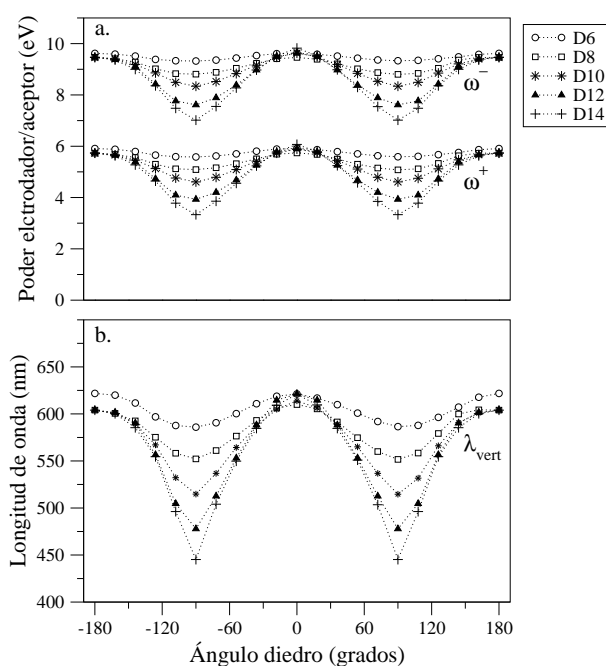
Diedro	Conformación <sup>a</sup>	$\Theta$ (grados)	E (Kcal/mol)
D6	<i>p-cis</i>	-47.6	0.00
D6	<i>p-cis</i>	47.4	0.31
D6	<i>trans</i>	-169.7	1.55
D8	<i>trans</i>	178.6	0.00
D8	<i>p-cis</i>	-25.2	3.14
D8	<i>p-cis</i>	23.7	3.68
D10	<i>trans</i>	180.0	0.00
D10	<i>p-cis</i>	26.1	4.73
D10	<i>p-cis</i>	-26.9	4.81
D12	<i>trans</i>	-179.8	0.00
D12	<i>p-cis</i>	14.9	3.40
D12	<i>p-cis</i>	-15.4	3.41
D14	<i>trans</i>	-180.0	0.00
D14	<i>p-cis</i>	-19.1	4.70
D14	<i>p-cis</i>	20.3	4.73

<sup>a</sup> *p-cis* hace referencia a una conformación *cis* distorsionada o pseudo-*cis*.



**Figura 5.24** – Energía potencial calculada para en las distintas conformaciones obtenidas de la rotación de los enlaces sencillos de la cadena conjugada de licopeno en agua.





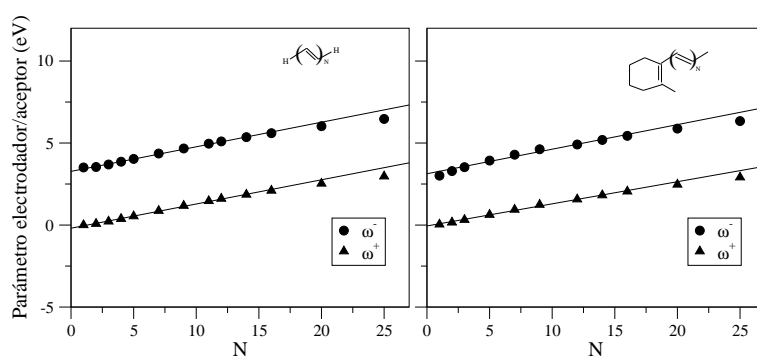
**Figura 5.25** – Poder electroceptor ( $\omega^+$ ) y electrodonador ( $\omega^-$ ), y longitud de onda vertical ( $\lambda_{\text{vert}}$ ) calculadas para diferentes conformaciones a lo largo de las rotaciones de los enlaces sencillos de la cadena conjugada de  $\beta$ -caroteno.

del diedro D6 de  $\beta$ -caroteno, debido al efecto del anillo de  $\beta$ -ionona ya indicado, con alturas de 3-4 kcal/mol, valores que reproducen bien cálculos teóricos anteriores [Cerón-Carrasco 10a, Lukes 11]. La altura de las barreras de D8 a D14 se encuentran en el rango de 9 a 11 kcal/mol, tanto en  $\beta$ -caroteno como licopeno, con valores mayores para los diedros más internos ( $D8 < D10 < D12 \sim D14$ ), en concordancia con el “efecto de conjugación” descrito por Kuki y colaboradores [Kuki 91] y por Doering y su grupo [von Doering 95].

Las rotaciones alrededor de los enlaces dobles vienen determinadas principalmente por efectos electrónicos, a consecuencia del doble enlace. De hecho en este caso las conformaciones intermedias, entre las geometrías *cis* y *trans* presentan un importante carácter biradical debido a la ruptura del doble enlace. Como consecuencia de ello, las barreras de energía asociadas a estas rotaciones son mucho mayores que en el caso de los enlaces sencillos y, por tanto, no cabe esperar que las geometrías intermedias jueguen un papel relevante en los cambios conformacionales. Por esta razón, no profundizaremos más en estas rotaciones.

Pasamos ahora a evaluar los parámetros electroceptores y electrodonadores,  $\omega^+$  y  $\omega^-$ , así como la longitud de onda de la transición vertical,  $\lambda_{\text{vert}}$ , calculadas para las estructuras parcialmente optimizadas a lo largo de las rotaciones de los enlaces sencillos de  $\beta$ -caroteno y licopeno. En la Figura 5.25 mostramos cómo cambian estos valores para  $\beta$ -caroteno con la rotación de los diedros. En todos los casos, las tendencias observadas son las mismas, alcanzando todos los parámetros los valores máximos para las conformaciones *cis* y *trans*, y disminuyendo progresivamente hasta alcanzar los valores mínimos en las conformaciones intermedias entre ambas geometrías.

Uno de los aspectos a destacar de la variación de estos parámetros en función del ángulo



**Figura 5.26** – Poder electroceptor ( $\omega^+$ ) y electrodonador ( $\omega^-$ ) calculados para polienos de distinta longitud. Se incluyen la línea de tendencia en cada caso.

diedro es que, a diferencia de la correspondiente curva de energía potencial, no se ven afectados por los efectos estéricos que condicionan a la mayoría de los perfiles energéticos, lo que hace que las propiedades antioxidantes para licopeno y  $\beta$ -caroteno sean muy similares. De hecho, los resultados para esta propiedad se pueden razonar teniendo en cuenta únicamente la extensión del sistema conjugado en cada conformación. Para entender mejor la relación entre los parámetros antioxidantes y la longitud de cadena conjugada, hemos calculado sus valores para cadenas de polienos de distinto tamaño. Los resultados, que se representan en la Figura 5.26, muestran una dependencia lineal de los parámetros  $\omega^-$  y  $\omega^+$  con la longitud de la cadena conjugada, lo que concuerda con las tendencias observadas en trabajos previos [Martínez 09a].

Volviendo a la Figura 5.25, podemos ahora relacionar las variaciones del poder electrodonador y electroceptor y la longitud de onda vertical con la longitud “efectiva” de la cadena conjugada en cada conformación. En concreto, esta longitud se acortará al perturbar la planaridad del sistema conjugado, de forma que se hará máxima cuando todos los enlaces están en disposición *cis* o *trans* y disminuirá conforme la rotación de un diedro vaya alejando a dos dobles enlaces contiguos de la coplanaridad. Así, con un ángulo de  $90^\circ$ , para el que se obtienen los valores mínimos de  $\omega^+$  y  $\omega^-$ , la conjugación se rompe por completo, dando lugar a dos cadenas conjugadas “desconectadas” a cada lado del diedro. Hemos comprobado en este caso que los parámetros para esta conformación vienen determinados por la longitud de la cadena conjugada más extensa de las resultantes. Esto hace que los valores más bajos de estos parámetros correspondan a la rotación de diedros internos, como se observa en la Figura 5.25, ya que en este caso se obtienen cadenas “desconectadas” de menor tamaño.

Como hemos comentado anteriormente las variaciones en la longitud de onda vertical ( $\lambda_{\text{vert}}$ ) correspondiente al tránsito más intenso, entre el estado fundamental y el estado excitado  $S_2$ , siguen la misma tendencia que los parámetros electroceptor y electrodonador, por lo que también se puede relacionar con la longitud efectiva de cadena conjugada. Las longitudes de onda calculadas para las conformaciones intermedias están además significativamente desplazadas al azul, en comparación con los valores obtenidos para las geometrías *cis* y *trans*, con desviaciones de hasta 150 nm (0.7 eV). Estos resultados muestran claramente las tendencias asociadas a la variación del carácter antioxidante y espectroscópico con la conformación, lo que puede ser especialmente relevante en el interior de membranas celulares o fotosistemas en los que la con-

formación venga dictada por las interacciones específicas que surjan en estos entornos complejos [Cogdell 87, Polívka 10].

Nuestro trabajo proporciona, por un lado, una descripción de la variación de los parámetros que pueden emplearse para determinar el poder antioxidante, y por otro lado, aprovechando la dependencia lineal de estos parámetros con la longitud de cadena conjugada, como se muestra en la Figura 5.26, estos resultados pueden emplearse para construir un modelo que cuantifique la longitud efectiva de cadena conjugada, que puede ser útil más allá de la determinación del poder antioxidante. En el siguiente apartado abordamos la elaboración de dicho modelo.

### Modelo para la longitud efectiva de cadena conjugada

La longitud efectiva de cadena conjugada,  $N_{ef}$ , es un parámetro que no posee una definición rigurosa, a pesar de haber sido mencionado repetidamente en la bibliografía [Polívka 04, Polívka 09b, Polívka 09a, Polívka 10, Fuciman 10], y de haberse cuantificado usando propiedades de los estados excitados, como el tiempo de vida del estado  $S_1$  [Polívka 09b], no posee una definición rigurosa. En este trabajo, definimos este parámetro como el número de enlaces conjugados de una cadena hipotética, completamente conjugada, que muestre propiedades electrónicas y espectroscópicas similares a las de la cadena que estemos analizando. Así, una cadena poliénica completamente extendida, con todos los diedros toman valores de  $0^\circ$  o  $180^\circ$ , tendrá una longitud de conjugación máxima, y las rotaciones de los ángulos diedros de la cadena perturbarán la planaridad del sistema rompiendo parcialmente la conjugación de la cadena y reduciendo así la longitud efectiva del sistema conjugado. Si asumimos entonces que la contribución de dos dobles enlaces consecutivos a la longitud efectiva de cadena conjugada depende únicamente del valor del ángulo diedro entre ellos, cada diedro rotado reduce la longitud efectiva en un factor determinado, que de cuenta de la ruptura de la conjugación. Así, la longitud efectiva de la cadena medida a partir de un doble enlace arbitrario,  $i$ , puede expresarse de la forma:

$$N_{ef}^i = 1 + \alpha_{D_i}(1 + \alpha_{D_{i+1}}(1 + \alpha_{D_{i+2}}(\dots(1 + \alpha_{D_{N-1}})\dots))) + \alpha_{D_{i-1}}(1 + \alpha_{D_{i-2}}(1 + \alpha_{D_{i-3}}(\dots(1 + \alpha_{D_1})\dots))) \quad (5.7)$$

donde  $\alpha_{D_i}$  es el parámetro que modula el grado de conjugación del diedro  $D_i$  que conecta los dobles enlaces  $i$  y  $i+1$ . Este parámetro varía, por tanto, entre 0, para una desconexión completa entre los dobles enlaces, que se da en ángulos diedros de  $90^\circ$ , y 1, para una conjugación completa en las conformaciones *cis* y *trans*.

Como hemos indicado en el apartado anterior, las propiedades antioxidantes y espectroscópicas vienen determinadas por la cadena conjugada de mayor tamaño resultante tras la rotación de los diedros, lo que apunta a que la longitud efectiva global de la cadena vendrá dada por el valor máximo de todos los valores  $N_{ef}^i$  calculados es decir,

$$N_{ef} = \max_{i=\{1, N-1\}} (N_{ef}^i) \quad (5.8)$$

Para concretar el cálculo queda únicamente definir la forma de las funciones  $\alpha(\theta)$  que modulan la conjugación a través de los diedros. Para ello, teniendo en cuenta la dependencia lineal de

los parámetros  $\omega^+$  y  $\omega^-$  con la longitud de la cadena conjugada mostrada en la Figura 5.26, podemos suponer que los perfiles de  $\omega^-$  (o  $\omega^+$ ) frente al ángulo diedro coinciden con los de la función  $\alpha(\theta)$ . Es razonable, por tanto, asumir que la función  $\alpha(\theta)$  es la misma para todos los diedros, y que se puede ajustar a una función sigmoide de la forma:

$$\alpha(\theta) = A_0 + \frac{A_1}{1 + e^{-\mu(\theta - \theta_{1/2})}} \quad (5.9)$$

$N_{ef}^i$  donde  $\theta$  es el valor del ángulo diedro,  $\theta_{1/2}$  es el valor del diedro más cercano para el que  $\alpha$  vale 1/2, y  $A_0$ ,  $A_1$  y  $\mu$  son parámetros a ajustar. El valor de  $\theta_{1/2}$  es el asociado a la conformación intermedia entre aquella con  $\alpha = 1$  (*cis* o *trans*) y la de  $\alpha = 0$  (diedro igual a  $\pm 90^\circ$ ), y depende del intervalo de ángulos en el que nos encontremos, siendo los valores específicos  $-135^\circ$  ( $-180^\circ < \theta < -90^\circ$ ),  $-45^\circ$  ( $-90^\circ < \theta < 0^\circ$ ),  $45^\circ$  ( $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ) y  $135^\circ$  ( $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ). Los valores de los parámetros  $A_0$  y  $A_1$  quedan, a su vez, fijados en función de  $\mu$  imponiendo las condiciones de que  $\alpha(\pm 180^\circ) = \alpha(0^\circ) = 1$  (conjugación total) y  $\alpha(\pm 90^\circ) = 0$  (desconexión total). De esta forma, en las regiones en las que la función sigmoide tiene pendiente negativa (es decir, para  $-180^\circ < \theta < -90^\circ$  y  $0^\circ < \theta < 90^\circ$ ), estos dos parámetros quedan definidos por:

$$A_0 = \frac{-(1 + e^{45\mu})}{(e^{-45\mu} - e^{45\mu})} \quad (5.10a)$$

$$A_1 = \frac{(1 + e^{45\mu})(1 + e^{-45\mu})}{(e^{-45\mu} - e^{45\mu})} \quad (5.10b)$$

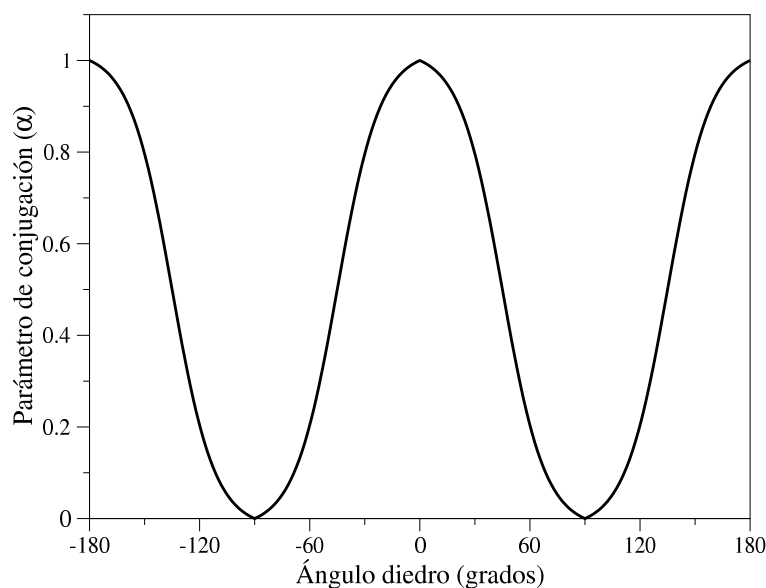
y en las regiones en las que la sigmoide tiene pendiente positiva (es decir, para  $-90^\circ < \theta < 0^\circ$  y  $90^\circ < \theta < 180^\circ$ ), tenemos que:

$$A_0 = 1 + \frac{(1 + e^{45\mu})}{(e^{-45\mu} - e^{45\mu})} \quad (5.11a)$$

$$A_1 = -\frac{(1 + e^{45\mu})(1 + e^{-45\mu})}{(e^{-45\mu} - e^{45\mu})} \quad (5.11b)$$

La forma de la función  $\alpha(\theta)$  definida por la ecuación 5.9 es en efecto similar a los perfiles  $\omega^-$  frente al ángulo diedro, tal y como se muestra en la Figura 5.27, en la que se representa para un valor concreto del parámetro  $\mu$ .

Una vez establecido el valor del parámetro  $\mu$  podemos calcular el valor de la longitud efectiva de cadena conjugada para una conformación determinada, empleando las ecuaciones de (5.7) a (5.11b). En este trabajo hemos asignado un valor a  $\mu$  de forma empírica, realizando un ajuste de los valores del parámetro  $\omega^-$  (se podría haber seleccionado el parámetro  $\omega^+$  en su lugar con resultados similares) frente a la longitud efectiva,  $N_{ef}$ , calculada tomando el parámetro  $\mu$  como una variable cuyo valor óptimo es aquel que conduce al mejor ajuste de los datos. Para los ajustes se han empleado concretamente los valores calculados en los barridos de los diedros que se mostraron en la Figura 5.25, que suman un total de 86 conformaciones. Realizando un barrido sobre distintos valores de  $\mu$  y ajustando para cada uno de ellos los datos a una recta del tipo  $\omega^- = a N_{ef}(\mu) + b$ , se encuentra que el valor óptimo del parámetro  $\mu$  resulta ser  $0,086 \text{ grados}^{-1}$ ,

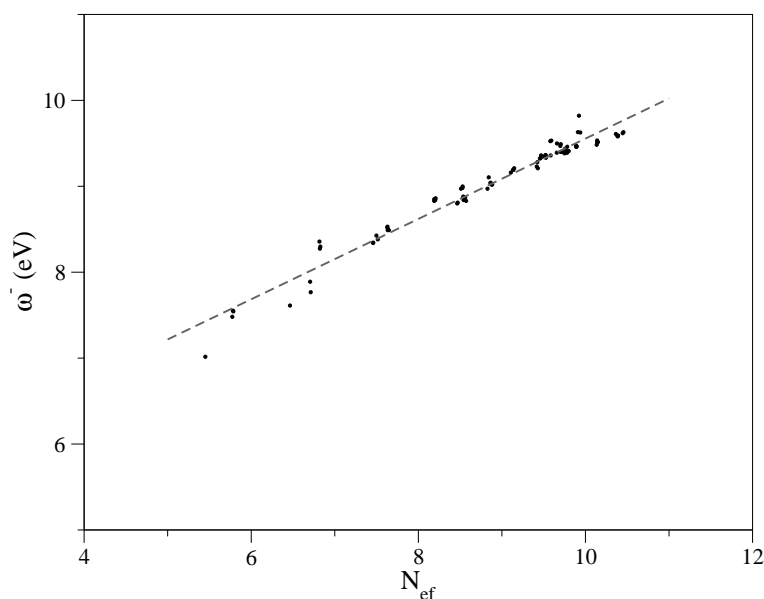


**Figura 5.27** – Forma de la función  $\alpha(\theta)$ , que modula la conjugación a través de un diedro, con valores entre 1 (conjugación completa) y 0 (ausencia de conjugación).

para el que se obtiene el ajuste que se muestra en la Figura 5.28, con un coeficiente de correlación de  $R^2 = 0,964$ , y un error absoluto medio de 0.08 eV. Este valor de  $\mu$  es precisamente el que se emplea en la función  $\alpha(\theta)$  de la Figura 5.27.

Con el fin de validar este modelo, en el que se han empleado datos correspondientes a la rotación de un solo diedro de la cadena los valores obtenidos con el modelo de longitud efectiva de cadena conjugada comparamos, para algunas conformaciones en las que se distorsionan dos o más diedros con los evaluados mediante cálculos DFT. Concretamente, para la conformación en la que se fijan los diedros  $D8 = -D10 = 45^\circ$ , relajando el resto de coordenadas estructurales, se obtiene un valor estimado de  $\omega^-$  con el modelo de  $\omega_{est}^- = 8,76$  eV, mientras que el valor calculado es  $\omega_{calc}^- = 8,72$  eV (*Error* = 0,04 eV), y para  $D10 = D14 = D12' = 45^\circ$  se obtienen los valores  $\omega_{est}^- = 6,90$  eV y  $\omega_{calc}^- = 7,06$  eV (*Error* = 0,16 eV). Estos resultados muestran que el modelo ofrece una estimación razonable de los valores de  $\omega^-$  y que funciona especialmente bien para  $N_{ef} > 7$ , como se observa en el ajuste de la Figura 5.28.

Los errores del modelo se pueden atribuir a otros factores que afectan a los valores de  $\omega^-$ , que también puedan variar con la conformación, como el efecto de los sustituyentes, o a la posible dependencia del parámetro  $\alpha$  con un ángulo diedro específico. En todo caso, el modelo proporciona estimaciones cercanas a los resultados obtenidos mediante cálculos DFT, lo que valida su uso en este estudio para cuantificar la longitud efectiva de cadena conjugada. Consideramos, además, que la expresión para  $N_{ef}$ , y concretamente el valor de  $\mu$ , es el mismo para cualquier carotenoide, ya que el modelo se basa únicamente en la conformación de los diedros de la cadena, que se definen de forma similar en todos los carotenoides. Disponemos de esta forma de un valor de la longitud efectiva de cadena conjugada que se estima únicamente a partir de parámetros estructurales que proporciona un criterio cuantitativo para evaluar las variaciones de las propiedades antioxidantes y espectroscópicas de sistemas formados por distintos carotenoides.



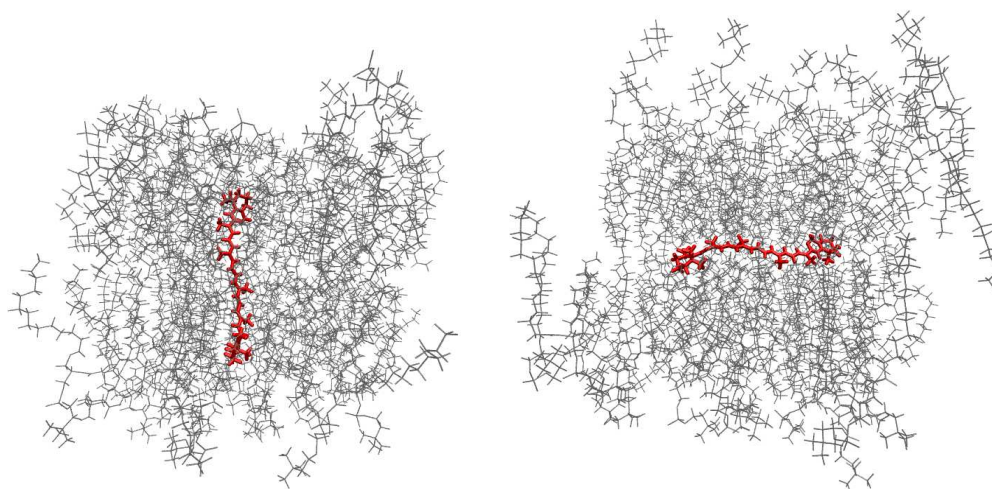
**Figura 5.28** – Ajuste de los valores de  $\omega^-$  frente a la longitud efectiva de cadena conjugada calculada con el valor de  $\mu$  que conduce al mejor ajuste ( $\mu = 0,086 \text{ grados}^{-1}$ ), cuya recta se muestra en trazo discontinuo, y corresponde a la ecuación  $\omega^- = 0,4678N_{ef} + 4,8829$  con  $R^2 = 0,964$ .

#### 5.3.4. Carotenoides en bicapas lipídicas modelo

A lo largo de este capítulo se han desarrollado las herramientas necesarias para realizar cabo las simulaciones de carotenoides en medios biológicos, centrándonos principalmente en la conformación de la cadena y su relación con las propiedades antioxidantes y espectroscópicas de estas moléculas. En este apartado aplicamos esta metodología al estudio de carotenoides inmersos en membranas lipídicas. Este tipo de sistemas se han analizado con anterioridad en la bibliografía [Gruszecki 90, Gruszecki 99, Jemiola-Rzeminska 05, Gruszecki 05, Gruszecki 10], prestando especial atención a la orientación del pigmento dentro de la membrana [Gruszecki 90, Jemiola-Rzeminska 05] y a los efectos que estos producen en la misma [Gruszecki 05]. Y las propiedades antioxidantes de los carotenoides han sido también evaluadas en entornos lipídicos, encontrando que las interacciones con las cadenas lipídicas pueden jugar un papel importante en los procesos oxidativos de estos pigmentos [Pérez-Gálvez 01].

Por lo que respecta a los estudios computacionales previos, Jemiola-Rzeminska y colaboradores han realizado simulaciones de dinámica molecular de  $\beta$ -caroteno inmerso en membranas modelos de 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) [Jemiola-Rzeminska 05], analizando tanto la orientación del carotenoide dentro de la bicapa, como los cambios estructurales producidos en la misma. Para este estudio, Jemiola-Rzeminska y su equipo emplearon un modelo de átomos unidos que resultó útil para observar el comportamiento dinámico del carotenoide durante unos pocos nanosegundos, pero no ofreció ninguna detalle acerca de la conformación adoptada por el pigmento dentro de la membrana.

En este trabajo nos centramos en los carotenoides  $\beta$ -caroteno y zeaxantina que, como hemos visto en la Figura 5.22 presentan una estructura muy similar, diferenciándose únicamente en el

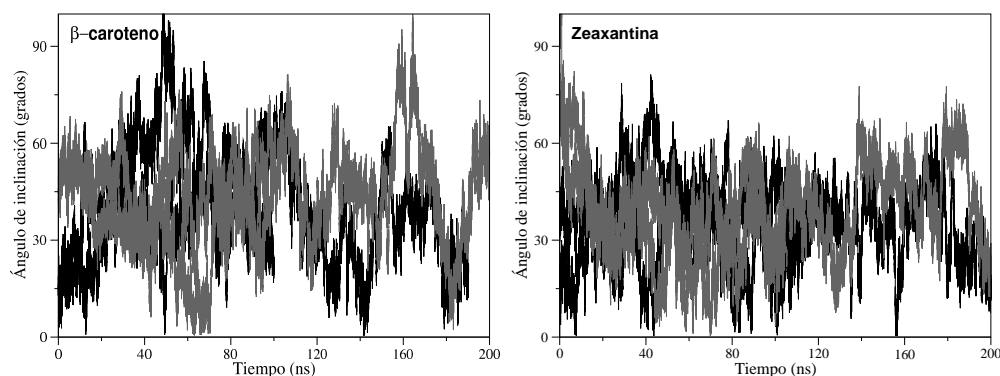


**Figura 5.29** – Configuraciones iniciales de los sistemas formados por 72 moléculas de DMPC (líneas grises) y una molécula de carotenoide (tubos rojos) donde se muestra las orientaciones en la que se dispone el carotenoide: paralelo (izquierda) o perpendicular (derecha) respecto al eje normal a la membrana.

grupo hidroxilo que tiene la zeaxantina en la posición 3 de los anillos de  $\beta$ -ionona. Realizamos entonces simulaciones de dinámica molecular de estas dos moléculas empleando los modelos desarrollados en este trabajo y siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 5.3.1. Los sistemas estudiados están formados por una membrana constituida por 72 moléculas de DMPC (36 cadenas en cada capa), en la que se inserta una molécula de carotenoide que, inicialmente, se coloca en posición prácticamente paralela, o perpendicular, con respecto al eje normal a la membrana, como se muestra en la Figura 5.29, y, tras el equilibrado, se extiende la dinámica durante, al menos, 100 ns. Para cada carotenoide, se ha llevado a cabo concretamente una simulación de 100 ns y otra de 200 ns para cada orientación inicial, lo que supone un total de 4 simulaciones por carotenoide, y las correspondientes simulaciones de cada uno en disolución acuosa. Asimismo, se ha realizado dos simulaciones de una membrana de DMPC pura.

Veamos, por tanto, los resultados de las simulaciones, centrándonos en las propiedades conformacionales que tanta importancia tienen a la hora de establecer el carácter antioxidante y espectroscópico de estas moléculas. Empezamos analizando la orientación que adoptan los carotenoides dentro de la bicapa, caracterizada por el ángulo que forma el eje molecular, descrito por la cadena conjugada, con la dirección normal a la bicapa, que varía entre  $0^\circ$ , para una orientación paralela al eje normal, y  $90^\circ$ , para una orientación perpendicular. El eje molecular del carotenoide se ha definido la línea que une los centros de masas de las dos mitades equivalentes de la cadena conjugada, mientras que el eje normal a la membrana es el coincidente con el eje  $z$ , lo que resulta razonable teniendo en cuenta que la bicapa en la celda de simulación no presenta ondulaciones significativas.

Hemos analizado en primer lugar la evolución del ángulo de inclinación para cada carotenoide a lo largo de 100, o 200 ns, de simulación en condiciones  $NpT$ , en las que las estructuras



**Figura 5.30** – Variación del ángulo de inclinación de las cadenas de carotenoide en simulaciones llevadas a cabo en sistemas ya equilibrados, con  $\beta$ -caroteno (izquierda) y zeaxantina (izquierda) inmersos en membranas de DMPC, con las orientaciones iniciales (antes del equilibrado) tanto paralelas (negro) como perpendiculares (gris) al eje normal a la membrana.

iniciales fueron paralelas o perpendiculares al eje normal a la membrana, como hemos descrito anteriormente. En la Figura 5.30 mostramos como cambian dichos ángulos a lo largo de todas las simulaciones. Como vemos, la molécula de  $\beta$ -caroteno muestra mayores variaciones del ángulo de inclinación, con un valor promedio en torno a  $50^\circ$ , partiendo de cualquiera de las dos orientaciones iniciales. En el caso de zeaxantina, la variación observada es menor, con un ángulo promedio de unos  $30^\circ$ , es decir, más cercano a una orientación paralela, y es independiente, también, de la orientación inicial. Estos resultados concuerdan con los valores experimentales que se obtienen cuando se evalúa la orientación de los carotenoides en distintas membranas, incluyendo datos para DMPC [Gruszecki 90, Gruszecki 99, Gruszecki 10], en los que se han medido ángulos variables ( $0$ - $90^\circ$ ) para  $\beta$ -caroteno y valores en torno a  $25^\circ$  para zeaxantina.

La variación de los ángulos de inclinación pueden explicarse de cualitativamente mediante las interacciones electrostáticas que tienen lugar entre el grupo hidroxilo de la zeaxantina y las cabezas polares de la bicapa, que no se producen en el  $\beta$ -caroteno. Para profundizar en este punto, hemos calculado la energía libre relativa asociada cada orientación dentro de la membrana para los dos carotenoides mediante simulaciones adicionales. Para evitar problemas de muestreo de las zonas más energéticas, hemos usado del método de “Umbrella Sampling” (US), en el que se muestrea una coordenada determinada introduciendo un potencial adicional que restringe la conformación alrededor de un punto concreto de esta coordenada. Las simulaciones con este potencial adicional se han realizado con el programa GROMACS-4.5.5, usando una forma efectiva de muestrear el ángulo de inclinación que consiste en seleccionar la distancia, a lo largo del eje  $z$  ( $d_z$ ), entre los centros de masa que definen el eje molecular de los carotenoides, como se ha indicado anteriormente. Puesto que la distancia absoluta,  $d$ , entre esos centros de masa se mantiene aproximadamente constante e igual, en promedio, a  $1.21$  nm (desviación estándar,  $\sigma = 0,01$  nm) a lo largo de la simulación, el ángulo de inclinación,  $\theta_{tilt}$ , se puede estimar, tras realizar las simulaciones, como  $\theta_{tilt} = \arccos(d_z/d)$ . Así, en cada simulación US se añade un potencial armónico de la forma  $V_{bias} = k(d_z - d_z^0)^2$ , con una constante de fuerza,  $k$ , de  $1000$  kJ/mol, con posiciones de referencia,  $d_z^0$ ,  $0.1$  a  $1.1$  nm, tomadas cada  $0.1$  nm, de forma que se cubra todo el espacio configuracional asociado al ángulo de inclinación. Para



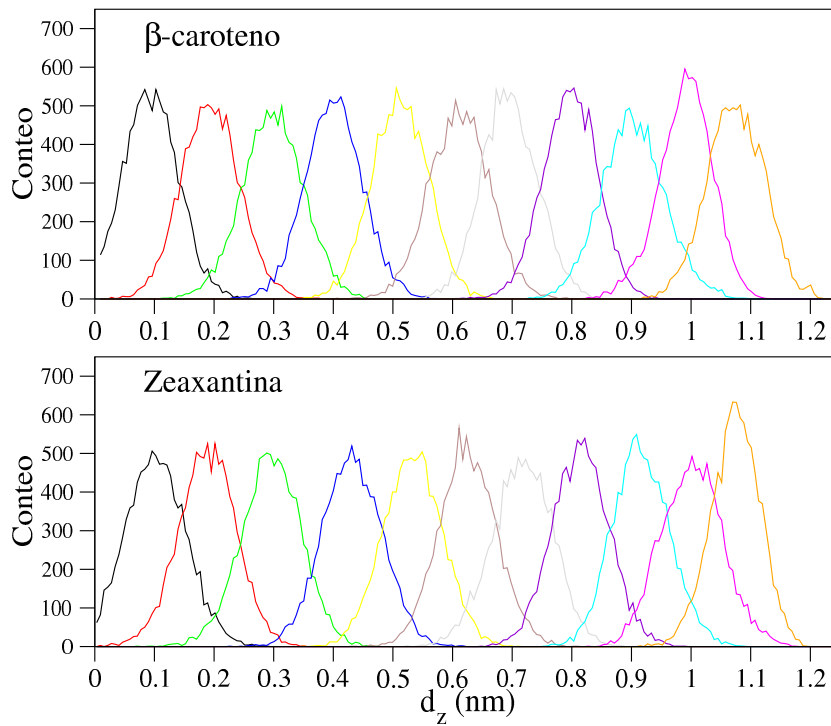
cada punto de referencia, se han realizado simulaciones independientes durante 20 ns, tras 1 ns de equilibrado, con el potencial adicional  $V_{bias}$  en condiciones  $NpT$ , y empleando el mismo procedimiento descrito en al Sección 5.3.1 para las simulaciones sin restricciones adicionales. El conjunto de simulaciones proporciona muestreos solapados entre puntos de referencia contiguos (ventanas), como se muestra en la Figura 5.31, lo que resulta imprescindible en los análisis posteriores para eliminar el efecto de este potencial artificial mediante el método WHAM. Hemos usando, en concreto, el programa *g-wham* [Hub 10], incluido en el paquete GROMACS-4.5.5, en el que introducimos el valor de la fuerza asociada al potencial adicional exportada cada 4 ps durante las simulaciones. Este programa contiene, además, algunas herramientas para estimar el error basado en técnicas de remuestreo (“bootstrapping”), que se han usado para estimar los errores en cada punto.

Los perfiles de energía, o potencial de fuerza media (PMF) extraídos con las simulaciones para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina se muestran en la Figura 5.32, en la que se aprecia un comportamiento bien diferenciado entre los dos carotenoides. Para el  $\beta$ -caroteno se observa un perfil relativamente plano de los ángulos de inclinación desde  $90^\circ$  (orientación perpendicular al eje normal) hasta  $35^\circ$ . En esta región se identifican tres mínimos, a  $90^\circ$ ,  $60^\circ$  y  $40^\circ$ , con barreras energéticas entre ellos muy bajas, lo que da lugar a la gran variación de ángulos de inclinación observada en las simulaciones de la Figura 5.30. Al aproximarse la cadena a los cero grados de inclinación, es decir, a la orientación paralela, se produce un incremento drástico de la energía como consecuencia del acercamiento de los anillos hidrofóbicos de ionona del caroteno a la región polar de la bicapa.

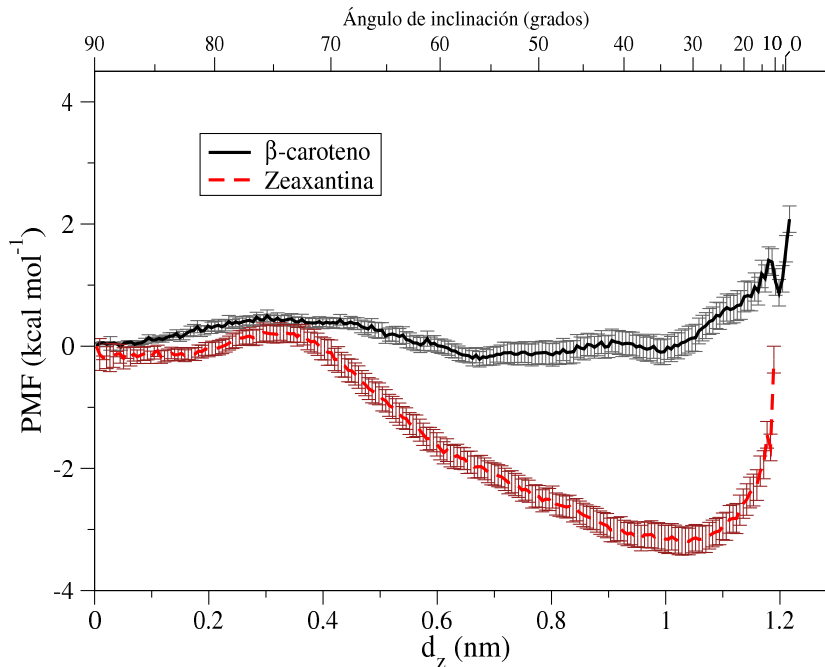
Para la zeaxantina, vemos en la Figura 5.32 que el PMF desciende desde el valor a  $90^\circ$  hasta un mínimo en torno a  $40^\circ$ , que es unas 3 kcal/mol más estable que la conformación totalmente perpendicular. Este comportamiento es compatible con la interacción electrostática entre el grupo hidroxilo de zeaxantina y la región polar de la bicapa.

Para explorar más detenidamente los efectos responsables de los perfiles mostrados en la Figura 5.32 hemos analizado, tanto para  $\beta$ -caroteno como para zeaxantina, los perfiles de densidad correspondientes a las simulaciones US (denominadas “ventanas”) centradas tanto en una orientación prácticamente perpendicular al eje normal de la bicapa ( $d_z = 0,1$  nm) como en una orientación paralela ( $d_z = 1,2$  nm), incluyendo la distribución de densidad de la bicapa, donde se destacan las cabezas polares lipídicas y los anillos de  $\beta$ -ionona para cada ventana. En la Figura 5.33 se muestran estos perfiles, que tienen un comportamiento similar para los dos carotenoides. Con la orientación prácticamente perpendicular se observa una distribución ancha centrada en una de las monocapas, lo que indica que en esta disposición el caroteno se desplaza por una de las capa, mientras que con la orientación prácticamente paralela, se aprecia un solapamiento significativo entre las distribuciones del anillo hidrofóbico y las de la región polar de la bicapa que, tal y como hemos discutido, da lugar a la desestabilización energética.

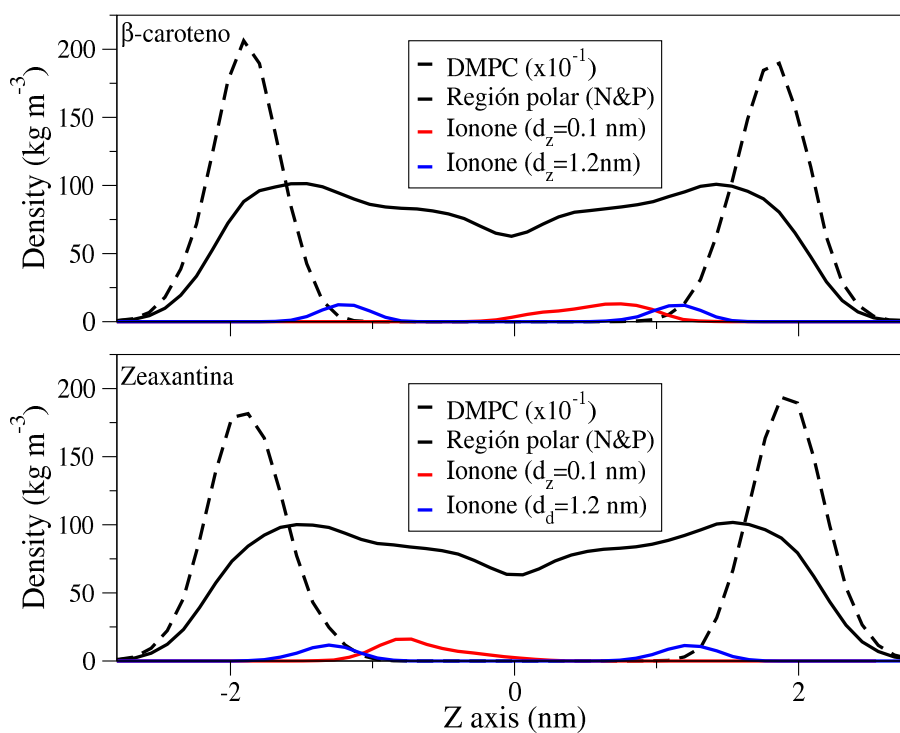
La mayor estabilización observada en el perfil PMF de zeaxantina debe estar relacionada con la interacción electrostática del grupo hidroxilo de zeaxantina con la región polar de la bicapa, a la que nos hemos referido anteriormente. Con el fin de esclarecer este hecho, en la Figura 5.34 mostramos los perfiles de densidad de los grupos relevantes para las simulaciones con  $d_z$  igual a 1.0 nm y 1.2 nm. Se observa claramente en estas figuras que el perfil de densidad para  $d_z = 1$  nm (al que corresponde  $\Theta_{tilt} \approx 40^\circ$ ) tiene el balance más favorable entre las distintas



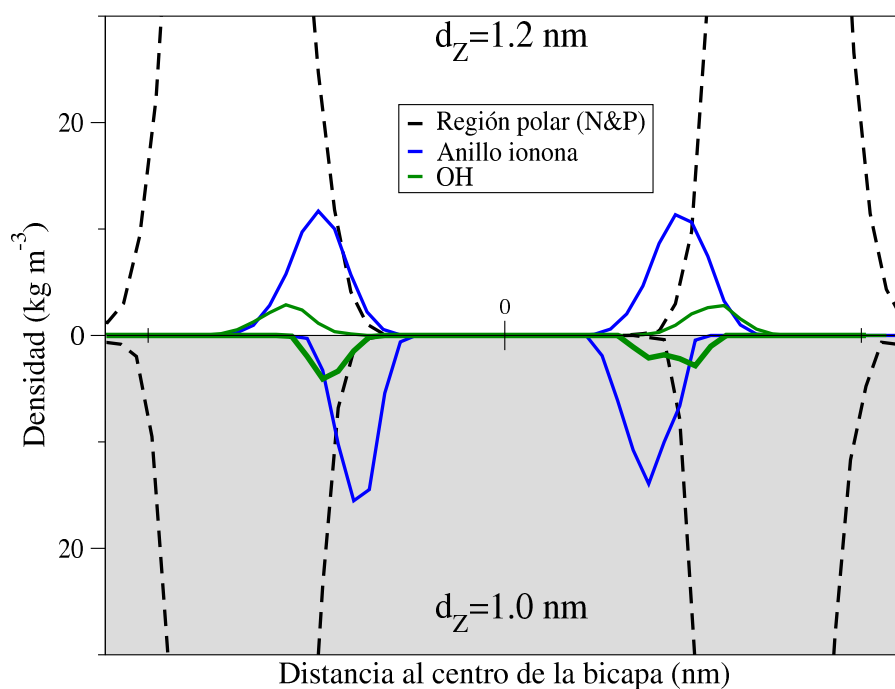
**Figura 5.31** – Histogramas correspondientes al muestreo de todas las simulaciones de “Umbrella Sampling” para cada punto de referencia.



**Figura 5.32** – Potencial de fuerza media (PMF) en función de la distancia entre los centros de masa de cada mitad de la cadena conjugada para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina a lo largo de la dirección normal a la bicapa (eje  $z$ ). El ángulo de inclinación, estimado en cada punto para una distancia absoluta entre los centros de masa de 1.21 nm, se muestra también en el eje superior.



**Figura 5.33** – Perfiles de densidad que muestran la localización de la membrana (DMPC), destacando las cabezas polares definidas por los átomos P y N, y los anillos de β-ionona para simulaciones US en puntos de referencia  $d_z = 0,1$  nm y 1.2 nm, para β-caroteno (arriba) y zeaxantina (abajo).

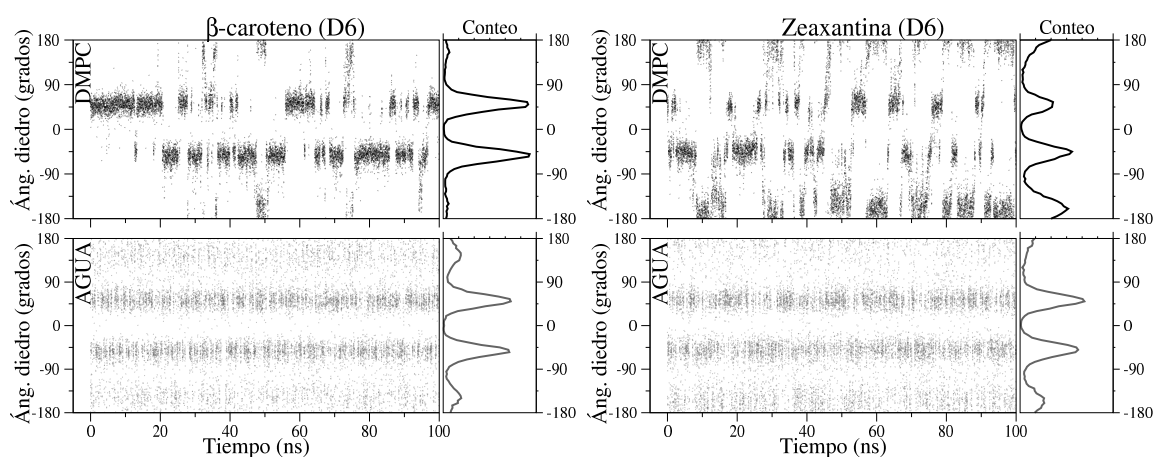


**Figura 5.34** – Perfiles de densidad simulares a los de la Figura 5.33, obtenidos para zeaxantina de simulaciones US en puntos de referencia a  $d_z = 1,0$  nm y  $1,2$  nm, mostrando también la distribución de los grupos hidroxilo del carotenoide.

interacciones, ya que el grupo hidroxilo está inmerso en la zona polar de la bicapa, lo conduce a una estabilización, mientras que el resto del anillo de ionona, cuya naturaleza hidrofóbica da lugar a una interacción desestabilizante con las cabezas polares de los lípidos, se encuentra fuera de esta región polar. Para  $d_z = 1,2$  nm, la interacción de los grupos hidroxilos es similar, pero el anillo de  $\beta$ -ionona entra en contacto directo con la región polar, lo que provoca el incremento energético observado en la gráfica de PMF de la Figura 5.32.

Hemos de destacar en todo caso que la forma en la que se ha definido la coordenada de reacción para las simulaciones de “Umbrella Sampling”, como la distancia en el eje  $z$  entre dos puntos de la molécula, puede dar lugar a una elongación forzada de la cadena de carotenoide. En concreto, ya que la distancia entre los dos puntos, los centros de masa de cada mitad de la cadena, se mantiene prácticamente constante en  $1,21$  nm, las simulaciones US con valores de referencia,  $d_z^0$ , en torno a dicho valor pueden forzar la elongación lo que conlleva a un incremento artificial de la energía. Por esta razón, el último punto de referencia tomado para construir las curvas de la Figura 5.32 fue el de  $d_z^0 = 1,1$  nm, en lugar de  $1,2$  nm. En cualquier caso, el incremento de energía comienza bastante antes de llegar a la región potencialmente problemática, y podemos considerar que los efectos electrostáticos indicados en este trabajo son los principales responsables de los perfiles observados.

Por último, hay que destacar que, de acuerdo con las simulaciones mostradas en la Figura 5.30, los carotenoides adoptan las mismas orientaciones a lo largo ellas, independientemente de la orientación inicial. En lo que respecta a la inclinación de la cadena de caroteno, todas las

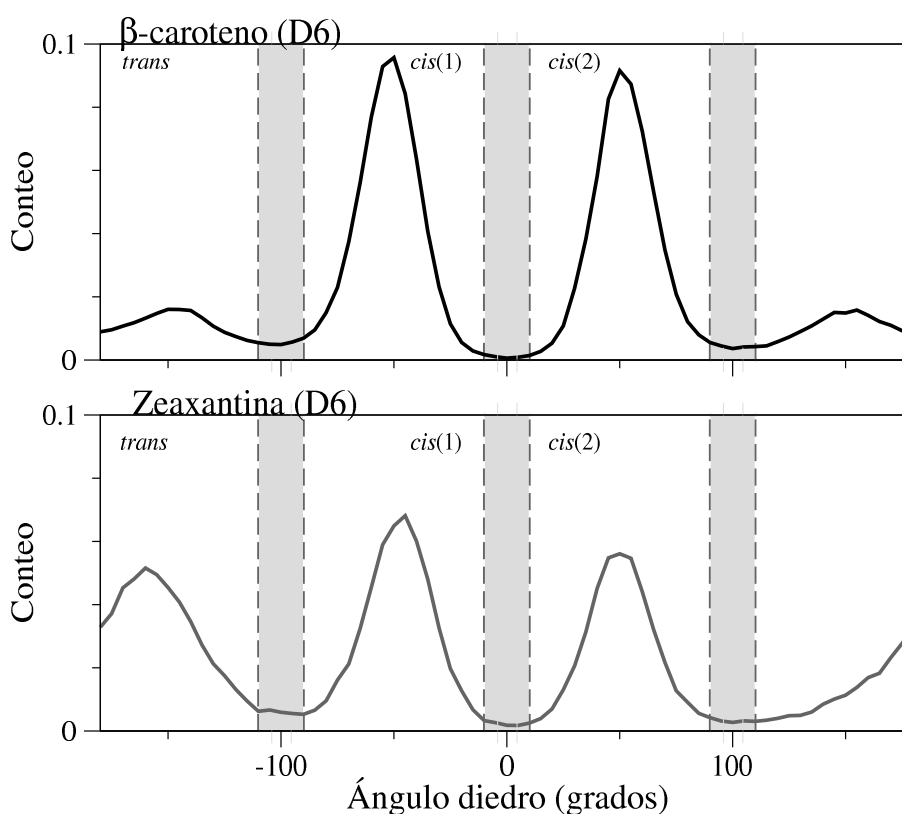


**Figura 5.35** – Evolución del diedro D6 de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina obtenidos a lo largo de las correspondientes simulaciones de 100 ns dentro de la membrana de DMPC y en agua. Para cada simulación se incluye la distribución relativa de cada valor del diedro medida durante toda la simulación.

simulaciones se mueven por tanto en torno a espacios configuracionales análogos, lo que permite emplear los datos de todas ellas para realizar el promedio de otras propiedades conformacionales, como los ángulos diedros de los carotenoides que veremos a continuación.

Pasemos pues a analizar la conformación de las cadenas conjugadas de ambos carotenoides, para lo que nos fijamos en la distribución de los ángulos diedros medidos a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular. En la Figura 5.35 mostramos como evoluciona el valor del diedro D6 para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina durante 100 ns en el seno de la membrana de DMPC y en disolución acuosa. Este diedro es, de hecho, el que más varía a lo largo de la simulación, llegando a adoptar todos los valores posibles, tal como cabe esperar teniendo en cuenta que su curva de potencial presenta las barreras energéticas más bajas. La simulación en agua se ha realizado a la misma temperatura que las de la bicapa (314 K) usando el modelo TIP3P para el disolvente. Por claridad, hemos escogido una sola de las cuatro simulaciones en la membrana para cada carotenoide aunque, como ya hemos apuntado, los resultados son similares en todos los casos. En cuanto al resto de los diedros, la presencia en ellos de barreras de energía mayores conduce a muestreos configuracionales mucho menos variados. De hecho, estos diedros permanecen en la conformación de partida, *trans*, durante toda la simulación, con la excepción del diedro D8 que, en algunas de las dinámicas, sufre cambios conformacionales ocasionales a lo largo de la simulación. En cualquier caso, los diedros distintos de D6 adoptan conformaciones prácticamente *cis* o *trans* que dan lugar, según nuestro modelo de longitud efectiva de cadena conjugada, a valores similares de  $N_{ef}$ , de modo que aunque el muestreo de estos diedros no sea completo, no debe afectar notablemente a los resultados.

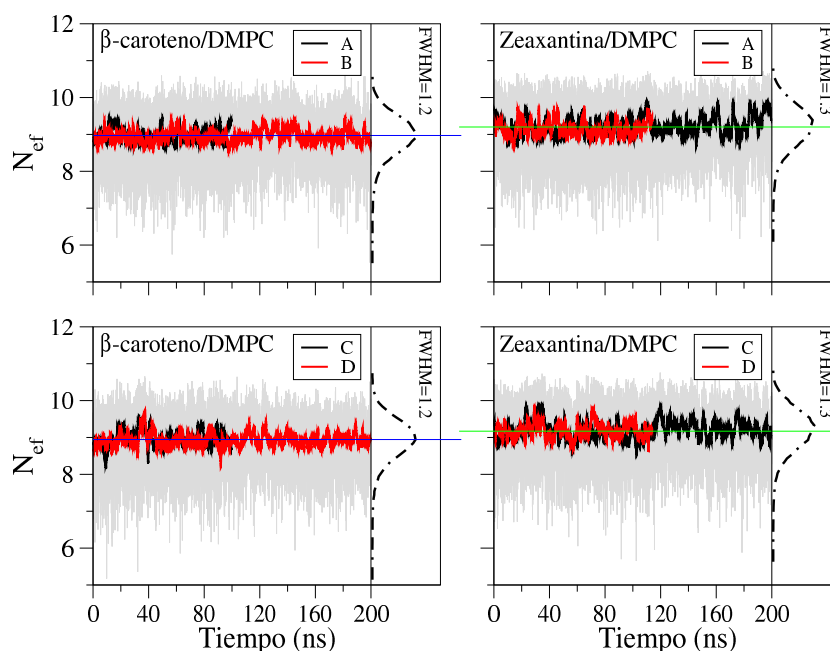
Por lo que respecta al diedro D6, el hecho de que adapte todos los valores posibles de este ángulo, visitando por tanto todas las posiciones del espacio configuracional asociado, no asegura que el muestreo realizado en esta coordenada sea suficientemente completo. Podemos confirmar, sin embargo, que es así teniendo en cuenta que, de acuerdo con nuestro análisis de la orientación adoptada por las cadenas conjugadas en la bicapa, las cuatro simulaciones



**Figura 5.36** – Distribución del diedro D6 de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina inmersos en una bicapa de DMPC, correspondiente al promedio sobre todas las simulaciones independientes llevadas a cabo en este trabajo, y sobre los diedros equivalentes D6 y D6'. De esta forma, el tiempo efectivo de simulación es de  $1.2 \mu\text{s}$ . Las diferentes conformaciones se etiquetan sobre el gráfico como *trans* y *cis* (dos conformaciones próximas a *cis*). Las regiones grises no se consideran como ninguna conformación estable, por lo que corresponden a las barreras energéticas.

realizadas para cada carotenoide pueden considerarse como equivalentes, por lo que resulta razonable pensar en un colectivo formado por la suma de todas las simulaciones a la hora de calcular propiedades promedio, de forma que el tiempo total simulado asciende a  $600 \text{ ns}$  para cada carotenoide. Asimismo, puesto que los diedros D6 y D6' son equivalentes y, al mismo tiempo, independientes, está justificado que se promedien los valores de ambos para la distribución conformacional, con lo que duplicamos el tiempo de simulación efectivo hasta los  $1.2 \mu\text{s}$  para cada sistema. En la Figura 5.36 se incluyen las distribuciones del ángulo D6 de los carotenoides en el seno de la bicapa correspondientes a este muestreo global. Como vemos, los perfiles obtenidos con este muestreo extendido son muy similares a los que se muestran en la Figura 5.35 para las simulaciones individuales de  $100 \text{ ns}$ , lo que indica que se ha obtenido un buen grado de convergencia para esta propiedad.

Volviendo a la Figura 5.35, se observa que, tanto para  $\beta$ -caroteno como zeaxantina, el número transiciones conformacionales por unidad de tiempo del diedro D6 se reduce drásticamente dentro de la bicapa en comparación con el de la dinámica en disolución. Esto es indicativo de un aumento de la altura de las barreras energéticas dentro de la bicapa, lo que se puede relacionar con el



**Figura 5.37** – Evolución temporal de la longitud efectiva de cadena conjugada ( $N_{ef}$ ) a lo largo del as simulaciones de todos los sistemas carotenoides/bicapa estudiados. Los valores puntuales (gris) presentan una gran variabilidad y, por claridad, se incluyen los valores promedio tomados cada 100 puntos, así como el valor promedio de toda la simulación. Las etiquetas (A/B) se corresponden con las indicadas en la Tabla 5.9. A la derecha de cada gráfica se incluye la distribución de valores de  $N_{ef}$  obtenidos a lo largo de las simulaciones.

hecho de que la rotación de los anillos de  $\beta$ -ionona se vea dificultada por las cadenas lipídicas. En cuanto a las distribuciones conformacionales, los perfiles obtenidos en agua y en de la membrana son muy similares para el caso de  $\beta$ -caroteno, pero muestran modificaciones significativas para zeaxantina, donde la conformación *trans* está favorecida dentro de la membrana respecto a los valores en agua. Esto indica una estabilización de esta conformación en el seno de la bicapa que, de acuerdo con el análisis de la orientación de la cadena, tiene su origen en las interacciones electrostáticas entre el grupo hidroxilo de zeaxantina y los grupos polares de los lípidos que forman la bicapa.

Como hemos venido discutiendo a lo largo de esta sección, un aspecto muy importante del análisis estructural de los carotenoides inmersos en las membranas es el papel que juega la conformación en la modulación de las propiedades antioxidantes y espectroscópicas, que podemos analizar en función del modelo de longitud efectiva de cadena conjugada desarrollado en este trabajo. Con el fin de evaluar el efecto del entorno sobre las propiedades de los carotenoides, hemos calculado por tanto la longitud efectiva,  $N_{ef}$ , a lo largo de las simulaciones usando la expresión (5.8). La evolución temporal de  $N_{ef}$  para todas las simulaciones llevadas a cabo se muestra en la Figura 5.37. En ella se observa que la longitud efectiva de cadena conjugada promedio para zeaxantina es algo mayor que la de  $\beta$ -caroteno, si bien los valores de  $N_{ef}$  presentan una gran variabilidad. Para analizar esta desviación más detenidamente se incluye en cada gráfica la distribución de los valores de longitud efectiva que se obtiene a lo largo de las simulaciones.

Estos perfiles muestran que la variabilidad de esta propiedad es similar en todos los casos, con una anchura total a la mitad de la altura de pico (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) de entre 1.2 y 1.3 unidades.

Con esta información podemos estimar el ensanchamiento de las bandas espectrales a causa de la dinámica vibracional. Para ello, tenemos relacionar, en primer lugar, los valores de energía vertical con la longitud efectiva, para lo que empleamos los datos obtenidos de los cálculos TD-DFT que se incluyeron en la Figura 5.25. Ajustando los valores de energía vertical frente a la longitud efectiva correspondiente a cada estructura, se obtiene una línea recta de pendiente 28.14 nm (para  $\lambda_{vert}$ ) y -0.114 eV (para la energía vertical, EV), que proporciona unos valores de ensanchamiento espectral para las distribuciones de  $N_{ef}$  con FWHM=1.25, de unos 35 nm o 0.14 eV. Estos valores suponen un ensanchamiento considerable, lo que concuerda con las anchas bandas que se observan en los espectros de  $\beta$ -caroteno tanto en disolución [Polívka 04, Fuciman 10, Vivas 12] como en membranas [Gruszecki 90] y que, como veremos en el Capítulo 4, tiene su origen en un modo vibracional asociado al diedro D6.

Los valores promedio de  $N_{ef}$  para todos los sistemas, incluyendo las simulaciones en agua, se recogen en la Tabla 5.9, donde se observa un incremento de la longitud efectiva de cadena conjugada al pasar del agua al interior de la membrana, que es más significativo para el caso de zeaxantina. Este alargamiento más pronunciado en zeaxantina es compatible con la interacción del grupo hidroxilo de este carotenoide con la región polar de la bicapa a la que nos hemos referido anteriormente, que conduce a un “estiramiento” de la cadena conjugada. Además, teniendo en cuenta la relación de la longitud efectiva de cadena conjugada con los parámetros  $\omega^-$  y  $\omega^+$  que, de acuerdo con los análisis de la Sección 5.1.3, pueden emplearse para caracterizar las propiedades protectoras, antioxidantes o antiredutoras, esta variación de la longitud efectiva de zeaxantina repercutirá directamente sobre su actividad antiradical. Concretamente, un aumento de la longitud efectiva de cadena conjugada conlleva un aumento tanto de  $\omega^-$  como de  $\omega^+$ , lo que, de acuerdo con la definición de estos parámetros, se traduce en una disminución del poder antioxidante o en un aumento del carácter antireductor. De esta forma, el efecto de esta variación sobre las propiedades protectoras de los carotenoides dependerá de la reactividad de los mismos en entornos lipídicos. En este sentido, Galano y colaboradores [Galano 10] han puesto de manifiesto mediante cálculos teóricos, que los carotenoides actúan como dadores de electrones frente al superóxido ( $O_2^-$ ), y han propuesto que el proceso de recepción de carga debe jugar un papel importante en entornos no polares, como las membranas, en la prevención de la peroxidación de lípidos, por lo que el parámetro  $\omega^+$  parece ser el más adecuado para describir el carácter antiradical de los carotenoides en membranas. Los resultados de Galano y su equipo predicen también que el carotenoide que muestra la actividad protectora más significativa, de entre los analizados, es la astaxantina, y que tanto  $\beta$ -caroteno como zeaxantina presentan un comportamiento similar.



**Tabla 5.9** – Resumen de los resultados extraídos de todas las simulaciones de todos los sistemas estudiados, que incluyen bicapas de DMPC puras, y los carotenoides  $\beta$ -caroteno (BCR) y zeaxantina (ZEA) inmersos tanto en la membrana de DMPC como en disolución acuosa. Los sistemas simulados en varias ocasiones se etiquetan con letras mayúsculas en orden alfabético. Se indican la descripción del sistema y algunos detalles (cuando es aplicable) como la orientación inicial del carotenoide y el tiempo de simulación, y los resultados de la longitud efectiva promedio ( $\langle N_{ef} \rangle$ ), incluyendo la diferencia entre los valores en la bicapa y en agua ( $\Delta \langle N_{ef} \rangle_{D-A}$ ), y dos propiedades de la membrana como son la difusión lateral de los lípidos ( $D_l$ ) y el área por lípido ( $A_L$ ).

Sistema	Orientación inicial	Tiempo simul. (ns)	$\langle N_{ef} \rangle$	$\Delta \langle N_{ef} \rangle_{D-A}$	$D_l \times 10^8$ (cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	$A_L$ (Å <sup>2</sup> /lípido)
DMPC(pura) /A	–	100	–	–	$6,2 \pm 1,2$	$59 \pm 2$
DMPC(pura) /B	–	100	–	–	$6,4 \pm 0,4$	$58 \pm 2$
BCR/Agua	–	100	8.93	–	–	–
BCR/DMPC /A	paralela	100	8.98	0.05	N.D. <sup>a</sup>	$54 \pm 2$
BCR/DMPC /B	paralela	200	8.95	0.02	$12,0 \pm 0,4$	$59 \pm 2$
BCR/DMPC /C	perpendicular	100	8.96	0.03	N.D. <sup>a</sup>	$53 \pm 3$
BCR/DMPC /D	perpendicular	200	8.93	0.00	$16,9 \pm 0,4$	$57 \pm 3$
ZEA/Agua	–	100	9.06	–	–	–
ZEA/DMPC /A	paralela	200	9.23	0.17	$6,4 \pm 0,1$	$60 \pm 2$
ZEA/DMPC /B	paralela	100	9.17	0.11	N.D. <sup>a</sup>	$59 \pm 2$
ZEA/DMPC /C	perpendicular	200	9.19	0.13	$7,6 \pm 0,3$	$61 \pm 2$
ZEA/DMPC /D	perpendicular	100	9.15	0.09	N.D. <sup>a</sup>	$59 \pm 1$

<sup>a</sup> N.D: no determinado. Solo se incluyen los valores calculados en las simulaciones de 200 ns ya que para las simulaciones más cortas el intervalo de error resultó excesivo

Experimentalmente, McNulty y colaboradores [McNulty 07], han mostrado que, efectivamente, astaxantina es un agente protector eficiente en membranas de fosfatidilcolina, lo que concuerda con los datos del grupo de Galano. Sin embargo, estos mismos experimentos muestran un comportamiento claramente diferenciado para  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, indicando que  $\beta$ -caroteno posee un poder protector más bajo. Este último resultado contradice las predicciones de Galano y su equipo, así como los hallazgos experimentales de Pérez-Gálvez y colaboradores [Pérez-Gálvez 01], quienes mostraron, en mezclas lípido-carotenoide, velocidades de peroxidación similares cuando el carotenoide presente era  $\beta$ -caroteno o zeaxantina. Aunque McNulty y su grupo explicaron sus resultados en términos del diferente grado de perturbación que produce cada carotenoide en la membrana, nuestro modelo ofrece una explicación alternativa basada precisamente en la modulación de las propiedades antioxidantes de los carotenoides por su interacción con la membrana. De acuerdo con nuestros resultados, se produce un aumento significativo de la longitud efectiva de cadena conjugada para zeaxantina, que no se observa para  $\beta$ -caroteno, lo que da lugar a un aumento de  $\omega^+$  para zeaxantina que, de acuerdo con nuestro modelo, mejora el carácter antiradical, en concordancia con los resultados experimentales.

Aunque nuestro modelo permite explicar los resultados experimentales, habría que tener en cuenta también, tal y como indican McNulty y colaboradores, los posibles cambios estructurales que se producen en la membrana, de modo análogo al estudio realizado para los ácidos grasos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre para los ácidos grasos, la propiedad terapéutica, el carácter antioxidante, es inherente a los carotenoides. Además, puesto que las concentraciones plasmáticas de los carotenoides son menores que las de los ácidos grasos [Hartmann 04, Garcia-Roves 07], parece razonable que su mecanismo de acción se base en su poder antioxidante y no en su capacidad de alterar la estructura de la membrana. Aún así, completamos nuestro estudio calculando algunas propiedades de las membranas con carotenoides, aunque en este caso, al tratarse de sistemas con una concentración muy baja de moléculas insertadas (carotenoide/fosfolípido 1:72), no cabe esperar alteraciones excesivamente grandes, si bien pueden mostrar algunas tendencias.

En la Tabla 5.9 incluimos el coeficiente de difusión lateral de los lípidos y el área por lípido, calculados de forma similar a cómo se hizo en los sistemas con ácidos grasos. Nuestros resultados apuntan a efectos desiguales de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, de acuerdo con las evidencias aportadas por Gruszecki y Strzalka [Gruszecki 05], que muestran que carotenos y xantofilas dan lugar alteraciones diferentes en membranas. Así, en nuestras simulaciones se observa que la molécula de  $\beta$ -caroteno altera significativamente el coeficiente de difusión, mientras que la zeaxantina apenas introduce variaciones con respecto de los valores obtenidos en membranas puras. Este hecho se puede relacionar con su posición dentro de la membrana, ya que la molécula de zeaxantina queda anclada a la región polar de la bicapa mediante el grupo hidroxilo, empaquetándose de forma más eficaz y produciendo, por tanto, una menor perturbación. Aún así, incluso en el caso de  $\beta$ -caroteno, la alteración estructural de la membrana no es significativa, como se deduce de las ligeras modificaciones observadas en el área por lípido entre la membrana pura y las simulaciones, de 200 ns, tanto de zeaxantina como de  $\beta$ -caroteno. En cualquier caso, para obtener una información más completa de la incidencia en la membrana, sería necesario analizar sistemas con más de una molécula de carotenoide. Esta tarea queda fuera del alcance de este trabajo, que se ha centrado en las propiedades antioxidantes de los carotenoides, identificando satisfactoriamente la modulación de las mismas con la conformación que adoptan en membranas.

### 5.3.5. Carotenoides en sistemas fotosintéticos

Para finalizar este capítulo introducimos el análisis conformacional de carotenoides en sistemas fotosintéticos. En este caso, el entorno que rodea a estos pigmentos es mucho más complejo que el de las membranas lipídicas, de modo que abordaremos únicamente el análisis estructural de algunos fotosistemas que contienen  $\beta$ -caroteno centrándonos en la conformación que adopta su cadena conjugada, que se relaciona entonces con los parámetros antioxidantes calculados en la sección anterior.

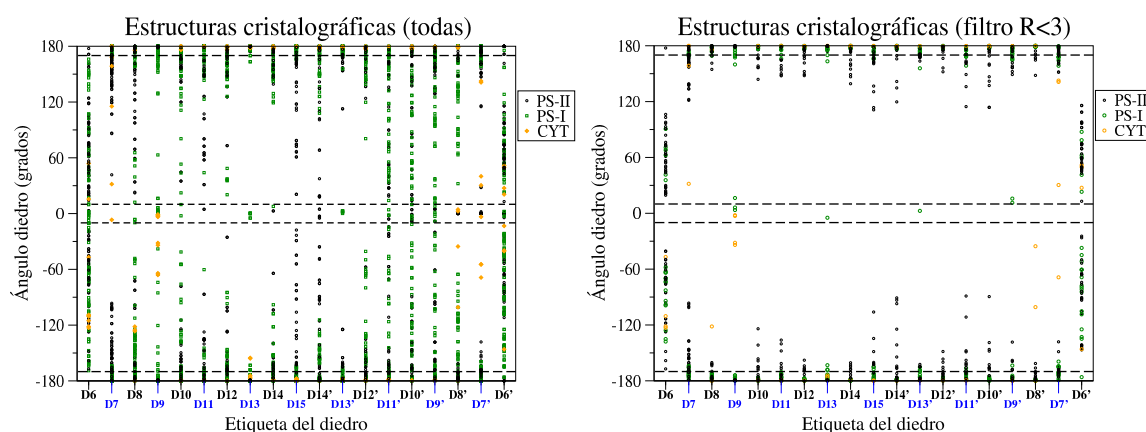
Comenzamos evaluando directamente la conformación de las moléculas de  $\beta$ -caroteno tal y como se incluyen en las estructuras cristalográficas que se han resuelto para los complejos fotosintéticos que contienen este carotenoide. Cabe destacar, en este sentido, el gran esfuerzo investigador que se ha hecho en la última década para elucidar este tipo de estructuras como muestra el gran número de las mismas que se han descrito en la bibliografía [Jordan 01, Kamiya 03, Kurisu 03, Stroebel 03, Biesiadka 04, Ferreira 04, Loll 05, Yan 06, Amunts 07, Yamashita 07, Baniulis 09, Guskov 09, Kawakami 09, Amunts 10, Broser 10, Broser 11, Chapman 11, Umena 11], incluyendo fotosistemas I (PS-I) y II (PS-II) y citocromo. En la Tabla 5.10 se resumen todos los fotosistemas con  $\beta$ -caroteno que se han encontrado en la base de datos RCSB (<http://www.rcsb.org>). A pesar de la baja resolución de la mayoría de estas estructuras, algunas de ellas son lo suficientemente precisas como para permitir un análisis conformacional del caroteno, aunque en todo caso nos limitamos a analizar las estructuras en términos de la conformación *cis/trans* de los dobles enlaces de la cadena, pudiendo evaluar entonces el diferente carácter antioxidante de cada isómero en función de la escala derivada al final de la Sección 5.1.3.

Hemos medido en primer lugar el valor de los ángulos diedros (D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15, y los ángulos equivalentes representados con una prima) a lo largo de las cadenas de todas moléculas de  $\beta$ -caroteno que se encuentran en los mismos para todos los sistemas de incluidos en la Tabla 5.10. En la Figura 5.38 representamos todos estos valores (izquierda) junto con los correspondientes a las estructuras con una resolución de al menos 3 Å (derecha). Esta figura muestra claramente que la mayor parte de las conformaciones intermedias, entre *cis* y *trans*, se observan en las estructuras de peor resolución, por lo que centramos nuestro análisis en el conjunto de conformaciones correspondientes a las estructuras mejor resueltas. Como ya hemos comentado, en este estudio nos limitamos a etiquetar las estructuras como *cis* o *trans*, sin analizar en detalle los valores concretos de los ángulos. Vemos entonces en la Figura 5.38 que la mayoría de los diedros corresponden a una conformación *trans*, lo que concuerda con la mayor estabilidad de esta geometría para todos los diedros, excepto el D6. Precisamente en ese caso, el ángulo diedro se encuentra desplazado respecto a la conformación plana, *cis* o *trans*, y la distribución de estos valores presenta una dispersión apreciable, lo que se relaciona con la baja barrera energética que presenta la rotación de este diedro, como se aprecia en la Figura 5.23.

Asimismo, encontramos algunas conformaciones *cis* para los diedros D9 y D13 lo que concuerda también con el hecho de que los isómeros *monocis* 9-*cis* y 13-*cis* sean precisamente los más estables, después del isómero *all-trans*, tal como se muestra en la Tabla 5.7. Asimismo, la presencia de estos isómeros se puede relacionar con el papel antioxidante de estos pigmentos [Koyama 91]. Efectivamente, si suponemos que la reactividad dentro de los fotosistemas viene

**Tabla 5.10** – Listado de las estructuras cristalográficas de fotosistemas conteniendo  $\beta$ -caroteno tomadas de la base de datos RCSB. Las estructuras corresponden a diferentes complejos fotosintéticos, como se indica sobre la tabla.

Identificador PDB	Núm. BCR	Resolución (Å)	Referencia
Fotosistema II			
1IZL	2	3.70	[Kamiya 03]
1S5L	14	3.50	[Ferreira 04]
1W5C	2	3.20	[Biesiadka 04]
2AXT	22	3.00	[Loll 05]
3A0B	22	3.70	[Kawakami 09]
3A0H	22	4.00	[Kawakami 09]
3BZ1	12	2.90	[Guskov 09]
3BZ2	12	2.90	[Guskov 09]
3KZI	11	3.60	[Broser 10]
3PRQ	12	3.20	[Broser 11]
3PRR	12	3.20	[Broser 11]
3ARC	12	1.90	[Umena 11]
Fotosistema I			
1JB0	22	2.50	[Jordan 01]
2O01	5	3.40	[Amunts 07]
2WSC	18	3.49	[Amunts 10]
2WSE	18	3.49	[Amunts 10]
2WSF	16	3.48	[Amunts 10]
3LW5	19	3.30	[Amunts 10]
3PCQ	22	8.98	[Chapman 11]
Citocromo b6f			
1Q90	1	3.10	[Stroebel 03]
1VF5	2	3.00	[Kurusu 03]
2D2C	2	3.80	[Yan 06]
2E74	1	3.00	[Yamashita 07]
2E75	1	3.55	[Yamashita 07]
2E76	1	3.41	[Yamashita 07]
2ZT9	1	3.00	[Baniulis 09]

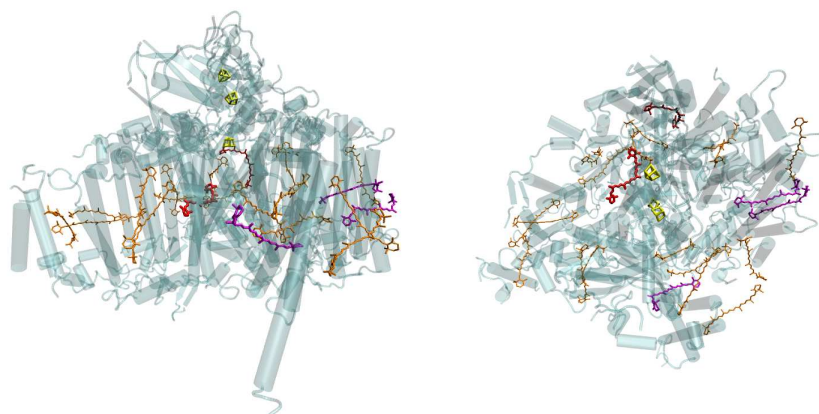


**Figura 5.38** – Ángulos diedros medidos en todas las estructuras cristalográficas disponibles de fotosistemas conteniendo  $\beta$ -caroteno (izquierda) y una selección de los valores en las estructuras con una resolución de al menos 3 Å. Las estructuras cristalográficas corresponden a los complejos fotosistema I y II (PS-I y PS-II) y citocromo b6f (CYT).

marcada por la capacidad de actuar cediendo electrones y, por tanto, mediante el parámetro  $\omega^-$ , los isómeros con mayor poder protector, de acuerdo con la clasificación dada en la Sección 5.1.3, son los 9- y 13-*dicis* y el *monocis*, por lo que su presencia complementa el bajo poder antioxidante del isómero mayoritario *all-trans* incluido en la misma clasificación. Este isómero *all-trans*, por el contrario, es el que tiene una mayor capacidad de captar luz, como pone de manifiesto la mayor intensidad de la banda de absorción calculada teóricamente para una serie de isómeros del  $\beta$ -caroteno [Cerón-Carrasco 10b].

Con el fin de investigar más detenidamente la distribución de los isómeros de  $\beta$ -caroteno, hemos seleccionado el fotosistema I de cianobacterias con una resolución de 2.5 Å obtenido por Jordan y colaboradores [Jordan 01]. Este fotosistema captura la luz mediante una extensa antena interna, canalizándola hacia el núcleo del centro de reacción de forma eficiente. En este proceso, las 22 moléculas de  $\beta$ -caroteno presentes pueden actuar como captadores de luz y fotoprotectores. En la Figura 5.39 mostramos la estructura de este fotosistema, incluyendo todas las moléculas de  $\beta$ -caroteno, y descartando la representación de otros elementos como las clorofilas para centrar nuestra atención en los carotenos. Vemos en esta figura que la mayor parte de las estructuras corresponden al isómero *all-trans* (naranja), aunque también se identifican tres isómeros *monocis* (violeta), en concreto dos isómeros 9-*cis* y uno 13-*cis*, junto con dos isómeros *dicis* (rojo), uno 9,13'-*dicis* y otro 9,9'-*dicis*. Estos isómeros son, de hecho, los cuatro isómeros *cis* más estables de acuerdo con los datos de la Tabla 5.7, lo que explica su presencia en el fotosistema. Resulta además interesante que el isómero 9,13'-*dicis*, que de acuerdo con la escala de la Sección 5.1.3 es uno de los mejores antioxidantes, se encuentre colocado próximo al núcleo del complejo proteico, cerca del centro de reacción, donde cabe esperar que el estrés oxidativo sea mayor, requiriendo la presencia de moléculas antioxidantes eficientes, como el isómero 9,13'-*dicis* de acuerdo con nuestro estudio.

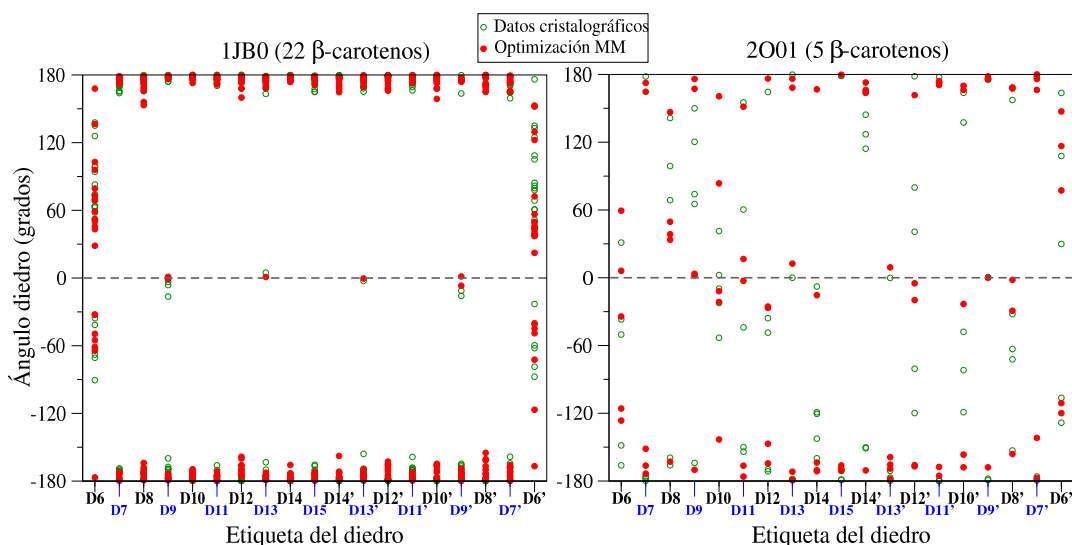
Por último, teniendo en cuenta que los valores conformacionales de los diedros de la Figura 5.38 pueden verse afectados por la limitada resolución de las estructuras, las hemos refinado me-



**Figura 5.39** – Vista lateral (izquierda) y superior (derecha) de la estructura tridimensional del fotosistema I de cianobacteria (código PDB: 1JB0) destacando las posiciones de los isómeros de  $\beta$ -caroteno: *all-trans* (naranja), *9-cis* y *13-cis* (violeta), *9,9'-dicis* y *9,13'-dicis* (rojo). La estructura de la proteína se muestra en azul de forma semitransparente y el clúster  $\text{Fe}_4\text{S}_4$ . Las moléculas de clorofila, que es el pigmento más abundante no se muestran por claridad.

diante una optimización estructural empleando, para los carotenoides, los parámetros empíricos derivados en este trabajo, los correspondientes a CHARMM27 para la proteína y los derivados por Foloppe [Foloppe 95] para las clorofilas. En primer lugar reconstruimos la zonas incompletas del sistema siguiendo la metodología indicada en la Sección 5.1.4. El sistema formado tiene unas dimensiones excesivamente grandes, por lo que, con el fin de aligerar el coste computacional, en este trabajo nos hemos limitado a la optimización de los carotenoides, fijando el resto de átomos en sus posiciones iniciales. De esta forma evitamos que se produzcan cambios estructurales apreciables en el sistema, centrándonos en los cambios conformacionales que tienen lugar en los carotenoides al realizar la optimización.

Hemos realizado concretamente la modelización y posterior optimización de dos complejos fotosintéticos, el obtenido por Jordan y su equipo [Jordan 01] (código PDB: 1JB0), que incluye 22 carotenos con una resolución relativamente buena de 2.5 Å, y el obtenido por Amunts y colaboradores [Amunts 07] (código PDB: 2O01), con 5 carotenos y una resolución algo peor, de 3.40 Å. En la Figura 5.40 se muestran los valores medidos en las estructuras cristalográficas originales, junto con los valores de las estructuras optimizadas. Como cabe esperar, los diedros correspondientes a la estructura 1JB0 mantienen prácticamente el valor original en las estructuras optimizadas, mostrando en ambos casos una geometría *cis/trans* bien definida. Este resultado supone una validación del procedimiento seguido en este trabajo, ya que el campo de fuerzas empleado para los carotenoides no conduce a perturbaciones importantes en una estructura bien resuelta. La estructura original para el fotosistema 2O01 muestra, por otro lado, una gran dispersión para todos los diedros, con valores claramente alejados de las geometrías *cis/trans* esperadas. Resulta razonable, por tanto, que la optimización conduzca a alteraciones significativas de la geometría inicial, ajustando la mayor parte de los diedros a conformaciones *cis* o *trans*. Cabe destacar, no obstante, que algunos diedros, aparte del D6, como el D8 o el D10



**Figura 5.40** – Ángulos diedros de las cadenas poliénicas de moléculas de  $\beta$ -caroteno inmersas en dos fotosistemas medidos en la estructuras cristalográficas original y en las estructuras optimizadas con el método MM empleando el campo de fuerzas desarrollado en este trabajo para  $\beta$ -carotene.

presentan geometrías intermedias, lo que apunta a que las interacciones el entorno fotosintético son capaces de perturbar la conformación de los carotenoides de forma significativa.

Para acabar conviene resaltar que en este apartado hemos puesto a punto una metodología de modelización de fotosistemas, utilizando el campo de fuerzas desarrollado en esta Tesis para los carotenoides, que supone una base importante para la continuación de este proyecto. En este sentido, los resultados de las optimizaciones que muestran conformaciones torsionadas parecen validar las hipótesis acerca del papel que este tipo de estructuras desempeñan en los fotosistemas, donde sus propiedades espectroscópicas pueden verse alteradas por la conformación que adopta [Koyama 91, Polívka 10, Mendes-Pinto 13]. Los resultados de un reciente trabajo publicado en la revista *Nature* por Wang y colaboradores [Wang 12] apuntan, sin embargo, a efectos electrostáticos del entorno, en lugar de los conformacionales, como principales responsables de estos cambios espectroscópicos, lo que abre un interesante debate en el que las técnicas computacionales, como las desarrolladas en este trabajo, pueden ofrecer una imagen detallada y contribuir significativamente al esclarecimiento del problema.





## CAPÍTULO 6

# Espectroscopía y estados excitados en carotenoides

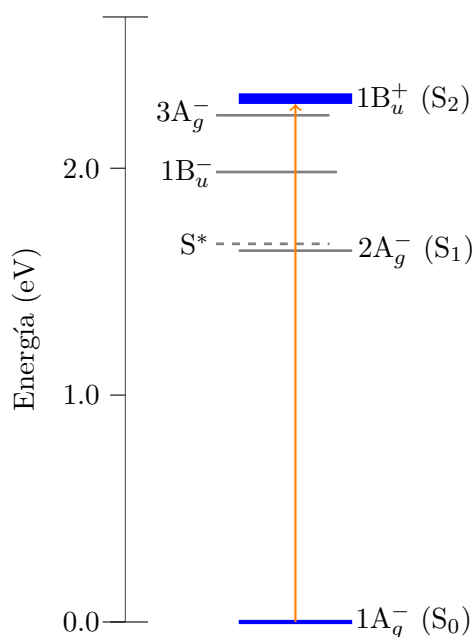
Junto con las propiedades antioxidantes, presentadas en el capítulo anterior, los carotenoides se caracterizan por poseer una rica fotoquímica que involucra, además de estados electrónicos accesibles mediante espectroscopías monofotónicas, otros estados de carácter multifotónico que pueden llegar a jugar un papel esencial en los complejos mecanismos de relajación que siguen a la excitación. En este capítulo comenzamos realizando una revisión actualizada de todos estos estados excitados de baja energía, y nos centramos en los dos unidos mediante absorción monofotónica: el fundamental,  $S_0$ , y el excitado  $S_2$ . Teniendo en cuenta la importancia de la estructura vibracional en la dinámica de los estados electrónicos, a continuación analizamos los niveles vibracionales del estado fundamental, con el fin de identificar los modos normales más relevantes en los carotenoides. Para validar esta descripción, simulamos los espectros infrarrojo (IR) y Raman infrarrojo de  $\beta$ -caroteno, que pueden compararse con los resultados experimentales. Finalmente estudiamos la estructura vibracional de los estados fundamental  $S_0$  y excitado  $S_2$  de los distintos isómeros de  $\beta$ -caroteno y violaxantina, y simulamos los espectros electrónicos con resolución vibracional correspondientes al tránsito  $S_0 \rightarrow S_2$ , tanto a temperatura criogénica como a temperatura ambiente, que pueden ser compararse directamente con los resultados experimentales.

## 6.1. FOTOQUÍMICA DE LOS ESTADOS ELECTRÓNICOS DE BAJA ENERGÍA

Uno de los aspectos más interesantes de los carotenoides es su compleja estructura de estados electrónicos excitados que, en última instancia, son responsables de los importantes procesos de transferencia de energía que tienen lugar, por ejemplo, en los fotosistemas [Cogdell 87, Polívka 04]. Siendo la cadena poliénica la principal característica estructural de los carotenoides, no sorprende que estos estados excitados de baja energía estén estrechamente relacionados con dicha cadena conjugada y, de hecho, se puedan relacionar directamente con los estados análogos de polienos. Esta situación ha resultado ser muy ventajosa en estudio de los carotenoides, teniendo en cuenta los grandes esfuerzos que se han dedicado en la descripción, tanto experimental como teórica, de este tipo de sistemas desde hace décadas.

Desde el punto de vista teórico los polienos han sido uno de los bancos de pruebas preferidos para la puesta a punto de distintas metodologías teóricas, principalmente, en el campo de los estados excitados. Sin duda, la gran importancia que se ha dado a los carotenoides tiene que ver con aspectos prácticos como la gran cantidad de datos experimentales existentes y el hecho de que presenten un parámetro característico que module sus propiedades de forma sistemática: el número de dobles enlaces o, como se ha descrito en el capítulo anterior, la longitud (efectiva) de cadena conjugada. Pero aún más atractivo ha resultado el difícil reto teórico y experimental que ha supuesto la naturaleza de los distintos estados electrónicos excitados, cuyo tratamiento computacional han requerido desarrollar expansiones multideterminamentales para describir la función de onda, desde los iniciales cálculos CI semiempíricos de Pariser [Pariser 56] hasta los más modernos métodos multireferenciales [Kurashige 04, Kleinschmidt 09]. Desde el punto de vista experimental, la situación es aún más complicada, ya que la mayor parte de los estados electrónicos no son detectables con las técnicas espectroscópicas monofotónicas convencionales, razón por la cuál, el esquema de niveles excitados solo ha podido ser correctamente descrito a la luz de las modernas técnicas de bombeo-sonda con alta resolución temporal y espectroscopías multifotónicas y, aún así, todavía existe un intenso debate acerca de la naturaleza de alguno de estos estados, como veremos más adelante. En este sentido, cabe destacar la importancia que han tenido y continúan teniendo los cálculos teóricos en la comprensión de estos estados, lo que hace que el estudio de los polienos constituya una de las conjunciones más brillantes entre teoría y experimento.

El esquema de niveles electrónicos singletes para carotenoides (y polienos) es el que se presenta en la Figura 6.1, en la que se han usado los datos disponibles para licopeno para dar una idea de la posición de los niveles, aunque el orden de los mismos se ve alterado por la longitud efectiva de cadena conjugada [Polívka 04, Kurashige 04, Kleinschmidt 09]. Conviene, en primer lugar, realizar algunas aclaraciones acerca de las etiquetas asignadas a cada estado, excepto al  $S^*$ . La nomenclatura empleada corresponde a las etiquetas del grupo de simetría  $C_2$  al que pertenecen los polienos, donde los subíndices denotan la paridad de la función de onda como “*g*” (*gerade*) y “*u*” (*ungerade*), y los superíndices, “+” o “-”, hacen referencia a los términos de pseudo-paridad introducidos por Pariser [Pariser 56] para designar la ruptura de la degeneración de estados excitados que se produce mediante el tratamiento CI, que da lugar a nuevos estados como suma (“+”) y resta (“-”) de los originalmente degenerados. Al margen de su definición inicial, los estados “+” y “-” se distinguen también como iónicos y covalentes, respectivamente,



**Figura 6.1** – Esquema de los estados electrónicos de baja energía de los carotenoides. La escala de energías se ha construido a partir de los valores para licopeno en *n*-hexano, para los estados  $3A_g^-$ ,  $2A_g^-$  ( $S_1$ ),  $1B_u^-$  y  $1B_u^+$  ( $S_2$ ) recogidos en la bibliografía [Sashima 00, Polívka 04]. El nivel  $S^*$  se ha colocado arbitrariamente cerca del  $S_1$ .

de acuerdo con las estructuras resonantes más importantes obtenidas en la descripción de cada estado usando la Teoría de Enlace de Valencia [Hirao 97, Kurashige 04]. Además de definir de esta manera la naturaleza de los estados, la pseudo-paridad trae aparejadas reglas de selección adicionales, tanto en procesos monofotónicos [Pariser 56] como multifotónicos [Birge 86]. Concretamente, en el caso monofotónico, solo están permitidos los tránsitos que involucren un cambio de la pseudo-paridad, es decir, “+”  $\rightarrow$  “-” o “-”  $\rightarrow$  “+”. Si añadimos las reglas de selección relacionadas con la simetría, que establecen que en el tránsito debe cambiar también la paridad [Requena 04], es decir,  $g \rightarrow u$  o  $u \rightarrow g$ , se llega a la conclusión de que el único tránsito monofotónico permitido entre los niveles representados en la Figura 6.1, es el que tiene que lugar entre el estado  $1^1A_{1g}^-$ , que es el fundamental ( $S_0$ ), y el estado  $1^1B_{1u}^+$ , originalmente identificado como  $S_2$ .

Como ya se ha comentado, la posición relativa de los niveles varía, en realidad, con el número de dobles enlaces conjugados. En este sentido, se ha comprobado, tanto experimentalmente [Sashima 00, Polívka 04] como teóricamente [Kurashige 04, Kleinschmidt 09], que conforme aumenta el número de dobles enlaces, disminuye la energía de separación entre los niveles. Un aspecto interesante es que la variación energética con el número de dobles enlaces es similar para los estados con la misma pseudo-paridad, con una disminución más acusada para los estados “-”, en comparación con los estados “+” [Kurashige 04]. Como consecuencia de ello, los niveles  $2B_u^-$  y  $3A_g^-$ , que están por encima del nivel  $1B_u^+$  ( $S_2$ ) en polienos cortos, llegan a cruzarse con este último nivel al aumentar la longitud de la cadena conjugada. Para el estado  $1B_u^-$ , el cruce se produce en sistemas de unos 9 dobles enlaces ( $N_{doble}$ ), por lo que en los carotenoides ( $N_{doble} \approx 11 - 13$ ) este

estado se encuentra por debajo del  $S_2$ . Sin embargo, para el estado  $3A_g^-$ , el cruce se produce a mayores longitudes de cadena y no está claro si se encuentra por encima o por debajo del estado  $S_2$  [Polívka 09b]. La presencia de estados intermedios entre el  $S_2$  y el  $S_1$  juega precisamente un papel determinante en la desactivación ultra rápida del estado  $S_2$  en carotenoides. En este sentido una evidencia clara de la aparición de estos estados intermedios al aumentar la longitud de cadena es el hallazgo de que para una serie de análogos de carotenoides de distinta longitud, la velocidad de desactivación del estado  $S_2$  al  $S_1$  disminuye al aumentar la longitud de cadena, como cabe esperar ya que aumenta la separación entre los niveles. Sin embargo, para longitudes mayores de 9 enlaces se invierte la tendencia cinética, pese a que la distancia  $S_2$ - $S_1$  continúa creciendo, lo que solo puede explicarse asumiendo que existe un estado intermedio que participa acelerando la desactivación [Kosumi 09].

En cuanto al estado  $S^*$ , su descripción es uno de los aspectos más controvertidos de la fotoquímica de los carotenoides, y sigue suscitando un intenso debate. Observado inicialmente en carotenoides de cadena larga por Andersson y Gillbro [Andersson 95] mediante técnicas de bombeo-sonda, el estado  $S^*$  ha sido identificado como un nivel vibracional sobreexcitado del estado fundamental, como un estado electrónico independiente [Gradinaru 01], como parte del espacio conformacional de los estados ya descritos [Christensson 09] y vuelto a reafirmar como una sobreexcitación del estado fundamental [Wohlleben 04]. La elucidación completa de este estado se ha convertido en una pieza clave para desentrañar la compleja estructura de los estados electrónicos excitados de los carotenoides, promoviendo gran cantidad de estudios en la última década, aprovechando el imparable avance de las técnicas bombeo-sonda y de las técnicas multipulso. Por una parte, los experimentos con espectroscopía bidimensional y bombeo-sonda llevados a cabo por Christensson y colaboradores [Christensson 09] parecen indicar que el estado  $S^*$  debe considerarse como un estado electrónico, en lugar de un estado vibracional excitado, aunque no se trataría de un nuevo estado, sino que se asociaría a una conformación alternativa, que aparecería en la superficie de energía potencial (PES) de todos los estados. El estado identificado como  $S^*$  correspondería, en concreto, a un cónformero del estado  $S_1$ . Teniendo en cuenta la diversidad conformacional de los carotenoides [Cerón-Carrasco 09a], esta explicación resulta altamente plausible. Lukes y colaboradores [Lukes 11] han apoyado este modelo mediante cálculos teóricos a nivel TD-DFT, que confirman la presencia de mínimos próximos en energía en los estados  $S_0$  y  $S_2$  para  $\beta$ -caroteno. En esta misma dirección apuntan los resultados de Pang et al. [Pang 09], que detectan dos cónformeros distintos del estado  $S_1$  en distintos apocarotenoides; a uno de los cónformeros se llega mediante la excitación directa  $S_0 \rightarrow S_1$ , con absorción bifotónica, y el otro se observa a partir de la relajación desde el estado  $S_2$ . Los resultados más recientes de Calhoun y colaboradores, también empleando espectroscopía bidimensional, apuntan, sin embargo, en la dirección opuesta, al sugerir que el estado  $S^*$  se identifica con estados vibracionales excitados del estado electrónico fundamental [Calhoun 12]. Otra perspectiva totalmente diferente es la dada por Ostroumov et al. [Ostroumov 11] como resultado de experimentos de bombeo-sonda, que descartan completamente la existencia de este estado  $S^*$ , sugiriendo que los picos que han dado lugar a su identificación pueden ser debidos a impurezas.

Ante la falta de acuerdo para la completa determinación de los estados electrónicos excitados de los carotenoides, las técnicas computacionales suponen un complemento esencial de las técnicas experimentales. En este sentido, uno de los aspectos teóricos más relevantes de los carotenoi-

des es la necesidad de incluir términos doblemente-excitados en el desarrollo CI de la función de onda y de usar métodos multireferenciales para describir adecuadamente algunos de estos estados excitados, tales como los  $2^1A_{1g}^-$  ( $S_1$ ),  $1^1B_{1u}^-$  y  $3^1A_{1g}^-$ , que han mostrado importantes contribuciones de estas dobles excitaciones en polienos [Kurashige 04] y en carotenoides [Kleinschmidt 09]. Los tratamiento CI y multireferenciales, sin embargo, imponen una alta demanda computacional para moléculas tan grandes como los carotenoides, lo que motivó inicialmente la realización de cálculos CI basados en métodos semiempíricos como MNDO-CI [Martin 98]. Afortunadamente, los recientes avances en las prestaciones computacionales y en los algoritmos y métodos de la química cuántica, han posibilitado la aparición de cálculos más sofisticados que permiten reproducir, con un excelente grado de acuerdo con los datos experimentales, la energía relativa de los distintos niveles que se indican en la Figura 6.1 en función del tamaño de la cadena conjugada, como es el caso de los cálculos DFT/MRCI llevados a cabo por Marian, Grimme y colaboradores [Kleinschmidt 09]. No obstante, aunque los cálculos puntuales se puedan realizar con una relativa eficacia, la ausencia por el momento de gradientes analíticos impide la exploración de las correspondientes superficies de energía potencial, cuya evaluación es clave, por ejemplo, para determinar completamente la naturaleza del estado  $S^*$ . Por otro lado, el estado excitado involucrado en la absorción monofotónica,  $1^1B_{1u}^+$  ( $S_2$ ), puede ser descrito adecuadamente con métodos que incluyan únicamente términos monoexcitados, como la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). En este caso sí se han desarrollado los gradientes analíticos [Furche 02, Scalmani 06], como los implementados en el programa Gaussian09 [Frisch 09], que permiten la optimización estructural en estados excitados de moléculas de tamaño medio. La mayor accesibilidad a la estructura de estados excitados mediante métodos TD-DFT queda reflejada claramente en la aparición de comparaciones sistemáticas de estructuras excitadas obtenidas mediante distintos funcionales, como la llevada a cabo recientemente por Guido, Knecht, Kongsted y Mennucci [Guido 13], que siguen la estela de estudios similares en el estado fundamental [Koch 01], o de comparaciones sistemáticas en función de datos espectroscópicos [Jacquemin 09, Jacquemin 12].

En esta Tesis abordamos el estudio de los estados que, en principio, pueden ser tratados con (TD)DFT. En el contexto actual del tratamiento de los estados excitados descrito más arriba, esto nos permite evaluar detenidamente la topología de la PES de los dos estados entre los que se produce el primer tránsito monofotónico permitido, mediante un método computacional asequible. Además, se sientan las bases para el tratamiento del resto de estados excitados de baja energía, para los que se requieren métodos computacionales más costosos que aún no permiten una exploración detallada de las PES. Concretamente, nos centramos en los estados  $S_0$  y  $S_2$ , aprovechando los avances en la implementación de las técnicas TD-DFT mencionadas en el párrafo anterior. Teniendo en cuenta además que las técnicas espectroscópicas suponen la herramienta fundamental con la que obtener información experimental de las PES, nuestro estudio se materializa precisamente en la simulación de espectros a partir de las PES calculadas, que se pueden comparar con los datos espectroscópicos experimentales. De esta manera, la estructura vibracional del estado fundamental se compara con la información que ofrecen las espectroscopías vibracional como IR y Raman, mientras que para sondear el estado excitado se recurre a espectros electrónicos con resolución vibracional. Cabe destacar en este sentido que entre los estados  $S_0$  y  $S_2$  se produce la banda de absorción más intensa en todos los carotenoides,

que aparece normalmente en la región del visible, que se asocia con un tránsito HOMO→LUMO, es decir, se puede identificar con una monoexcitación.

Resulta necesario entonces analizar los espectros de absorción experimentales de carotenoides. Como ya hemos comentado, en todos los casos la banda más intensa corresponde al tránsito  $1A_g^-(S_0) \rightarrow 1B_u^+(S_2)$ , y está normalmente caracterizada por un espectro vibracional bien resuelto a bajas temperaturas. Esta estructura vibracional se puede asignar a las progresiones de los modos que involucran tensiones C=C y C-C, donde la primera banda (etiquetada como 0-0) resulta ser la más intensa. A temperatura ambiente, la forma del espectro se ensancha significativamente, debido en principio al aumento de la población de los niveles excitados en los modos de baja frecuencia del estado electrónico inicial. Este ensanchamiento viene acompañado frecuentemente por el cambio de la intensidad relativa de las bandas, pasando la segunda banda (0-1) a ser la más intensa a temperatura ambiente. Este efecto se observa en carotenos y xantofilas, así como en carotenoides con extremo de cadena abierto o en anillo [Josue 02, Niedzwiedzki 06, Niedzwiedzki 07, Cong 08]. Como se ha discutido anteriormente, esta gran cantidad de información espectroscópica experimental supone una importante referencia para evaluar los resultados que proporcionan métodos teóricos para la simulación de espectros electrónicos con resolución vibracional. Estas comparaciones ofrecen, por tanto, una medida de la calidad de los métodos de evaluación de la energía, como (TD)DFT, y de los distintos enfoques para representar la PES, como la aproximación armónica. Asimismo, las simulaciones teóricas proporcionan un importantísimo complemento a los propios datos experimentales, permitiendo una mejor comprensión de los fenómenos físicos que originan las diferentes características del espectro, como, por ejemplo, el ensanchamiento con la temperatura.

## 6.2. DINÁMICA VIBRACIONAL

Los niveles vibracionales participan normalmente en los procesos de relajación y redistribución energética, por lo que su comprensión resulta fundamental en el caso de los carotenoides, cuya acción en distintos medios biológicos se basa en procesos de transferencia de energía. Conocer la dinámica vibracional resulta clave, además, para profundizar en el estudio espectral de los carotenoides. Con este objetivo, hemos realizado se realiza un análisis de modos normales de la molécula de  $\beta$ -caroteno en el estado fundamental, que nos sirve para introducir los distintos tratamientos que se pueden adoptar para desarrollar la función de potencial en la aproximación armónica.

Como ya hemos comentado, las técnicas espectroscópicas ofrecen una visión detallada de los eventos moleculares a escala atómica, y la información experimental que proporcionan puede emplearse por tanto para validar los cálculos vibracionales que hemos llevado a cabo, tal como describimos a continuación.

### 6.2.1. Detalles computacionales

En esta sección nos hemos centrado en la estructura más estable de  $\beta$ -caroteno, *all-trans,s-cis*, para realizar los análisis vibracionales armónicos. La estructura se optimiza a nivel B3LYP/6-31G(d) y, con ella, se ha calculado la Hessiana al mismo nivel. Todos los cálculos electrónicos se han realizado con el programa Gaussian09.

Los análisis vibracionales se han realizado de acuerdo con los técnicas presentadas en el Capítulo 4, calculando los espectros IR y Raman con métodos independientes del tiempo (TI). Los modos normales se han calculado tanto en coordenadas internas como en coordenadas Cartesianas y, para algunos modos, se ha En este sentido, terminamos este apartado comparando los espectros IR y Raman calculados con los experimentales disponibles. realizado un barrido a lo largo de los modos normales en función de cada uno de estos sistemas de coordenadas.

### 6.2.2. Análisis de modos normales

Comencemos pues con la descripción de los modos normales obtenidos para  $\beta$ -caroteno en coordenadas internas y coordenadas Cartesianas, con objeto de analizar la idoneidad de ambos enfoques, que serán de utilidad en la siguiente sección. Los modos normales se asocian a los vectores propios que diagonalizan la Hessiana que, en principio, tiene una dimensión de  $3N \times 3N$  (donde  $N$  es el número de átomos), de modo que se obtienen  $3N$  vectores propios, que corresponden a todos los modos, incluyendo traslación, rotación y vibración, que se encuentran, además, mezclados. Es posible separar de forma exacta los modos de vibración de los restantes modificando el sistema de coordenadas de forma que se satisfagan las llamadas condiciones de Eckart [Eckart 35, Sayvetz 39]. Esto es lo que se hace que es lo que se hace, por ejemplo, en el programa Gaussian [Ochterski 99], donde se define un marco de referencia en el que se cumplen estas las condiciones. El uso de coordenadas internas de valencia no-redundantes implica también el cumplimiento de las condiciones de Eckart, ya que la definición de la estructura con estas coordenadas está totalmente desacoplada de la traslación, que puede definirse mediante la posición del centro de masa, y la rotación, que puede definirse a partir de la rotación alrededor de los ejes principales de inercia, que es precisamente lo mismo que resulta de la aplicación de las condiciones de Eckart.

Para comprobar la equivalencia de estos dos enfoques, en la Tabla 6.1 se recogen los primeros valores propios obtenidos de la diagonalización de la Hessiana en tres sistemas de coordenadas diferentes: en coordenadas Cartesianas ponderadas en masa, en el marco de coordenadas de Eckart, realizado con Gaussian09, y en coordenadas internas de valencia, mediante el método GF. En esta tabla se muestran la frecuencias más bajas correspondientes a los  $3N$  valores propios de la diagonalización de la Hessiana completa en coordenadas Cartesianas ponderadas en masa, y las  $3N - 6$  frecuencias de vibración calculadas separando la traslación y vibración. En general, las frecuencias se asocian a la traslación y a la rotación en la diagonalización de la Hessiana completa son próximas a cero, aunque, en la práctica, “próximo a cero” puede concretarse en algunas decenas de  $\text{cm}^{-1}$  [Ochterski 99]. En nuestro caso, debido a la baja frecuencia de los modos de vibración de menor energía, se llega a una situación en la que entre los seis

**Tabla 6.1** – Frecuencias (en  $\text{cm}^{-1}$ ) de baja energía obtenidas para  $\beta$ -caroteno a partir de la diagonalización de la Hessiana en coordenadas Cartesianas ponderadas en masa (columna 1), la Hessiana en el marco de Eckart (columna 2) y calculadas en coordenadas internas de valencia con el método GF (columna 3). En la columna 4 se incluye la simetría de las vibraciones.

Cartesianas	Eckart	Valencia	Simetría
-1.295	–	–	–
-0.026	–	–	–
-0.005	–	–	–
0.006	–	–	–
0.872	–	–	–
6.219	6.219	6.219	$A_u$
10.126	10.126	10.126	$A_u$
11.406	–	–	–
13.894	13.886	13.886	$A_g$
15.519	15.519	15.519	$A_u$
24.449	24.312	24.312	$A_g$
27.853	27.853	27.853	$A_u$
35.334	35.159	35.159	$A_g$
42.370	42.370	42.370	$A_u$
45.562	45.555	45.555	$A_g$
53.800	53.798	53.798	$A_u$

autovalores más bajos encontramos uno de vibración, mientras que el octavo corresponde a un modo de rotación. La simple selección de los seis modos de menor frecuencia conduce por tanto a despreciar erróneamente un modo de vibración. Además, debido a la mezcla entre vibración y rotación que se produce en el cálculo de los modos normales en coordenadas Cartesianas, se observa que algunas frecuencias obtenidas en estas coordenadas se desvían ligeramente de las obtenidas cuando se separan las coordenadas internas (columnas 2 y 3), que sí que proporcionan los mismos valores, lo que está de acuerdo con la equivalencia entre ambos enfoques. Conviene destacar además que los modos que presentan diferencias entre las frecuencias obtenidas con la Hessiana en coordenadas Cartesianas o en coordenadas internas corresponden a vibraciones totalmente simétricas (simetría  $A_g$  en el grupo  $C_i$  al que pertenece la molécula). Podemos concluir entonces que los modos totalmente simétricos se acoplan con la rotación, mientras que los modos de simetría  $A_u$  no lo hacen. En transiciones electrónicas, este acoplamiento da lugar a los problemas asociados al efecto de rotación de ejes (*axis-switching effect*) [Ozkan 90] debido ya que no se podrá adoptar el marco de Eckart de forma simultánea en los dos estados, viéndose afectados, precisamente, los modos totalmente simétricos [Ozkan 90, Sando 01].

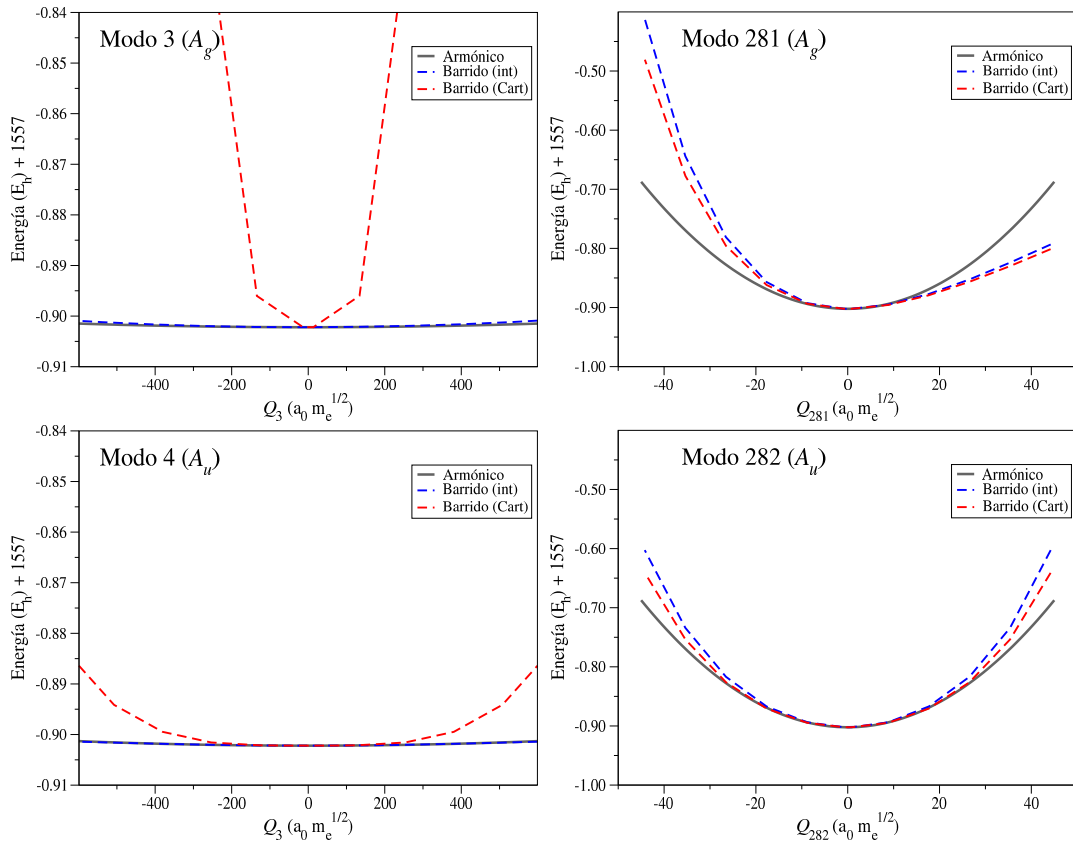
Pese a la equivalencia de las frecuencias dadas en las columnas 2 y 3 de la Tabla 6.1, los vectores propios están descritos en distintos sistemas de coordenadas: coordenadas Cartesianas (debidamente transformadas) en el caso 2 y coordenadas internas de valencia en el caso 3. Como consecuencia de ello, si bien los movimientos moleculares descritos por estos vectores



propios son equivalentes para desplazamientos infinitesimales, que es donde el desarrollo de los modos normales es estrictamente válido, pueden llegar a describir movimientos significativamente diferentes para desplazamientos grandes. En concreto, las discrepancias más significativas se observan en los modos de baja frecuencia que normalmente representan movimientos curvilíneos, como son las torsiones. Para entender el origen de estas diferencias habremos de reparar en que la descripción de los modos normales en función de otro conjunto de coordenadas (como Cartesianas o internas) es un desarrollo lineal (de primer orden) que solo es válido en torno al punto de referencia en el que se calcula la Hessiana inicialmente, y el rango en el que el desarrollo es aceptable depende de la capacidad del conjunto de coordenadas para representar el movimiento. De esta forma, en el caso de modos de torsión, las coordenadas Cartesianas (lineales) no pueden describir este movimiento sin provocar el alargamiento de enlaces, mientras que empleando coordenadas internas que incluyan los diedros asociados con la torsión, este movimiento queda descrito de forma natural en función de estos diedros.

Las diferencias en la descripción de los desplazamientos empleando coordenadas internas y Cartesianas queda reflejada también en los barridos a lo largo de los modos en cada marco de referencia. Para comprobarlo, en la Figura 6.2 se muestran los perfiles de dichos barridos para dos modos de baja frecuencia (modos 3 y 4: torsión, simétrica y antisimétrica, a lo largo de la cadena conjugada) y dos de alta frecuencia (modos 281 y 282: tensión, simétrica y antisimétrica, de C-H). En esta figura queda patente cómo, en el caso de los modos de torsión, los resultados obtenidos en coordenadas internas y Cartesianas difieren significativamente, obteniéndose una mayor curvatura en el segundo caso, como consecuencia de la tensión de enlaces que acompaña a la torsión en estas coordenadas. El barrido en coordenadas internas se acerca más a la curva cuadrática correspondiente a la constante de fuerza del modo de torsión aunque, en último término, para desplazamientos suficientemente grandes el barrido se aleja claramente de la parábola armónica, lo que se puede asociar a efectos anarmónicos o a las deficiencias que también pueden surgir en coordenadas internas para describir grandes desplazamientos de los modos. Por lo que respecta los modos de alta energía los perfiles de los barridos en coordenadas Cartesianas e internas son similares, lo que se relaciona con la naturaleza lineal de los modos de tensión, que permite que estos queden bien descritos en coordenadas Cartesianas. Cabe destacar además que los efectos anarmónicos son más notables en los modos de tensión, y el perfil resultante de los barridos se identifica con la forma asimétrica asociada a la tensión de enlaces. Así, en el caso simétrico (Modo 281), en el que los enlaces vibran en fase, se observa la típica curva asimétrica tipo Morse, mientras que en el caso antisimétrico (Modo 282), las vibraciones de los enlaces están desfasadas en  $180^\circ$ , por lo que el alargamiento de unos coincide con el acortamiento de otros, originando las curvas simétricas de la Figura 6.2.

Hasta ahora hemos mostrado las ventajas de las coordenadas internas de valencia a la hora de describir los modos normales. Podemos añadir el hecho de que estas coordenadas ofrecen una descripción de dichos modos que nos permite hacernos una idea de su *aspecto* sin necesidad de visualizar una animación del movimiento. Tal y como hemos comentado en el Capítulo 4, los modos normales constituyen la base sobre la que se realizan las asignaciones de las bandas de los espectros IR y Raman y, generalmente, se etiquetan de acuerdo al tipo de movimiento que involucran: tensiones de enlace, flexiones de ángulo, torsiones ... La importancia de estas asignaciones reside en que permiten identificar modos similares en moléculas distintas que tengan



**Figura 6.2** – Barrido de energía a lo largo de dos modos normales de  $\beta$ -caroteno de baja frecuencia (3 y 4) y dos de alta frecuencia (281 y 282) descritos con coordenadas internas y Cartesianas. El potencial armónico asociado a la constante de fuerza del modo en cuestión se muestra como referencia. Los rangos mostrados para cada modo normal corresponden a iguales desplazamientos adimensionales.

elementos estructurales comunes, lo que da pie a analizar los distintos efectos electrónicos que afectan, por ejemplo, a la fortaleza de los enlaces, relacionados con los modos de tensión de enlace. En este sentido, los análisis de los modos en coordenadas internas ofrecen, directamente, la contribución de las coordenadas internas (distancia de enlace, ángulo y diedro) a cada modo normal mediante la expresión:

$$\mathbf{Q} = \mathbf{L}^{-1}\mathbf{S} \quad (6.1)$$

donde  $\mathbf{Q}$  son las coordenadas normales,  $\mathbf{S}$  las coordenadas internas y  $\mathbf{L}$  la matriz de transformación correspondiente. Las filas de la matriz  $\mathbf{L}^{-1}$  proporcionan directamente las contribuciones de cada coordenada interna a un modo normal dado. Para caracterizar el movimiento del modo normal resulta más útil, sin embargo, utilizar al desplazamiento de las coordenadas internas al movernos a lo largo de los distintos modos normales, según la ecuación:

$$\Delta\mathbf{S} = \mathbf{L}\Delta\mathbf{Q} \quad (6.2)$$

que indica directamente las coordenadas internas involucradas en el desplazamiento del modo  $k$ , seleccionando un desplazamiento  $\Delta\mathbf{Q}$ , tal que el elemento  $\Delta Q_j = \delta_{jk}$ . Siguiendo este razonamiento, las contribuciones de las coordenadas internas vienen dadas por la columna  $k$  de la matriz  $\mathbf{L}$ . Hay que tener en cuenta que, si las coordenadas internas fueran ortogonales, las descripciones ofrecidas por las ecuaciones (6.1) y (6.2) serían idénticas. La no ortogonalidad de estas coordenadas implica, sin embargo, que, en general,  $\mathbf{L}^{-1} \neq \mathbf{L}^T$ , por lo que debemos elegir una de las dos estrategias que, en nuestro caso es la segunda.

Veamos entonces como se aplica esta metodología para analizar algunos modos de vibración de  $\beta$ -caroteno. Para usar las coordenadas internas hay que escoger, en primer lugar, un conjunto de coordenadas no redundantes que, en nuestro caso, obtenemos construyendo la matriz  $Z$  del sistema. Cuando existen elementos de simetría, es posible usar además las coordenadas internas simétricas equivalentes, que es el procedimiento que se ha seguido en este trabajo. Estas coordenadas tienen la ventaja de que los elementos equivalentes de cada columna de la matriz  $\mathbf{L}$  permiten averiguar la simetría. En nuestro caso, la molécula pertenece al grupo de puntual de simetría  $C_i$ , y las vibraciones pueden tener simetría  $A_g$  o  $A_u$ . Para saber a que representación corresponde cada modo, nos fijamos en las coordenadas correspondientes a las tensiones de enlace, de forma que si dos enlaces equivalentes vibran en fase, el modo pertenece a la representación totalmente simétrica y, si no lo hacen, entonces el modo pertenece contrario a la antisimétrica. En concreto, para un modo  $k$  tenemos que  $L_{ik} = \delta L_{i'k}$  (siendo  $i$  e  $i'$  las distancias de enlace equivalentes), donde  $\delta$  toma el valor 1 para las vibraciones de simetría  $A_g$  y -1 para las de simetría  $A_u$ .

En la Tablas 6.2 y 6.3 se presentan los resultados obtenidos utilizando las coordenadas internas para los modos seleccionados de  $\beta$ -caroteno, que son dos de baja frecuencia (modos 3 y 4) y dos de alta frecuencia (modos 281 y 282), incluyendo las coordenadas internas que se ven más desplazadas. En las tablas se han separado los modos de acuerdo con la simetría, de forma que en la Tabla 6.2 se incluyen los modos de simetría  $A_g$  (3 y 281) y en la Tabla 6.3 los de simetría  $A_u$  (4 y 282).

**Tabla 6.2** – Descripción de dos modos de vibración  $A_g$  de  $\beta$ -caroteno en función de los desplazamientos más significativos que ocurren en las coordenadas internas al movernos a lo largo del modo normal, dados por los elementos matriciales  $L_{i,Modo}$  (siendo  $i$  la coordenada interna). En las últimas columnas se da la contribución relativa de cada coordenada interna calculada directamente e incluyendo los factores de ponderación (véase texto).

Coordenada interna	$L_{i,Modo}$	Contrib(%)	ContribCorr(%)
Mode 3			
H <sub>7</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	$-1.68 \times 10^{-4}$	4.155	3.757
H <sub>7'</sub> -C <sub>7'</sub> -C <sub>6'</sub> -C <sub>1'</sub>	$1.68 \times 10^{-4}$	4.155	3.757
H <sub>7</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	$-1.63 \times 10^{-4}$	4.026	3.641
H <sub>7'</sub> -C <sub>7'</sub> -C <sub>6'</sub> -C <sub>5'</sub>	$1.63 \times 10^{-4}$	4.026	3.641
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub>	$-1.44 \times 10^{-4}$	3.558	3.217
C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>8'</sub> -C <sub>7'</sub>	$1.44 \times 10^{-4}$	3.558	3.217
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8</sub>	$-1.16 \times 10^{-4}$	2.873	2.597
C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>8'</sub> -H <sub>8'</sub>	$1.16 \times 10^{-4}$	2.873	2.597
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub> -C <sub>11</sub>	$-1.04 \times 10^{-4}$	2.564	2.318
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>12'</sub> -C <sub>11'</sub>	$1.04 \times 10^{-4}$	2.564	2.318
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>19</sub> -H <sub>19a</sub>	$9.76 \times 10^{-5}$	2.414	2.183
C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>19'</sub> -H <sub>19a'</sub>	$-9.76 \times 10^{-5}$	2.414	2.183
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>20</sub> -H <sub>20a</sub>	$9.54 \times 10^{-5}$	2.361	2.135
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>20'</sub> -H <sub>20a'</sub>	$-9.54 \times 10^{-5}$	2.361	2.135
H <sub>11</sub> -C <sub>11</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub>	$-9.24 \times 10^{-5}$	2.286	2.067
H <sub>11'</sub> -C <sub>11'</sub> -C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub>	$9.24 \times 10^{-5}$	2.286	2.067
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>20</sub> -H <sub>20b</sub>	$6.58 \times 10^{-5}$	1.628	1.472
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>20'</sub> -H <sub>20b'</sub>	$-6.58 \times 10^{-5}$	1.628	1.472
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>20</sub> -H <sub>20c</sub>	$6.57 \times 10^{-5}$	1.625	1.469
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>20'</sub> -H <sub>20c'</sub>	$-6.57 \times 10^{-5}$	1.625	1.469
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub> -H <sub>12</sub>	$-6.15 \times 10^{-5}$	1.522	1.376
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>12'</sub> -H <sub>12'</sub>	$6.15 \times 10^{-5}$	1.522	1.376
C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>19</sub> -H <sub>19b</sub>	$6.13 \times 10^{-5}$	1.516	1.371
C <sub>8'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>19'</sub> -H <sub>19b'</sub>	$-6.13 \times 10^{-5}$	1.516	1.371
C <sub>8</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>19</sub> -H <sub>19c</sub>	$6.10 \times 10^{-5}$	1.509	1.364
C <sub>8'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>19'</sub> -H <sub>19c'</sub>	$-6.10 \times 10^{-5}$	1.509	1.364
C <sub>15</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub>	$4.96 \times 10^{-5}$	1.226	1.109
C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>12'</sub>	$-4.96 \times 10^{-5}$	1.226	1.109
H <sub>11</sub> -C <sub>11</sub> -C <sub>10</sub> -H <sub>10</sub>	$-4.26 \times 10^{-5}$	1.055	1.026
H <sub>11'</sub> -C <sub>11'</sub> -C <sub>10'</sub> -H <sub>10'</sub>	$4.26 \times 10^{-5}$	1.055	1.026
Mode 281			
C <sub>11</sub> -H <sub>11</sub>	$1.68 \times 10^{-2}$	28.159	25.035
C <sub>11'</sub> -H <sub>11'</sub>	$1.68 \times 10^{-2}$	28.159	25.035
C <sub>19</sub> -H <sub>19a</sub>	$2.90 \times 10^{-3}$	4.857	4.318
C <sub>19'</sub> -H <sub>19a'</sub>	$2.90 \times 10^{-3}$	4.857	4.318

**Tabla 6.3** – Descripción de dos modos de vibración  $A_u$  de  $\beta$ -caroteno en función de los desplazamientos más significativos que ocurren en las coordenadas internas al movernos a lo largo del modo normal, dados por los elementos matriciales  $L_{i,Modo}$  (siendo  $i$  la coordenada interna). En las últimas columnas se da la contribución relativa de cada coordenada interna calculada directamente e incluyendo los factores de ponderación (véase texto).

Coordenada interna	$L_{i,Modo}$	Contrib(%)	ContribCorr(%)
Modo 4			
H <sub>7</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	$1.54 \times 10^{-4}$	5.040	4.369
H <sub>7'</sub> -C <sub>7'</sub> -C <sub>6'</sub> -C <sub>1'</sub>	$1.54 \times 10^{-4}$	5.040	4.369
H <sub>7</sub> -C <sub>7</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>5</sub>	$1.52 \times 10^{-4}$	4.969	4.308
H <sub>7'</sub> -C <sub>7'</sub> -C <sub>6'</sub> -C <sub>5'</sub>	$1.52 \times 10^{-4}$	4.969	4.308
H <sub>15</sub> -C <sub>15</sub> -C <sub>14</sub> -H <sub>14</sub>	$6.29 \times 10^{-5}$	2.060	1.785
H <sub>15'</sub> -C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub> -H <sub>14'</sub>	$6.29 \times 10^{-5}$	2.060	1.785
H <sub>11</sub> -C <sub>11</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub>	$6.11 \times 10^{-5}$	2.000	1.734
H <sub>11'</sub> -C <sub>11'</sub> -C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub>	$6.11 \times 10^{-5}$	2.000	1.734
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -C <sub>7</sub>	$5.84 \times 10^{-5}$	1.911	1.657
C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>8'</sub> -C <sub>7'</sub>	$5.84 \times 10^{-5}$	1.911	1.657
H <sub>11</sub> -C <sub>11</sub> -C <sub>10</sub> -H <sub>10</sub>	$5.82 \times 10^{-5}$	1.904	1.651
H <sub>11'</sub> -C <sub>11'</sub> -C <sub>10'</sub> -H <sub>10'</sub>	$5.82 \times 10^{-5}$	1.904	1.651
C <sub>10</sub> -C <sub>9</sub> -C <sub>8</sub> -H <sub>8</sub>	$5.22 \times 10^{-5}$	1.709	1.482
C <sub>10'</sub> -C <sub>9'</sub> -C <sub>8'</sub> -H <sub>8'</sub>	$5.22 \times 10^{-5}$	1.709	1.482
H <sub>15</sub> -C <sub>15</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub>	$4.96 \times 10^{-5}$	1.623	1.407
H <sub>15'</sub> -C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub>	$4.96 \times 10^{-5}$	1.623	1.407
C <sub>15</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub>	$4.66 \times 10^{-5}$	1.525	1.322
C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>12'</sub>	$4.66 \times 10^{-5}$	1.525	1.322
C <sub>14</sub> -C <sub>15</sub> -C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub>	$4.57 \times 10^{-5}$	1.498	1.298
C <sub>15</sub> -C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>20</sub>	$4.24 \times 10^{-5}$	1.387	1.202
C <sub>15'</sub> -C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>20'</sub>	$4.24 \times 10^{-5}$	1.387	1.202
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> -H <sub>18c</sub>	$-3.84 \times 10^{-5}$	1.257	1.089
C <sub>4'</sub> -C <sub>5'</sub> -C <sub>18'</sub> -H <sub>18c'</sub>	$-3.84 \times 10^{-5}$	1.257	1.089
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> -H <sub>18b</sub>	$-3.51 \times 10^{-5}$	1.150	0.997
C <sub>4'</sub> -C <sub>5'</sub> -C <sub>18'</sub> -H <sub>18b'</sub>	$-3.51 \times 10^{-5}$	1.150	0.997
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> -H <sub>18a</sub>	$-3.44 \times 10^{-5}$	1.125	0.975
C <sub>4'</sub> -C <sub>5'</sub> -C <sub>18'</sub> -H <sub>18a'</sub>	$-3.44 \times 10^{-5}$	1.125	0.975
C <sub>14</sub> -C <sub>13</sub> -C <sub>12</sub> -H <sub>12</sub>	$3.22 \times 10^{-5}$	1.053	0.912
C <sub>14'</sub> -C <sub>13'</sub> -C <sub>12'</sub> -H <sub>12'</sub>	$3.22 \times 10^{-5}$	1.053	0.912
C <sub>14</sub> -C <sub>15</sub> -C <sub>15'</sub> -H <sub>15'</sub>	$3.10 \times 10^{-5}$	1.014	0.879
C <sub>14'</sub> -C <sub>15'</sub> -C <sub>15</sub> -H <sub>15</sub>	$3.10 \times 10^{-5}$	1.014	0.879
Modo 282			
C <sub>11</sub> -H <sub>11</sub>	$1.68 \times 10^{-2}$	28.014	24.949
C <sub>11'</sub> -H <sub>11'</sub>	$-1.68 \times 10^{-2}$	28.014	24.949
C <sub>19</sub> -H <sub>19a</sub>	$2.90 \times 10^{-3}$	4.833	4.304
C <sub>19'</sub> -H <sub>19a'</sub>	$-2.90 \times 10^{-3}$	4.833	4.304

Un primer vistazo a estas tablas deja clara la gran diferencia que hay entre los modos de baja y alta frecuencia, independientemente de la simetría. Mientras que el modo de alta energía está localizado en unas pocas tensiones de enlace, los modos de baja frecuencia involucran un gran número de torsiones a lo largo de la cadena conjugada, lo que dificulta su asignación en términos de los movimientos internos, como ocurre también al visualizar la animación de los modos. Esto indica que los movimientos asociados a los modos de baja frecuencia son complejos, conllevando un movimiento colectivo a lo largo de la cadena, y pueden no estar tan bien descritos en términos del conjunto limitado de diedros correspondiente a la matriz  $\mathbf{Z}$  que se emplea para elegir las coordenadas no redundantes. Por ejemplo, la torsión alrededor de un enlace implica la rotación, en la misma dirección, de todos los diedros asociados a dicho enlace aunque, en general, no todos estarán incluidos en el conjunto de no redundante de coordenadas internas.

Por lo que respecta a la simetría, hemos escogido en cada caso modos próximos en frecuencia, es decir los modos 3 y 4 y los modos 281 y 282, y, podemos comprobar que se trata, aproximadamente, del movimiento de las mismas coordenadas internas, aunque con simetría distinta. Observamos de esta forma que los modos de baja energía está asociados, a la torsión alrededor de los enlaces  $C_6-C_7$  y  $C_{6'}-C_{7'}$ , que rotan en direcciones opuestas en el modo 3 y en la misma dirección en el modo 4, lo que determina la simetría de cada vibración. Los modos de alta frecuencia, por su parte, se asocian, principalmente, a la tensión de los enlaces  $C_{11}-H_{11}$  y  $C_{11'}-H_{11'}$ , que oscilan en fase en el modo 281 y desfasados en el modo 282.

Antes de dar por finalizada esta discusión, analizamos las contribuciones relativas de cada coordenada interna, que también hemos incluido en las Tablas 6.2 y 6.3. Estas contribuciones han sido calculadas como la fracción del valor absoluto del elemento  $L_{jk}$  respecto a la entre la suma de los valores absolutos de todos los elementos de la columna  $k$ , de decir:

$$\text{Contrib}[S_j \text{ en } Q_j](\%) = \frac{L_{jk}}{\sum_i L_{jk}} \times 100 \quad (6.3)$$

Otra posibilidad consiste en emplear los cuadrados de los elementos, como se hace en los procesos de normalización, si bien la no ortogonalidad de las coordenadas internas impide una interpretación física razonable. Hemos de tener en cuenta además que los elementos de la matriz  $\mathbf{L}$  tienen unidades que dependen del tipo de coordenada interna a la que están asociados, que puede ser una coordenada de tensión (unidades:  $[\text{MASA}]^{-1/2}$ ) o una coordenadas angulares (unidades:  $[\text{ANG}][\text{DIST}]^{-1}[\text{MASA}]^{-1/2}$ ), por lo que la elección de las coordenadas afectará al cálculo de las contribuciones.

Para abordar esta situación analizamos el significado de los elementos de la matriz  $\mathbf{L}$  más detenidamente. Sus valores se han calculado empleando unidades atómicas, es decir,  $[\text{MASA}]^{-1/2} \equiv m_e^{1/2}$  y  $[\text{ANG}][\text{DIST}]^{-1}[\text{MASA}]^{-1/2} \equiv \text{rad } a_0^{-1} m_e^{1/2}$ , donde  $m_e$  es la masa del electrón, rad indica radianes y  $a_0$  es el radio de Bohr. Los valores de la Tablas 6.2 y 6.3 se corresponden por tanto a los desplazamientos de cada distancia de enlace, en Bohr ( $a_0$ ), y cada ángulo, en radianes, cuando el valor del modo normal cambia en una unidad, de  $a_0 m_e^{1/2}$ . Por ejemplo, cuando  $\Delta Q_3 = 1 a_0 m_e^{1/2}$ , el diedro  $H_7-C_7-C_6-C_1$  se desplaza en  $-1.68 \times 10^{-4}$  radianes, y cuando  $\Delta Q_{281} = 1 a_0 m_e^{1/2}$ , el enlace  $C_{11}-H_{11}$  se alarga en  $1.68 \times 10^{-2}$  Bohr. Para poder comparar directamente ángulos y enlaces hemos de asegurarnos de que sus variaciones unitarias sean equivalentes, para lo que podemos

calcular el desplazamiento estructural, en términos de distancia interatómica, que se produce en cada caso, que resulta ser:

$$u_{r_b} = \Delta b = 1 \quad (6.4a)$$

$$u_{r_a} = b\Delta\alpha = b \quad (6.4b)$$

$$u_{r_d} = -b \cos(\alpha)\Delta\theta = -b \cos(\alpha) \quad (6.4c)$$

donde  $u_b$ ,  $u_{r_a}$  y  $u_{r_d}$  son los desplazamientos unitarios asociados a los desplazamientos de enlaces, ángulos y diedros, respectivamente,  $b$  es la distancia de enlace,  $\Delta b$ ,  $\Delta\alpha$  y  $\Delta\theta$  son los valores de estos desplazamientos que se igualan a la unidad,  $b$  es la distancia de enlace entre los átomos que determinan las coordenadas internas, y  $\alpha$  es el ángulo que forman.

Obviamente, los valores que determinan los desplazamientos unitarios,  $b$  y  $\alpha$ , varía a lo largo de la molécula. Sin embargo, para establecer la comparación podemos elegir valores promedio de estas magnitudes. Así, para la distancia de enlace tomamos un valor de  $2.3a_0$  y para el ángulo un valor de  $110^\circ \approx 1.9$  rad. Las variaciones unitarias quedan entonces como sigue:

$$u_{r_b} = 1,0a_0$$

$$u_{r_a} \approx 2,3a_0$$

$$u_{r_d} \approx 0,8a_0$$

Una variación de un radián en un ángulo supone por tanto un desplazamiento estructural de aproximadamente el doble con respecto a la variación en una distancia de enlace de un bohr, que a su vez es similar a la variación de un radian en un diedro. A la hora de establecer las contribuciones a los modos, las variaciones estructurales unitarias se pueden incluir como un término de ponderación a los elementos  $L_{ik}$ , dependiendo del tipo de coordenada interna con el que estén relacionados. En las Tablas 6.2 y 6.3, se ha incluido la contribución de las coordenadas internas calculada directamente con la Ecuación 6.3 (Contrib), y añadido los factores de ponderación  $u_{r_b}$ ,  $u_{r_a}$  y  $u_{r_d}$  (ContribCorr), observándose en ambos casos resultados similares. Este se debe a que en los modos normales están descritos por un solo tipo de coordenada interna (diedros en los modos 3 y 4, y distancias de enlace en los 281 y 282), de forma que, al corresponderles el mismo factor de ponderación, apenas se observan cambios. Las mayores diferencias cabe esperarlas en modos en los que se mezclen distintos tipos de coordenadas.

### 6.2.3. Espectros IR y Raman de $\beta$ -caroteno

Para acabar esta sección, se simulan los espectros IR y Raman de la molécula de  $\beta$ -caroteno, que pueden compararse directamente con los espectros experimentales, lo que permite validar el método de cálculo empleado para analizar las vibraciones. Para ello se emplea la metodología TI a 0K junto con el modelo armónico y la aproximación de primer orden para la variación momento dipolar de transición con las coordenadas. Bajo estas premisas, las reglas de selección vibracionales solo permiten las transiciones en las que únicamente cambie el número cuántico de

uno de los modos de vibración en una unidad [Requena 04]. Teniendo en cuenta además que se simula el espectro a 0 K, es decir, que solo consideramos poblado el nivel fundamental, el espectro consistirá simplemente en las transiciones  $0 \rightarrow 1$  de cada modo, cuya energía se corresponde con la frecuencia armónica calculada, y cuya intensidad, para los tránsito IR y Raman, vienen dadas por las propiedades las probabilidades de transición correspondiente, que dependen del momento dipolar,  $\langle \psi'_v | \boldsymbol{\mu} | \psi_v \rangle$ , en IR, y de la polarizabilidad,  $\langle \psi'_v | \boldsymbol{\alpha} | \psi_v \rangle$ , para Raman.

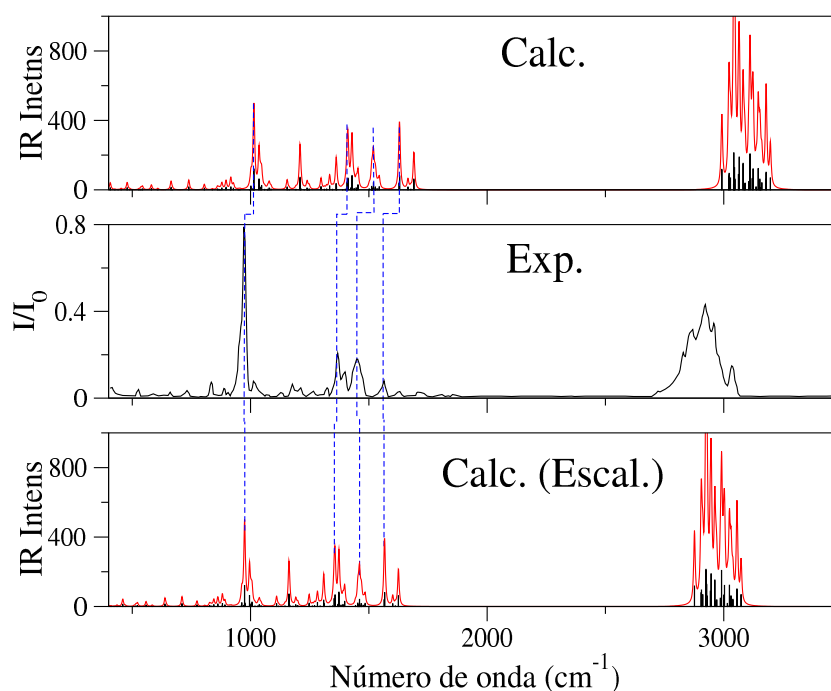
La asignación de las bandas de los espectros IR y Raman de la molécula de  $\beta$ -caroteno ya ha sido abordada en trabajos previos del grupo de investigación [Cerón-Carrasco 09b, Requena 08] y que han servido, entre otras cosas, para identificar B3LYP/6-31G(d) como el nivel de cálculo más adecuado dentro del marco de la Teoría del Funcional de la Densidad, para el tratamiento teórico de la molécula de  $\beta$ -caroteno, además de poner de manifiesto la utilidad de las técnicas vibracionales para diferenciar los distintos isómeros estructurales de un carotenoide [Cerón-Carrasco 10a]. En el presente estudio, sin embargo, nos centramos en evaluar la calidad de las superficies de energía potencial calculadas, comparando los espectros simulados con los experimentales. Para ello, realizamos las comparaciones frente a los espectros IR y Raman infrarrojo lo que, debido a las diferentes reglas de selección de cada una de las técnicas, nos permite evaluar por separado los modos de simetría  $A_g$  y los de simetría  $A_u$ . Concretamente, en el caso de moléculas pertenecientes al grupo puntual  $C_i$ , las vibraciones  $A_u$  son activas en IR y no aparecen en Raman, y lo contrario ocurre para los modos  $A_g$ , lo que indica la complementariedad de ambas técnicas.

En la Figura 6.3 se muestra el espectro IR experimental de  $\beta$ -caroteno tomado de Wiley Subscription Services a través del portal SciFinder (espectro número MICC-89781-801K) junto con el espectro calculado a nivel B3LYP/6-31G(d). Generalmente, las frecuencias armónicas calculadas con métodos DFT y *ab initio* suelen corregirse multiplicándolas por un factor de escala que da cuenta de los errores del método y de los efectos anarmónicos [Rauhut 95]. Estos factores de escala son generalmente menores de la unidad y se han obtenido empíricamente enfrentando los valores calculados frente a los experimentales para un grupo suficientemente amplio de moléculas. Para el caso del método B3LYP/6-31G(d), el valor ajustado para este factor es de 0.9613 [Scott 96, Foresman 96].

En la Figura 6.4, a su vez, se muestra el espectro Raman experimental medido por Gozález-González [González González 12] junto con los espectros simulados empleando las frecuencias armónicas y las escaladas con el mismo factor que en el caso de los espectros IR. Se comprueba nuevamente cómo el escalado empírico resulta en posiciones de las bandas muy próximas a las experimentales.

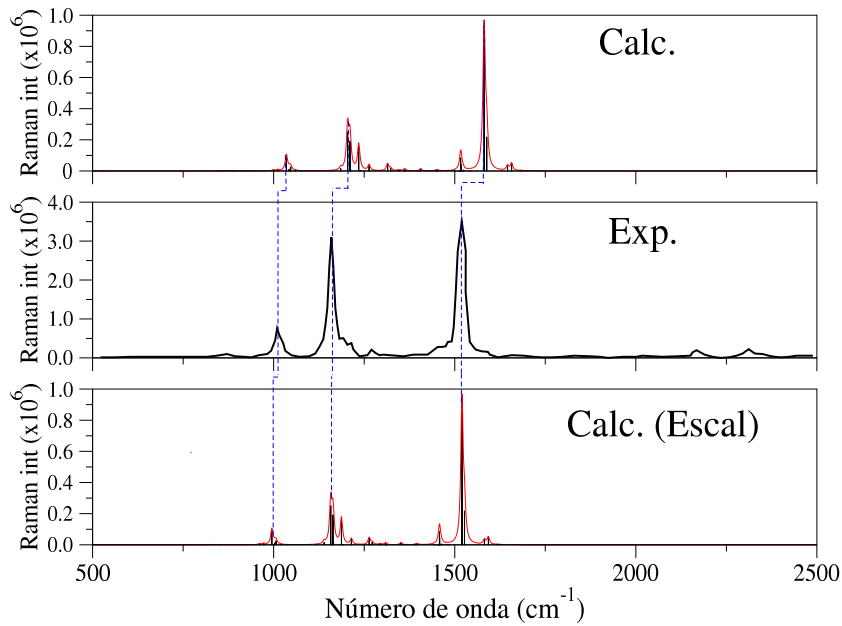
Como podemos apreciar, los factores de escala corrigen perfectamente las frecuencias armónicas proporcionando valores muy similares a los experimentales, tanto en IR como en Raman. Como ya hemos comentado, estos factores dan cuenta, en general, de los errores del método y los efectos de anarmonicidad. Consideramos finalmente hasta que punto las correcciones de anarmonicidad pueden ser importantes en nuestro caso. Una posible estrategia para el cálculo de las frecuencias anarmónicas se consiste en extender el tratamiento armónico, realizando la diferenciación a lo largo de los modos para calcular la frecuencia armónica. Nos centramos en dos modos que proporcionan transiciones intensas en IR y Raman, respectivamente, ya que uno



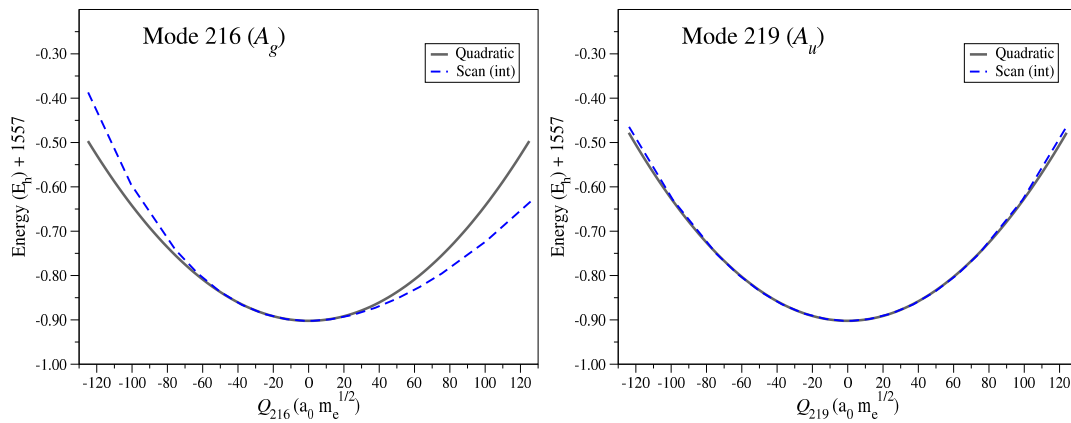


**Figura 6.3** – Espectro IR correspondiente al isómero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno. En el panel central se muestra el espectro experimental, mientras que en los paneles superior e inferior se incluyen los espectros simulados a partir de las frecuencias calculadas directamente (arriba) y aplicando el factor de escala correspondiente (abajo). Las líneas verticales comparan la posición de algunas de las bandas.

de los aspectos más relevante de disponer de datos IR y Raman, es que nos permite analizar de forma separada los modos simétricos de los antisimétricos. En concreto, seleccionamos los modos 216 ( $A_g$ , activo en Raman) y 219 ( $A_u$ , activo en IR). Como hemos observado en la Figura 6.2, los modos  $A_u$  tienen un potencial simétrico, como cabe esperar de los modos no totalmente simétricos [Requena 04], mientras que los modos  $A_g$  originaran, en general, un potencial asimétrico. Esto es lo que se observa para los modos seleccionados aquí, como se observa en la Figura 6.5, por lo que no cabe esperar que los efectos de anarmonicidad sean iguales para los dos modos, aunque en ambos casos el mismo factor de corrección empírico conduce a valores próximos a los experimentales, lo que indica que este factor debe dar cuenta, principalmente, de las deficiencias del cálculo teórico, y no del modelo armónico.



**Figura 6.4** – Espectro Raman correspondiente al isómero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno. En el panel central se muestra el espectro experimental, mientras que en los paneles superior e inferior se incluyen los espectros simulados a partir de las frecuencias calculadas directamente (arriba) y aplicando el factor de escala correspondiente (abajo). Las líneas verticales comparan la posición de algunas de las bandas.

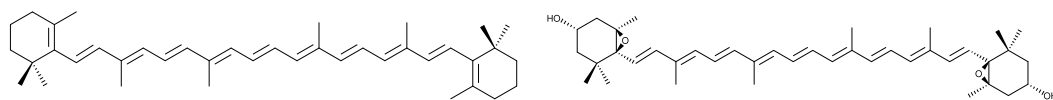


**Figura 6.5** – Barrido de energía a lo largo de dos modos normales de  $\beta$ -caroteno de baja frecuencia (3 y 4) y dos modos de alta frecuencia (281 y 282) descritos con coordenadas internas y Cartesianas. El potencial armónico asociado a la constante de fuerza del modo en cuestión se muestra como referencia. Los rangos mostrados para cada modo normal corresponden a iguales desplazamientos adimensionales.

### 6.3. ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA CON RESOLUCIÓN VIBRACIONAL

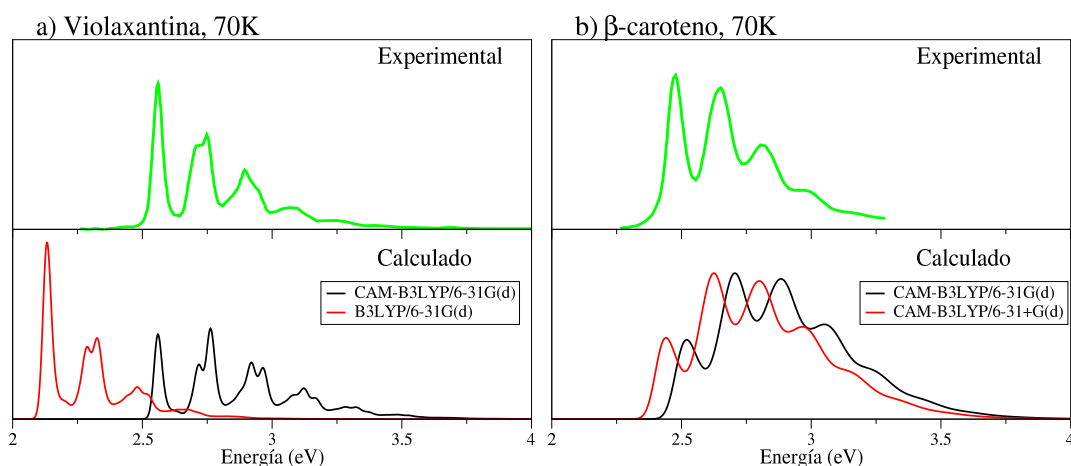
En esta sección se presentan las simulaciones de los espectro de  $\beta$ -caroteno y violaxantina, correspondientes a la banda asociada a la transición  $S_0 \rightarrow S_2$ , a dos temperaturas distintas: 77 K y 300 K. Para ello se han empleado las técnicas independientes (TI) y dependientes del tiempo (TD) que se han descrito en el Capítulo 4, adoptando además distintos modelos dentro de la aproximación armónica para describir los modos normales en los estados inicial y final de la transición, así como su relación mediante la transformación de Duschinsky. En concreto, se emplean los modelos de Hessiana adiabática (AH) y Hessiana vertical (VH). En el caso AH, los modos normales se definen en función de dos sistemas de coordenadas: coordenadas Cartesianas y coordenadas internas de valencia, que incluyen longitudes de enlace, ángulos y diedros, mientras que para VH se hace uso únicamente de las coordenadas Cartesianas.

Los sistemas analizados, que incluyen tres confórmeros de  $\beta$ -caroteno y uno de violaxantina, Figura 6.6, cubre un rango amplio de diferencias estructurales entre los estados inicial y final del tránsito, que resulta ser un factor extremadamente relevante en lo que respecta a la validez de los modelos armónicos. Así, los resultados con los distintos modelos planteados permiten evaluar su idoneidad en función de estos cambios estructurales. En este sentido, en el modelo AH se relacionan los modos normales definidos en los mínimos de las estructuras inicial y final, por lo que, en los casos en los que los desplazamientos estructurales son grandes, las coordenadas Cartesianas, aplicadas junto con los modelos AH, pueden resultar problemáticas debido a que, por su naturaleza lineal, no son adecuadas para definir los desplazamientos curvilíneos. Las coordenadas internas ha sido postulado por diversos autores como una alternativa muy adecuada en estos casos ya que pueden describir movimientos intramoleculares de forma más natural. No obstante, el uso de coordenadas internas lleva aparejado algunos problemas relacionados, precisamente, con su naturaleza curvilínea que da lugar a relaciones no ortogonales entre los modos normales de los estados inicial y final, impidiendo el uso de las implementaciones TI y TD convencionales. Por otro lado, los modelos VH, en los que se relacionan los modos normales definidos en un mismo punto, pueden también remediar los problemas de la aplicación de coordenadas Cartesianas con un modelo AH.



**Figura 6.6** – Estructuras moleculares de los dos carotenoides para los que se simula el espectro electrónico con resolución vibracional:  $\beta$ -caroteno (izquierda) y violaxantina (derecha).

Con el fin de aclarar que enfoque es más adecuado en el caso de los carotenoides, en este apartado describimos los resultados obtenidos con cada modelo, en la simulación de la estructura vibrónica de la banda de absorción correspondiente al tránsito  $S_0 \rightarrow S_2$  para distintos isómeros conformacionales de  $\beta$ -caroteno y violaxantina. Además, analizamos en detalle las posibles anomalías que puedan encontrarse debido a las limitaciones de cada método, para identificar el rango de aplicación de cada uno de ellos.

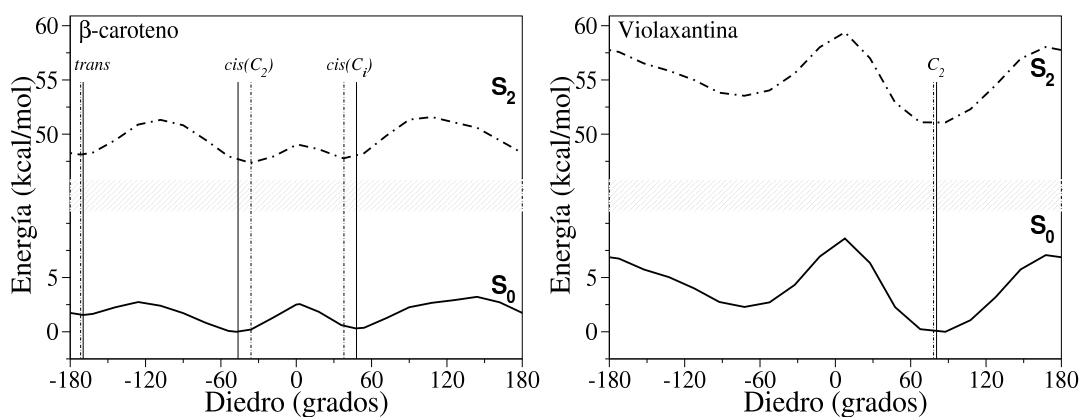


**Figura 6.7** – Espectros experimentales de (a) violaxantina [Cong 08] y (b)  $\beta$ -caroteno [Jailaubekov 11], junto con los espectros simulados con el modelo AH empleando las PESs calculadas con diferentes métodos TD(DFT): (a) B3LYP y CAM-B3LYP junto con la base 6-31G(d) y (b) las bases 6-31G(d) y 6-31+G(d), con el funcional CAM-B3LYP. Para cada compuesto, la intensidad de los espectros se ha ajustado para igualar la altura de la segunda.

### 6.3.1. Detalles computacionales

Las superficies de energía potencial (PESs) de los estados fundamental y excitado se han evaluado por medio de cálculos DFT y TD-DFT, respectivamente. Para determinar el funcional y la base más adecuados para realizar las simulaciones, se han llevado a cabo algunos cálculos preliminares empleando tanto los funcionales híbridos B3LYP y CAM-B3LYP, junto con las bases de Pople 6-31G(d) y 6-31+G(d). Hay que tener en cuenta que, si bien los gradientes analíticos para los métodos TD se encuentran implementados en el programa Gaussian09, que ha sido empleado para la realización de estos cálculos, las segundas derivadas deben obtenerse de forma numérica, con el consiguiente aumento del coste computacional. Esto impone una limitación clara a la hora de realizar el calibrado previo para identificar el funcional DFT que mejor se adapta a nuestro problema, por lo que nos conformamos con evaluar los dos antes mencionados que, por otro lado, son ampliamente utilizados en cálculos de este tipo, proporcionando resultados aceptables tanto en para las energías de excitación [Jacquemin 12] como en las geometrías optimizadas en el estado excitado [Guido 13], de acuerdo con recientes comparaciones sistemáticas realizadas sobre un amplio conjunto de funcionales.

Hemos calculado por tanto, en concreto los espectros de los tres isómeros de  $\beta$ -caroteno y el de violaxantina, empleando las PESs calculadas en el estado fundamental y excitado con dos métodos (TD)DFT: (TD)B3LYP/6-31G(d) y (TD)CAM-B3LYP/6-31G(d). En la Figura 6.7 (a) se muestran los resultados para violaxantina, que es la molécula que presenta menos problemas en la simulación de los espectros, proporcionando resultados similares con todos los modelos. Como podemos observar, la posición de la banda obtenida con las PES a nivel B3LYP, está significativamente desplazada a menores energías, mientras que con CAM-B3LYP los tránsitos están más cercanos a los experimentales. Por el contrario, la estructura vibracional se reproduce mucho mejor con las PES a nivel B3LYP en comparación con las obtenidas a



**Figura 6.8** – Perfiles de energía potencial generados por el barrido del diedro  $D_{\text{anillo}}$  sobre la PES de los estados fundamental (GS) y excitado (ES), calculado a nivel (TD)B3LYP/6-31G(d) para  $\beta$ -caroteno (izquierda) y violaxantina (derecha). Las líneas verticales indican la posición de los mínimos en cada estado que se analizan en esta sección. El diedro equivalente,  $D'_{\text{anillo}}$ , toma aproximadamente el mismo valor para todos valores de  $D_{\text{anillo}}$ , en torno a  $-45^\circ$  (GS) y  $-36^\circ$  (ES) para  $\beta$ -caroteno y  $-72^\circ$  (GS) y  $-75^\circ$  (ES) para violaxantina.

nivel CAM-B3LYP, que subestima significativamente la intensidad de la primera banda. El resto de sistemas muestran la misma tendencia, al margen de las limitaciones de los modelos de cálculo. Para uno de los conformeros de  $\beta$ -caroteno, se calcularon, además, las PES con una base extendida por la introducción de funciones difusas, 6-31+G(d), junto con el funcional CAM-B3LYP. En este caso, los espectros simulados se muestran en la Figura 6.7 (b), donde se observa como la estructura vibracional apenas se ve alterada con el empleo de cada base, mientras que la posición de la banda se desplaza ligeramente a menores energías. Teniendo en cuenta que en este trabajo estamos interesados, principalmente, en reproducir la forma de las bandas espectrales, el método de cálculo escogido ha sido el (TD)B3LYP/6-31G(d).

La PES del estado fundamental y excitado se ha explorado por medio de un barrido del diedro que conecta uno de los anillos de ionona con la cadena conjugada, que denotamos como  $D_{\text{anillo}}$ . Para cada valor fijo de este ángulo, se calcula la energía a nivel (TD)B3LYP/6-31G(d) mientras el resto de la estructura se optimiza en su conformación más estable. Estos barridos, que se incluyen en la Figura 6.8, muestran, tanto en el nivel fundamental como el excitado, dos mínimos para violaxantina y tres para  $\beta$ -caroteno. En este trabajo solo se ha considerado el mínimo más estable de violaxantina, dada la diferencia energética que lo separa del otro, mientras que en el caso de  $\beta$ -caroteno se han considerado los tres rotámeros que se indican en la figura: dos con conformación pseudo-*cis*, que tienen una energía similar, y otro conformero *trans* más energético. Conviene destacar que, ya que la rotación del diedro equivalente en el otro extremo de la cadena, que denotamos como  $D'_{\text{anillo}}$ , lleva asociada un perfil energético similar, adoptará el valor de mínima energía de esta curva en todos los casos. Para distinguir los diferentes isómeros estudiados basta con referirnos, como hemos hecho, a la conformación del diedro  $D_{\text{anillo}}$ .

En la Figura 6.8 se destaca, además, la diferencia en el valor del ángulo diedro para las estructuras optimizadas en los dos estados electrónicos, mostrando claramente los diferentes desplazamientos estructurales que se producen para cada conformero. De hecho, la inclusión del

isómero *trans* de  $\beta$ -caroteno en este estudio, que debido a su energía relativa no cabe esperar que se encuentre poblado significativamente, se justifica en que, teniendo en cuenta que el otro anillo de este conformero se encuentra en disposición *cis*, presenta un desplazamiento estructural intermedio entre los otros isómeros de  $\beta$ -caroteno y la violaxantina.

Cada rotámero seleccionado se optimiza en el estado fundamental y en el excitado calculando, a continuación, la Hessiana. Se calcula, además, la Hessiana del estado excitado con la estructura del mínimo en el estado fundamental (punto de Franck-Condon) para aplicar el modelo vertical (VH). La Hessiana se diagonaliza entonces en un sistemas de coordenadas donde se desacople la vibración de la traslación y rotación (condiciones de Eckart [Eckart 35, Sayvetz 39]), proporcionando así las frecuencias normales de vibración. Estas resultan ser todas reales calculadas en los mínimos de cada estado, obteniéndose dos o tres valores imaginarios en los puntos de Franck-Condon en el estado excitado para todos los sistemas.

Las optimizaciones y cálculos de frecuencia se han realizado en vacío, sin incluir el disolvente empleado en la realización de los espectros experimentales publicados, tales como n-hexano o 3-metilpentano para  $\beta$ -caroteno [Larsen 03, Jailaubekov 11], y n-hexano, EPA (mezcla de etanol, isopentano y dietil éter) o piridina para violaxantina [Frank 00, Josue 02, Cong 08]. No obstante, comparando los espectros en diferentes disolvente se observa que, independientemente de la polaridad del disolvente, la estructura vibracional de los espectros no varía sustancialmente, aunque sí lo haga su posición. De este modo, teniendo en cuenta que nuestro principal objetivo es reproducir la forma de las bandas espectrales asociadas al tránsito  $S_0 \rightarrow S_2$  de distintos carotenoides, podemos considerar que los resultados obtenidos en vacío son cualitativamente válidos para evaluar los resultados obtenidos con los distintos modelos frente a los datos experimentales. No obstante, para violaxantina, para la que el efecto del disolvente puede ser más pronunciado por la presencia de los grupos hidroxilo polares, se ha realizado también el cálculo de las PESs de los estados inicial y final incluyendo piridina como disolvente, con las que se pueden simular un espectro directamente comparable con el experimental registrado en piridina. Para introducir el efecto del disolvente en los cálculos, hemos empleado el modelo continuo del disolvente en su formulación de la ecuación integral, IEFPCM [Miertus 81, Scalmani 10].

Los espectros se simulan empleando el modelo armónico para describir las PESs del estado fundamental y excitado considerando la relación de Duschinsky para relacionar, de forma lineal, los modos normales de ambos estados, como sigue:

$$\mathbf{Q}_1 = \mathbf{J}\mathbf{Q}_2 + \mathbf{K} \quad (6.5)$$

donde  $\mathbf{Q}_1$  y  $\mathbf{Q}_2$  son los modos normales del estado inicial (1) y final (2), respectivamente, mientras que  $\mathbf{J}$  y  $\mathbf{K}$  son la matriz de Duschinsky y el vector de desplazamiento.

Concretamente, la PES del estado fundamental se construye con una expansión cuadrática alrededor del mínimo empleando la información de la Hessiana en esta estructura. Por su parte, para reconstruir la PES del estado final del tránsito existen dos posibilidades: en torno al mínimo, como se hace para el estado inicial, dando forma al modelo adiabático (AH), o en el punto de Franck-Condon, empleando la información del gradiente y la Hessiana, que da lugar al modelo vertical (VH). En el caso adiabático, diferenciamos dos métodos dependiendo del sistema de coordenadas utilizado para describir los modos normales, que pueden ser coordenadas

**Tabla 6.4** – Tiempo de computación (CPU, en segundos) para la simulación del espectro de dos sistemas distintos,  $\beta$ -caroteno y violaxantina, mediante técnicas TD y TI, usando las implementaciones en coordenadas Cartesianas y en coordenadas internas. Se indican los parámetros empleados para llevar a cabo las simulaciones con los métodos indicados en el Capítulo 4.

Molécula	T (K)	Simulación	Convergencia <sup>a</sup>	CPU (seg)
BCR( <i>cis</i> -C <sub>2</sub> )	10	TI <sup>b</sup> /AH(Cart)	0.34	62210
BCR( <i>cis</i> -C <sub>2</sub> )	10	TD <sup>c</sup> /AH(Cart)	–	416
BCR( <i>cis</i> -C <sub>2</sub> )	10	TI <sup>b</sup> /AH(int)	0.60	107576
BCR( <i>cis</i> -C <sub>2</sub> )	10	TD <sup>c</sup> /AH(int)	–	420
VIO(C <sub>2</sub> )	77	TI <sup>b</sup> /AH(Cart)	0.97	28226
VIO(C <sub>2</sub> )	77	TD <sup>c</sup> /AH(Cart)	–	534

<sup>a</sup> Fracción de la intensidad del espectro recuperada respecto a la intensidad FC total. Los espectros TD convergen totalmente.

<sup>b</sup> Parámetros empleados: maxC1=30, maxC2=25, maxInt=10<sup>9</sup>, MinBoltzmannPop=0.2.

<sup>c</sup> Función de correlación evaluada con  $\Delta t = 0,24$  ps hasta  $t_{Total} = 1$  ns.

Cartesianas, AH (Cart), o coordenadas internas, AH (int), mientras que en el caso vertical únicamente se emplea la descripción en coordenadas Cartesianas, VH. Estos tres modelos se emplean para realizar la simulación de los espectros tanto con las formulaciones TD y TI, adoptando la aproximación de Frank-Condon para describir el momento dipolar de transición, que consiste en considerarlo constante, independiente de las coordenadas normales.

Las simulaciones de los espectros se han llevado a cabo con una versión en desarrollo del código *FCclasses* [Santoro 13], que permite usar los modelos AH y VH en coordenadas cartesianas con una formulación TI, basada en una selección eficiente de las integrales de Franck-Condon que se calculan, agrupándolas en clases [Santoro 07a, Santoro 07b, Santoro 08]. Se ha implementado, además, la posibilidad de introducir la matriz de Duschinsky calculada en coordenadas internas y de realizar la simulación con métodos TD, que, a costa de perder la información de cada tránsito individual, permiten la simulación de espectros a temperaturas finitas de forma mucho más eficiente que los métodos TI. De hecho, las técnicas TI se basan en la inclusión de los tránsitos más relevantes, para lo que son necesarios métodos de cribado como los aplicados en *FCclasses*, lo que conducirá a perder parte de la intensidad total, mientras que las técnicas TD incluyen *todos* los tránsitos recuperando por tanto toda la intensidad.

Para ilustrar la eficiencia computacional de cada método, en la Tabla 6.4 se muestran los tiempos de CPU que consumen las simulaciones de distintos sistemas estudiados en este trabajo realizadas con formulaciones TI y TD, incluyendo, para las técnica TI, la fracción de la intensidad total que se logra recuperar.

Como podemos observar, los métodos TI requieren tiempos entre 2 y 3 órdenes de magnitud mayores que los TD para los sistemas estudiados, con unos 100 átomos, con recuperaciones que, en ocasiones, son inferiores al 50%. Podemos destacar, sin embargo, que la baja convergencia observada en algunos sistemas, se puede relacionar con el tipo de coordenadas empleado para describir los modos normales, siendo mucho peor en coordenadas Cartesianas que en internas. De hecho, este hecho puede ser considerado un síntoma de las limitaciones de las coordenadas

Cartesianas para representar desplazamientos curvilíneos.

### 6.3.2. Espectros simulados para $\beta$ -caroteno

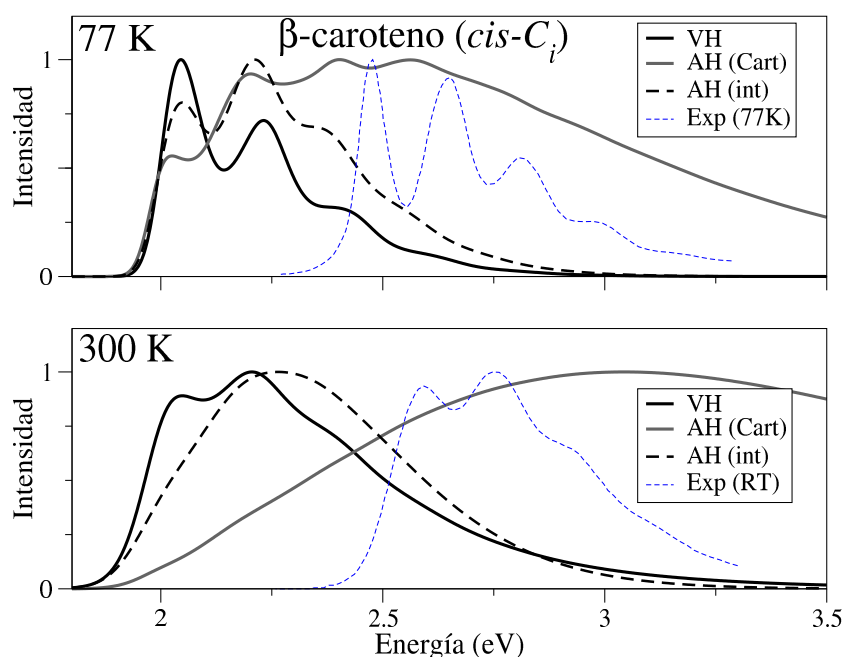
Comenzamos analizando los espectros vibrónicos simulados para los tres rotámeros de  $\beta$ -caroteno seleccionados, definidos en función del diedro  $D_{\text{anillo}}$ . Consideramos, en concreto, dos mínimos cercanos a la conformación *cis* de este diedro, que corresponden a estructuras de simetría  $C_i$  y *quasi*- $C_2$  (es decir, aproximadamente  $C_2$ , aunque realmente pertenecen al grupo  $C_1$ ), siendo esta última ligeramente más energética. El tercer mínimo considerado presenta una conformación del diedro prácticamente *trans* y tiene una energía de alrededor de 1.5 kcal/mol por encima de las estructuras *cis*. Tal y como se ha indicado, si bien este conformero no se encontrará significativamente presente en condiciones de equilibrio, su inclusión en este estudio resulta de gran interés para completar el rango de cambios conformacionales entre los estados inicial y final.

En este sentido, asumiendo que el desplazamiento estructural entre los mínimos de los estados inicial y final se puede asociar, cualitativamente, a los cambios en los valores de  $D_{\text{anillo}}$  y  $D'_{\text{anillo}}$  entre cada estructura, este desplazamiento se puede estimar a partir de dichos valores medidos en las estructuras optimizadas a nivel (TD)B3LYP/6-31G(d) para cada rotámero. En concreto, se encuentra que para el conformero *cis*- $C_i$ , en el que  $D_{\text{anillo}} = -D'_{\text{anillo}}$ , y su valor absoluto es de  $47.6^\circ$ , en el estado fundamental, y  $36.0^\circ$ , en el excitado. Para el *cis-quasi*- $C_2$  (de ahora en adelante nos referiremos a este conformero simplemente como *cis*- $C_2$ ),  $D_{\text{anillo}} \approx D'_{\text{anillo}}$ , con valores de  $47.4^\circ$  y  $47.8^\circ$  en el estado fundamental y  $37.2^\circ$  y  $39.9^\circ$  en el excitado. Finalmente, para el conformero *trans*, uno de los diedros tiene conformación *trans* mientras que el otro mantiene la pseudo-*cis*, con valores de  $-169.7^\circ$  y  $46.2^\circ$  en el estado fundamental y  $-171.7^\circ$  y  $36.1^\circ$  en el excitado. Como medida global del desplazamiento estructural entre los estados inicial y final, empleamos las sumas de las desviaciones absolutas entre los mínimos de cada estado,  $|\Delta D_{\text{anillo}}| + |\Delta D'_{\text{anillo}}|$ , que son  $23.2^\circ$ ,  $18.1^\circ$  y  $12.1^\circ$  para los isómeros *cis*- $C_i$ , *cis*- $C_2$  y *trans*, respectivamente. Se comprueba, por tanto, que el desplazamiento se reduce considerablemente del isómero *cis*- $C_i$  al *trans*, lo que va a permitir evaluar la validez de los distintos modelos en función de dicho cambio conformacional. Por otro lado, teniendo en cuenta que la distribución conformacional de los carotenoides puede verse alterada significativamente en entornos biológicos, como hemos visto en el Capítulo 5, resulta interesante disponer de cálculos de los distintos isómeros, incluso si no son relevantes en condiciones normales.

#### Isómero *cis*- $C_i$ de $\beta$ -caroteno

Iniciamos este estudio con la simulación de los espectros del isómero más estable de acuerdo con el barrido conformacional de la Figura 6.8: el *cis*- $C_i$ . Los espectros se han obtenidos a temperaturas de 77 K y 300 K, y los resultados pueden ser comparados con los espectros disponibles en la bibliografía a 77 K y temperatura ambiente. En las simulaciones se han empleado los tres modelos propuestos para describir las PESs en la aproximación armónica, VH, AH (Cart) y AH





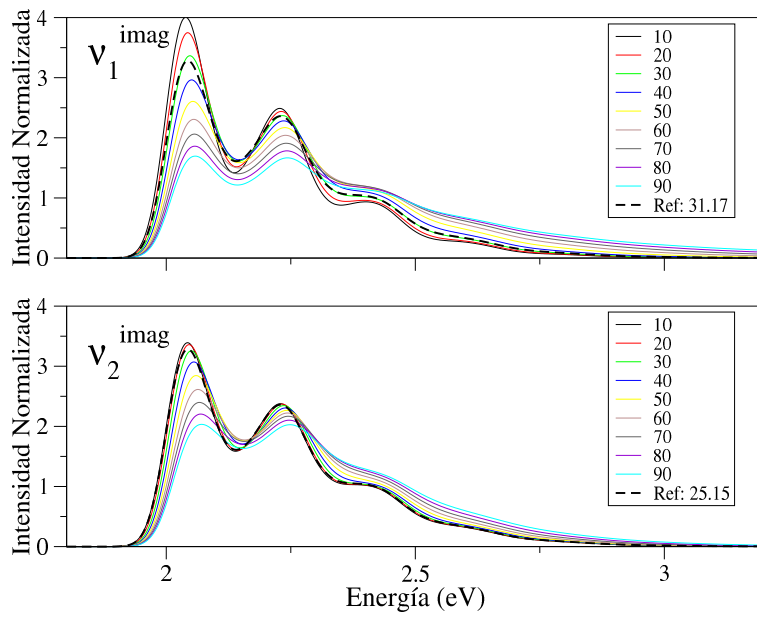
**Figura 6.9** – Espectro simulado del conformero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno a 77 K y 300 K con los modelos VH, AH (Cart) y AH (int). El espectro experimental de Jailaubekov et al [Jailaubekov 11] en 3-metilpentano se incluye como referencia.

(int). Como ya hemos comentado, para obtener los espectros a temperaturas finitas de moléculas tan grandes como los carotenoides, recurrimos a una formulación TD.

En la Figura 6.9, se muestran los resultados en los que puede apreciarse cómo el modelo AH (Cart) da lugar a espectros con un ensanchamiento excesivo en comparación con los datos experimentales. Este hecho se puede relacionar con la deficiente descripción de los modos curvilíneos en coordenadas Cartesianas, cuyo origen concreto investigaremos más adelante.

Tanto el uso de coordenadas internas, AH (int), como del modelo VH, consiguen reproducir acertadamente la anchura espectral correcta aunque, comparando, los resultados proporcionados por estos dos modelos se observa que la estructura vibracional de la banda queda mejor descrita empleando el modelo VH, una diferencia que se amplifica a altas temperaturas.

No obstante, el modelo vertical se ve limitado por la presencia de dos frecuencias vibracionales imaginarias,  $\nu_1^{imag} = 31,17i \text{ cm}^{-1}$  y  $\nu_2^{imag} = 25,15i \text{ cm}^{-1}$ , cuyo tratamiento debería involucrar términos anarmónicos. Dicho enfoque supera los objetivos de este estudio, en el que hemos recurrido a una solución aproximada propuesta recientemente [Avila Ferrer 12], que consiste en asignar un valor real arbitrario a las frecuencias imaginarias, eligiéndose, de forma sistemática, el módulo de la frecuencia imaginaria. Este procedimiento, que permite mantener la simplicidad del modelo armónico, supone reconstruir parte de PES cuadrática de forma arbitraria, por lo que puede ser una aproximación algo tosca y, para que sea válida, es necesario que el efecto de las frecuencias modificadas sobre la forma global del espectro sea pequeña. Por tanto, con el fin de analizar dicho efecto, se ha calculado el espectro VH con distintos valores para cada una de las frecuencias imaginarias,  $\nu_1$  y  $\nu_2$ , entre 10 y  $90 \text{ cm}^{-1}$ . En la Figura 6.10 se muestran las



**Figura 6.10** – Espectro simulado del conformero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno a 77 K con el modelos VH, en el que se han dado distintos valores, entre 10 y 90  $\text{cm}^{-1}$ , a las dos frecuencias imaginarias obtenidas en el estado excitado. Los valores de referencia (Ref) son los obtenidos tomando como reales las frecuencias imaginarias originales.

bandas espectrales obtenidas, observándose que, sobre todo para  $\nu_1$ , la elección de esta frecuencia puede afectar significativamente a la intensidad relativa de las bandas, aunque se mantienen las tendencias cualitativas. Esto pone de manifiesto que los resultados deben ser tomados con cierta precaución, si bien podemos considerarlos cualitativamente correctos.

**Tabla 6.5** – Descripción cualitativa de los modos más relevantes para explicar el espectro del isómero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno. La numeración de los modos corresponde al estado excitado.

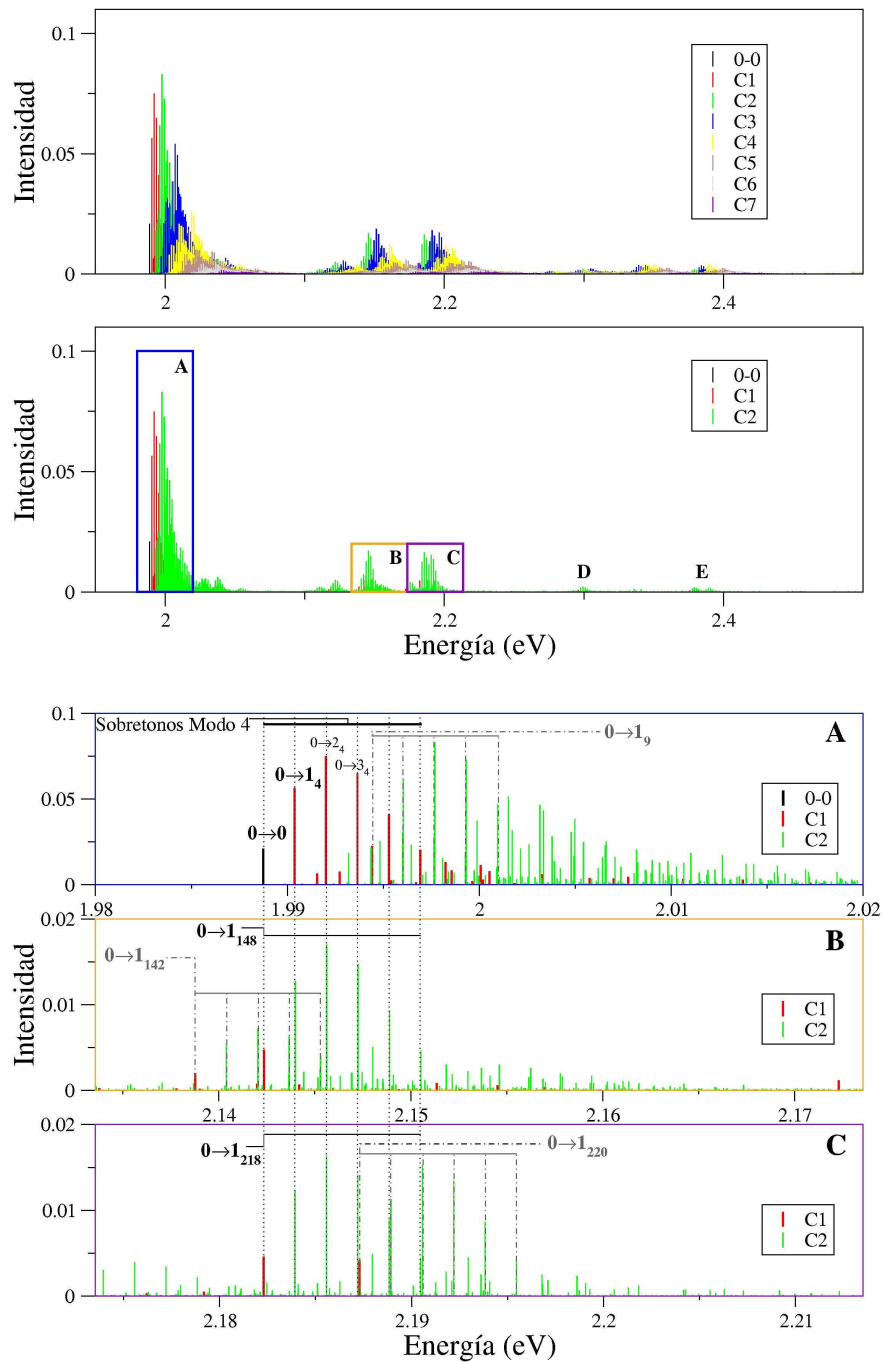
Modo	Descripción
4	Torsión a lo largo de la cadena conjugada <sup>a</sup>
9	Torsión a lo largo de la cadena conjugada <sup>a</sup>
142	Tensión C $\simeq$ C y deformación C-C-C del anillo
148	Tensión C $\simeq$ C y deformación C-C-H a lo largo de la cadena
218	Tensión C=C y deformación C-C-H a lo largo de la cadena
220	Tensión C=C y deformación C-C-H a lo largo de la cadena

<sup>a</sup> Contiene una contribución significativa del diedro D<sub>anillo</sub>.

Debido a los problemas asociados al modelo VH, hemos elegido el AH (int) para analizar los espectros vibrónicos. Con el objetivo de asignar el origen de las bandas vibracionales del espectro, resulta más útil llevar a cabo un cálculo TI del espectro a 0 K, que ofrece información detallada acerca de los tránsitos individuales entre los niveles vibracionales de los cada estado electrónico. En la Figura 6.11 se muestra el espectro TI que se ha calculado con la eficiente metodología basada en la partición de los tránsitos en *clases*. Se consigue así recuperar una fracción de 0.53 de la intensidad total, lo que resulta suficiente para analizar las bandas vibrónicas más intensas, que pertenecen a las clases *C*<sub>1</sub> a *C*<sub>3</sub>. Además, en la Tabla 6.5 incluimos la descripción de los modos más relevantes para facilitar el análisis cualitativo de la estructura vibracional.

La característica más relevante del espectro es la progresión de sobretonos del modo 4 del estado excitado (que se corresponde con el modo 3 del estado fundamental), que consisten en los tránsitos  $0 \rightarrow 1_4$ ,  $0 \rightarrow 2_4(*)$ ,  $0 \rightarrow 3_4$ ,  $\dots$ , donde el segundo tránsito, indicado con un asterisco, es el más intenso. Como se indica en la Tabla 6.5, este modo contiene una contribución muy significativa de los diedros D<sub>anillo</sub> y D'<sub>anillo</sub>, que se encuentran significativamente desplazados entre los mínimos de los estados inicial y final, lo que conducirá a un desplazamiento grande para este modo, lo que explica el perfil de esta progresión. Este resultado señala, además, al desplazamiento de este diedro como una fuente de ensanchamiento de los espectros, por lo que cabe esperar un mayor ensanchamiento cuanto mayor sea el desplazamiento de este diedro entre el estado inicial y final.

Las progresiones del modo 4 se pueden identificar a lo largo de todo el espectro, en combinación con los sobretonos más intensos, dando lugar tránsitos que, en la partición en clases que hace el programa *FCclasses*, corresponden a la clase *C*<sub>2</sub>. Así, en lo que respecta a la región de baja energía del espectro, los tránsitos de clase *C*<sub>2</sub> más relevantes corresponden a combinaciones de la progresión de este modo con los tránsitos  $0 \rightarrow 1_9$ ,  $0 \rightarrow 2_9$ ,  $0 \rightarrow 1_7$ ,  $0 \rightarrow 1_5$  y  $0 \rightarrow 1_{13}$ , tal y como se indica en la Figura 6.11 (panel A). Resulta interesante destacar que el modo 9, que presenta una progresión apreciable, también tiene una contribución significativa del diedro D<sub>anillo</sub>. En cuanto a las transiciones *C*<sub>3</sub> que, por claridad, no se incluyen en los paneles A-C de la Figura 6.11, se corresponden con combinaciones de sobretonos de los modos 5, 7, 9 y 13, con la progresión del modo 4. Centrándonos en la parte más energética del espectro, los sobretonos ( $0 \rightarrow 1$ ) más relevantes corresponden a los modos 148, 142 (panel B) y 218, 220 (panel C), que



**Figura 6.11** – Espectro a 0 K calculado con métodos TI (fracción recuperada del espectro de 0.53) usando coordenadas internas. En los paneles superiores, se muestra la contribución de cada *clase* (arriba), y se destacan las regiones analizadas más en detalle hasta la clase  $C_2$  (abajo). En los paneles inferiores se muestra una ampliación de las regiones indicadas (A-C), identificando las progresiones del modo 4 (véase texto).

se asignan principalmente a tensiones C-C/C=C y deformaciones C-C-H a lo largo de la cadena conjugada, como se muestra en la Tabla 6.5. En esta región, los tránsitos de clase  $C_3$  corresponden a la combinación de los sobretonos de los un modo de alta frecuencia (142, 148, 218 y 220) y uno de baja frecuencia (5, 7, 9 y 13) e incluyendo en todo caso la progresión del modo 4. Por último, las bandas marcadas como D y E en la Figura 6.11 son análogas a las mostradas en las regiones B y C, pero correspondientes a los sobretonos  $0 \rightarrow 2$  de los modos de alta frecuencia.

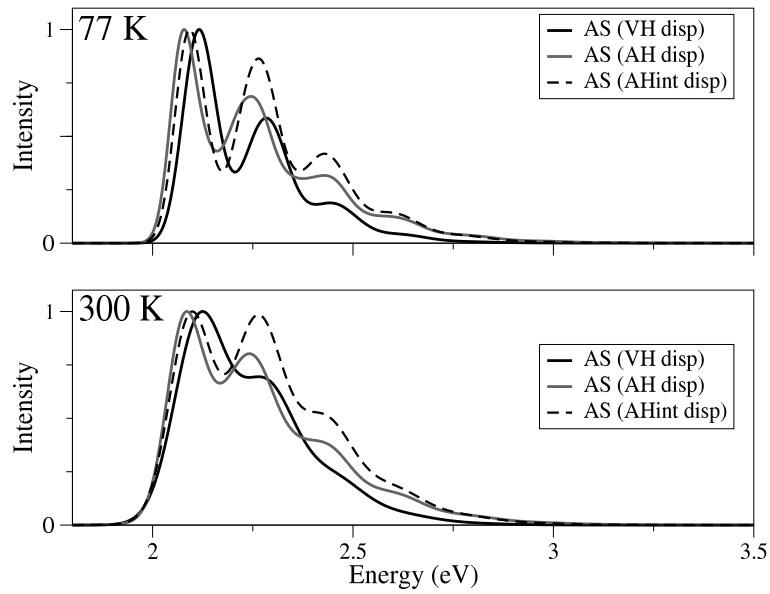
Analizamos ahora el ensanchamiento excesivo que resulta de la aplicación del modelo AH (Cart) en la simulación del espectro de este isómero, como se observa en la Figura 6.9. Con este propósito, se han diseñado dos cálculos adicionales que permitan evaluar de forma separada el efecto que producen sobre el ensanchamiento tanto los desplazamientos en los modos normales, el vector  $\mathbf{K}$  en la Ecuación (6.5), como la mezclas de modos a través de la matriz de Duschinsky ( $\mathbf{J}$ ), calculados con cada uno de los modelos propuestos. En primer lugar, adoptamos el modelo de Desplazamiento Adiabático (*Adiabatic Shift*, AH)[Avila Ferrer 12], en el que se asume que la forma de la PES del estado excitado es idéntica a la del estado fundamental, desplazada de acuerdo con el vector  $\mathbf{K}$ . En este modelo, las frecuencias son las mismas y la matriz de Duschinsky se iguala a la matriz unidad, de forma que la única fuente de ensanchamiento son los desplazamientos.

En la Figura 6.12, se presentan los espectros AS obtenidos a 77 K y 300 K. Se observa en esta figura que todos los modelos dan lugar a una anchura espectral similar, lo que permite descartar los desplazamientos como el origen del ensanchamiento erróneo observado en los espectros AH (Cart). De hecho, el desplazamiento calculado con todos los modelos es de un orden parecido, como se muestra en la Figura 6.13, donde se incluyen los desplazamientos adimensionales calculados con todos los modelos. Resulta interesante destacar además como los modos asociados con el diedro  $D_{\text{anillo}}$  presentan un mayor valor de desplazamiento en con todos los modelos.

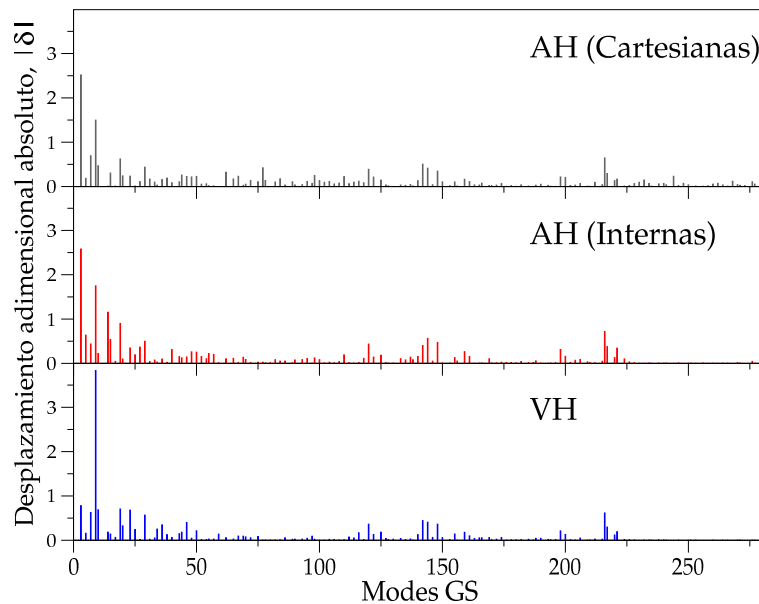
Para evaluar independientemente el efecto de la matriz de Duschinsky, se propone un cálculo en el que se fijan a cero todos los desplazamientos, manteniendo el valor de las frecuencias y la matriz de Duschinsky calculadas con cada uno de los métodos en discusión: VH, AH (Cart) y AH (int), que hemos denominado modelo de Cero Desplazamiento (*Zero Displacement*, ZD). Realizamos en este caso el cálculo del espectro ZD a 10 K, 77 K y 300 K, que se muestra en la Figura 6.14, donde se observa claramente que el empleo de la matriz de Duschinsky calculada con AH (Cart) da lugar a un ensanchamiento excesivo. Identificamos así la matriz de Duschinsky como responsable del ensanchamiento anómalo observado en el espectro AH (Cart) de este isómero de  $\beta$ -caroteno.

Con el fin de analizar este efecto de forma más detenida, hemos realizado el cálculo de los espectros ZD a 0 K con técnicas TI, que permiten identificar los tránsitos que originan las distintas bandas observadas en los espectros TD. La Figura 6.15 muestra los tránsitos obtenidos en cálculos ZD, empleando la matriz de Duschinsky con los modelos AH (Cart) y AH (int). Se incluyen en esta figura las clases  $C_1$  y  $C_2$ , y en ella se aprecia claramente que las diferencia entre los dos modelos se relacionan con los tránsitos correspondientes a la clase  $C_2$ , donde que combinan modos de baja (torsiones) y alta frecuencia, que corresponden concretamente a tensiones C-H (CH *stretchings*).

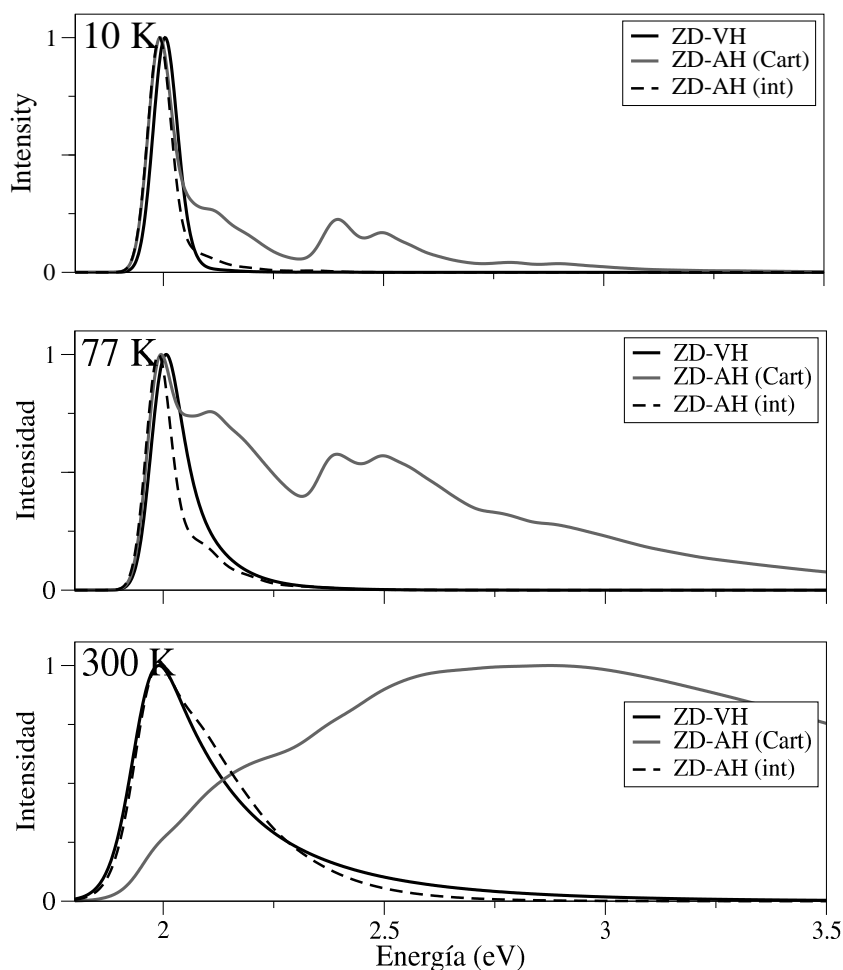
En los espectros ZD, la intensidad de los tránsitos distintos del 0-0 surge de las diferencias



**Figura 6.12** – Espectros AS simulados para el isómero *cis-C<sub>i</sub>* a 77 K y 300 K, usando los desplazamientos calculados con los modelos VH, AHCart y AHint.



**Figura 6.13** – Valores absolutos del desplazamiento adimensional,  $\delta_i = (2\pi\nu_i^{GS}/\hbar)^{1/2}K_i$ , calculado con los modelos AH (Cart), AH (int) y VH para el isómero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno.



**Figura 6.14** – Espectros ZD simulados para el isómero *cis-C<sub>i</sub>* de  $\beta$ -caroteno a 10 K, 77 K y 300 K, usando la matriz de Duschinsky evaluada con los modelos VH, AHCart y AHint.

de frecuencia y de los acoplamientos de la matriz de Duschinsky. Concretamente, las bandas  $C_2$  adicionales encontradas con el modelo AH (Cart) deben ser consecuencia de los acoplamiento de la matriz de Duschinsky, ya que los cambios en frecuencia son iguales a los AH (int) que no presenta estas bandas. Para confirmar el origen del ensanchamiento anómalo en la deficiente descripción de la matriz de Duschinsky con el modelo AH (Cart), en la Figura 6.16 hemos incluido una representación de las matrices completas, resaltando la región de valores hasta 0.1. Estas representaciones muestran claramente los acoplamientos de los modos de tensión C-H con el resto de modos para el modelo AH (Cart), que son corregidos empleando tanto los modelos AH (int) como VH que, precisamente, son los que dan lugar al ensanchamiento correcto del espectro. En cuanto al modelo AH (int) cabe destacar también que los modos de baja energía del estado excitado (ES) se encuentran acoplados con gran cantidad de modos del estado fundamental, lo que en este caso se asocia a la no ortogonalidad de la matriz de Duschinsky, aunque no afecta significativamente al espectro simulado.

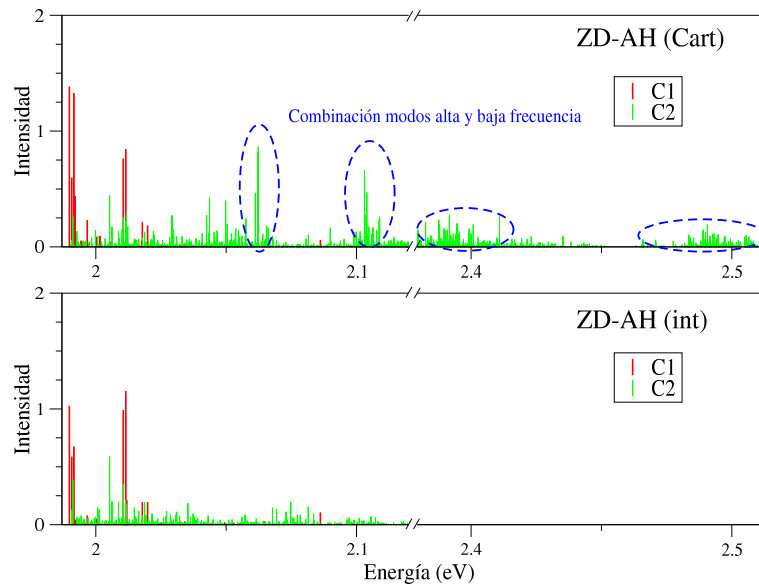


Figura 6.15 – Tránsitos de clase  $C_1$  y  $C_2$  calculados en la simulación del espectro ZD de  $\beta$ -caroteno, empleando los modelos AH (Cart) y AH (int).

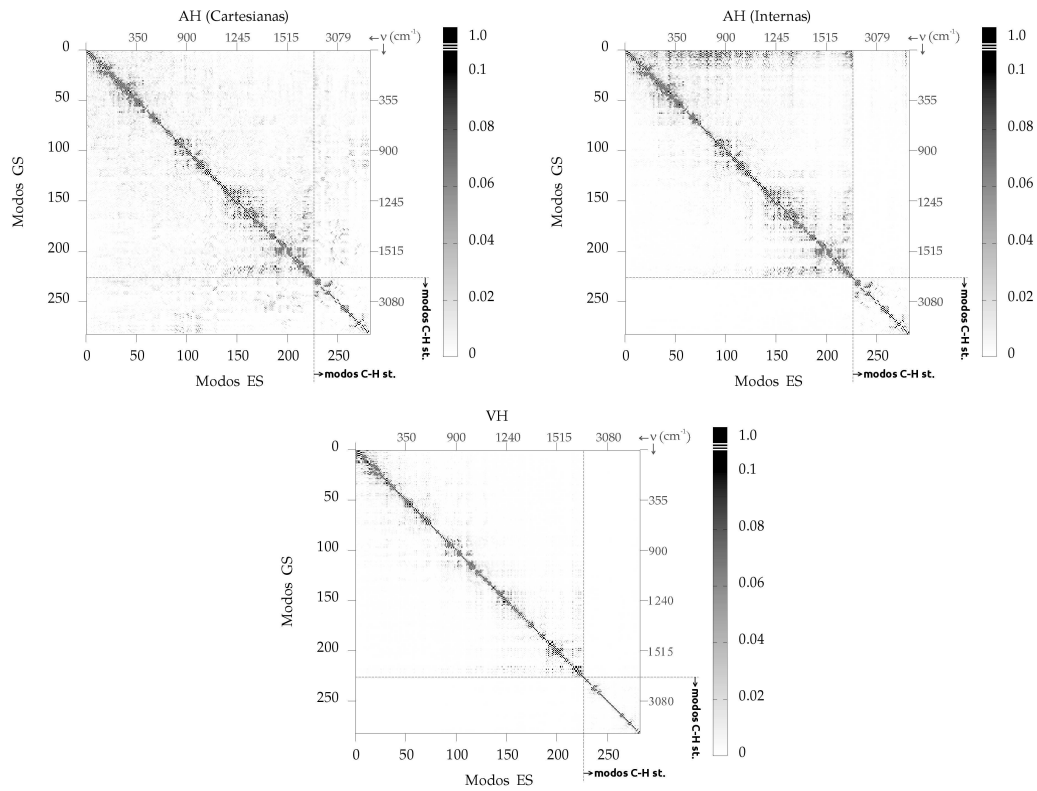


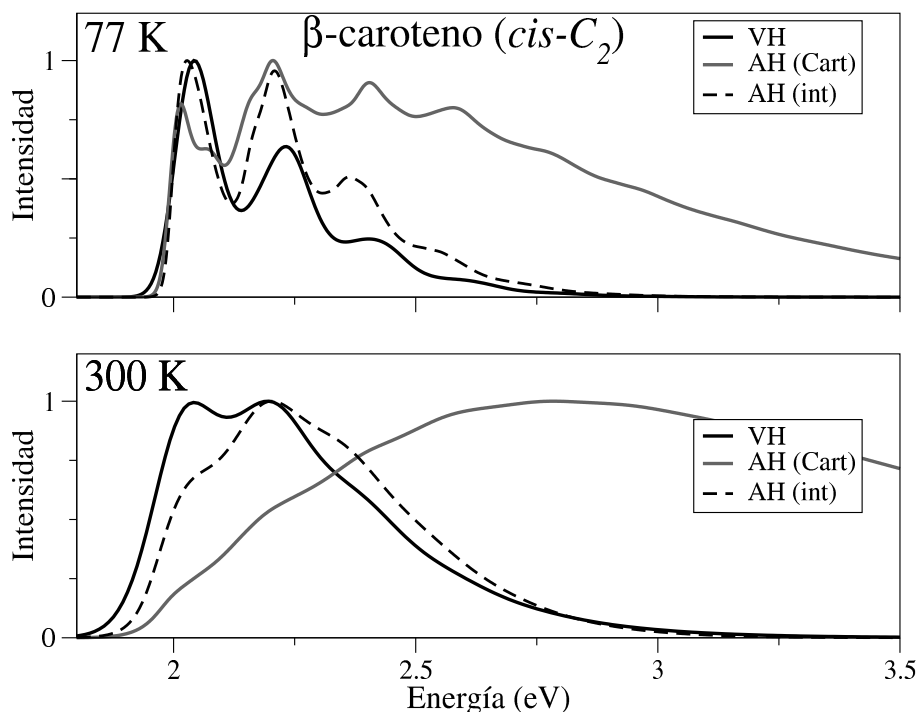
Figura 6.16 – Valores absolutos de la matriz de Duschinsky calculada con los modelos AH (Cart), AH (int) y VH para  $\beta$ -caroteno (*cis*- $C_i$ ). Se incluyen las frecuencias de algunos de los modos de los estados fundamental (GS) y excitado (ES). La escala centra la atención en los valores más bajos, mostrando en negro todos los valores por encima de 0.1.



Isómero *cis-C<sub>2</sub>* de  $\beta$ -caroteno

Continuamos con la simulación del espectro de para el isómero *cis-C<sub>2</sub>*, empleando también los tres modelos planteados para construir la PES armónica. Los resultados se muestran en la Figura 6.17, para las temperaturas de 77 K y 300 K. En este caso, se vuelve a observar que el modelo AH (Cart) conduce a un ensanchamiento excesivo, como ocurre para el isómero *cis-C<sub>i</sub>*, lo que resulta razonable teniendo en cuenta la similitud estructural entre ambos conforméromos. De hecho, el origen de este comportamiento es el mismo que el analizado en el caso anterior: los errores en la matriz de Duschinsky que conducen a acoplamientos entre modos de baja y alta frecuencia.

Al igual que el caso anterior, tanto el empleo del modelo adiabático en coordenadas internas, AH (int), como el VH, consiguen reproducir correctamente el ensanchamiento experimental. En este caso, los resultados a 77 K con el modelo AH (int) se aproximan enormemente a los resultados experimentales, aunque a 300 K, las diferencias con el experimento se hacen más notables. En este sentido, hemos de recordar que, este sistema, de acuerdo con las poblaciones relativas calculadas anteriormente, presenta una abundancia significativa, por lo que cabe esperar que contribuya al espectro experimental. Al igual que ocurre para el otro isómero *cis*, el modelo VH es el que reproduce mejor el espectro a ambas temperaturas, aunque para el caso de 77 K, la región de alta energía del espectro está significativamente subestimada. Además, hay que tener en cuenta que, también en este caso, la aplicación del modelo VH lleva asociada la aparición de frecuencias imaginarias, que evitamos con la aproximación indicada anteriormente.

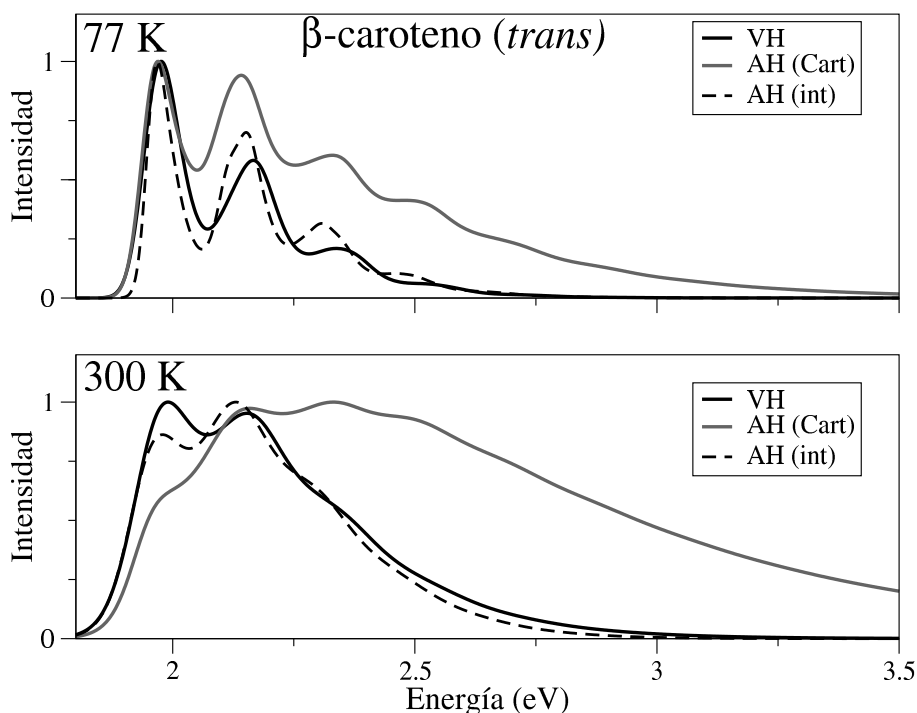


**Figura 6.17** – Espectro simulado del conforméromo *cis-C<sub>2</sub>* de  $\beta$ -caroteno a 77 K y 300 K con los modelos VH, AHCart y AHint.

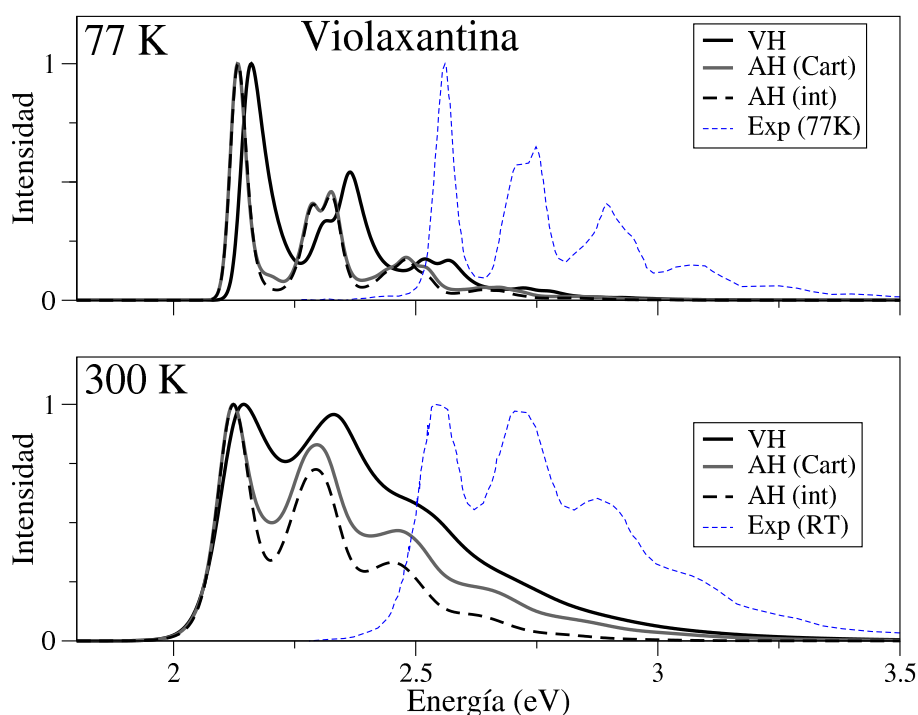
Isómero *trans* de  $\beta$ -caroteno

Continuamos ahora con el isómero *trans* que, según hemos indicado anteriormente, no estará presente de forma significativa en el medio y, por tanto, no contribuirá al espectro experimental. En la Figura 6.18 se incluyen los resultados correspondientes a las temperaturas de 77 K y 300 K, con los tres modelos, de forma similar a cómo se han presentado para los otros dos isómeros. Como hemos observado en estos otros dos casos, el modelo AH (Cart) proporciona un espectro significativamente más ancho que el obtenido con el resto de modelos, aunque, en este caso, este ensanchamiento no llega a ser tan importante como lo es para los isómeros *cis*. Este diferente comportamiento se puede atribuir al menor desplazamiento estructural entre los estados inicial y final de la transición electrónica que hemos descrito anteriormente en función de la variación del diedro  $D_{\text{anillo}}$ .

Los modelos AH (int) y VH corrigen, asimismo, la anchura excesiva proporcionada por el AH (Cart) y, en este caso, dan lugar a resultados muy similares, que podemos relacionar con la menor separación estructural entre los estados electrónicos involucrados. Hemos de tener en cuenta, no obstante, la presencia, en cualquier caso, de dos frecuencias imaginarias que se obtienen al emplear el modelo VH.



**Figura 6.18** – Espectro simulado del conformero *trans* de  $\beta$ -caroteno a 77 K y 300 K con los modelos VH, AHCart y AHint.



**Figura 6.19** – Espectro simulado violaxantina a 77 K y 300 K con los modelos VH, AHCart y AHint. El espectro experimental de Cong et al [Cong 08] se incluye como referencia.

### 6.3.3. Espectros simulados para violaxantina

En esta sección analizamos los espectros del isómero más estable de violaxantina, de acuerdo con la exploración conformacional presentada en la Figura 6.8. La estructura de este mínimo se caracteriza por un valor en los diedros que conectan los anillos de ionona con la cadena conjugada.  $D_{\text{anillo}}$  y  $D'_{\text{anillo}}$ , que son iguales, perteneciendo al grupo de simetría  $C_2$ , y varía de  $80.6^\circ$  en el estado fundamental a  $78.2^\circ$  en el excitado. Este desplazamiento es mucho menor que el observado en los isómeros de  $\beta$ -caroteno, y se explica de acuerdo con impedimento estérico que imponen los grupos epóxido entre los carbonos C5 y C6. En base a este limitado desplazamiento estructural, podemos pronosticar que, siguiendo la tendencia observada en el isómero *trans* de  $\beta$ -caroteno, mejorará los resultados de los modelos adiabáticos.

En cuanto a los espectros experimentales recogidos en la bibliografía, han sido obtenidos en distintos disolventes, como EPA a 77 K y a temperatura ambiente (RT) [Josue 02] y en piridina a temperatura ambiente [Cong 08]. En esta caso, la estructura vibracional de los espectros está mucho mejor resuelta y con un menos ensanchamiento. Resulta interesante destacar como este hecho concuerda perfectamente con la magnitud del ensanchamiento producido por la progresión de modos asociados al diedro  $D_{\text{anillo}}$  que hemos identificado para el isómero *cis*- $C_i$  de  $\beta$ -caroteno. En efecto, al presentar un desplazamiento mucho menor, estas progresiones serán menos importantes, lo que reduce esta fuente de ensanchamiento.

En la Figura 6.19 se muestran los espectros simulados a 77 K y 300 K empleando los tres modelos de aplicación de la aproximación armónica, AH (Cart), AH (int) y VH. Comparadas

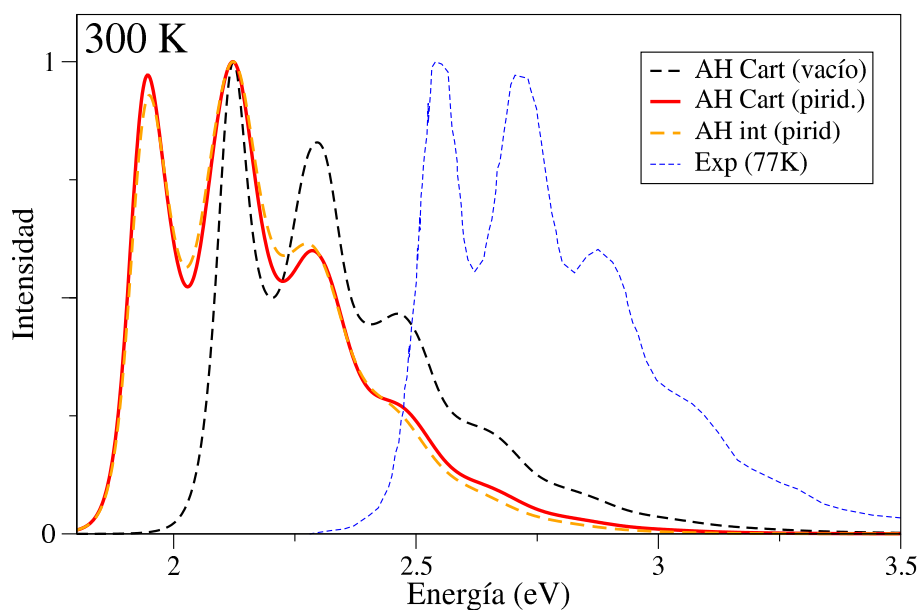
con los espectros experimentales proporcionados por Cong et al. [Cong 08], nuestras simulaciones en vacío se encuentran desplazadas unos 0.4 eV hacia menores energías, como hemos observado también para el espectro de  $\beta$ -caroteno y que se ha asociado como una deficiencia del funcional empleado, B3LYP.

Más interesantes son los resultados relacionados con la forma del espectro que, presenta una anchura muy similar en todos los casos, incluyendo los resultados con el modelo AH (Cart) que en este caso sí que proporciona el ensanchamiento experimental. Concretamente, para este caso la estructura vibracional del espectro es prácticamente igual a la obtenida con el modelo AH (int), lo que pone de manifiesto que las coordenadas Cartesianas se válidas para describir los desplazamientos de los modos en este sistema. Sin duda, estos resultados se relacionan con el menor desplazamiento estructural que se produce entre los mínimos de las estructuras inicial y final. Resulta también muy relevante que para violaxantina, los modelos adiabáticos, AH (Cart) y AH (int), proporcionan un espectro simulado mucho más parecido al experimental que el ofrecido por el modelo vertical, VH, para el que, de nuevo, se encuentra dos frecuencias imaginarias que advierten de las limitaciones del uso de modelos armónicos, y que se han tratado como hemos venido haciendo en los otros casos.

En lo que respecta a los resultados de los modelos AH (Cart) y AH (int) cabe destacar que, si bien son muy similares, se detecta una discrepancia apreciable en la región al rededor de 2.2 eV, donde aparece un hombro en con el modelo AH (Cart) que no se aprecia con el AH (int), ni tampoco parece encontrarse en el espectro experimental. De hecho, esta marca espectral obtenida con el modelo AH (Cart) se puede relacionar con el mismo efecto responsable del ensanchamiento excesivo en  $\beta$ -caroteno. Aun así, en comparación con los resultados para  $\beta$ -caroteno, este efecto es prácticamente inapreciable para violaxantina.

Como hemos comentado, todos los espectros que hemos presentado se han calculado sin incluir los efectos del disolvente. Para violaxantina, sin embargo, la presencia de los grupos polares, en concreto los oxígenos del epóxido, puede conducir a una mayor influencia de la polaridad del medio. Por esta razón, para este caso, hemos llevado a cabo simulaciones del espectro vibrónico empleando PESs calculadas al mismo nivel de cálculo, (TD)B3LYP/6-31G(d), incluyendo de forma implícita el efecto del disolvente mediante el modelo PCM [Tomasi 05], usando la implementación para cálculos TD-DFT basada en la teoría de respuesta lineal, LR-PCM/TD-DFT [Cammi 05, Impropa 11], para la que se dispone de gradientes analíticos, como en TD-DFT sin disolvente [Scalmani 06]. Concretamente, como disolvente hemos seleccionado piridina, que es uno de los empleados experimentalmente

En este caso, los espectros se han calculado únicamente con los modelos adiabáticos. En la Figura 6.20 se muestran los espectros simulados con los modelos AH (Cart) y AH (int) a 300 K, que se pueden comparar directamente con el valor experimental. Como se puede apreciar en esta figura, la inclusión del disolvente mejora notablemente la estructura vibracional del espectro simulado, en comparación con el experimental. No obstante, a pesar de mejorar la forma del espectro, no se producen cambios muy significativos, por lo que para nuestro estudio podemos considerar válidas la comparaciones de los espectros calculados en vacío. Por otro lado, la posición de la banda se desplaza a energías aún menores, respecto al cálculo en vacío, alejándose más del valor experimental.



**Figura 6.20** – Espectro simulado violaxantina a 300 K con el modelo AHCart en vacío y con los modelos AHCart y AHint incluyendo el efecto del disolvente (piridina). El espectro experimental de Cong et al [Cong 08] se incluye como referencia.

#### 6.3.4. Limitaciones del tratamiento en coordenadas internas

Pese a las ventajas de las coordenadas internas para describir los modos de vibración, éstas pueden dar lugar a problemas de no ortogonalidad en la matriz de Duschinsky, ya que no es posible definir de forma simultánea un marco ortogonal para los modos definidos en dos estructuras diferentes, ya que la matriz  $\mathbf{G}^{1/2}$ , que define la rotación al sistema ortogonal, depende de la conformación. Sin embargo, la ortogonalidad de los modos de vibración de cada estado resulta ser un requisito en la derivación de las implementaciones TD [Ianculescu 04]. Por esta razón, analizamos la ortogonalidad de la matriz de Duschinsky definida en coordenadas internas ( $\mathbf{J}_{\text{int}}$ ), teniendo en cuenta que se puede expresar en términos de los modos vibracionales en coordenadas internas ortogonalizadas,  $\mathbf{L}'$  como:

$$\mathbf{J}_{\text{int}} = \mathbf{L}'^T \mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{G}_2^{1/2} \mathbf{L}' \quad (6.6)$$

donde los índices 1 y 2 hacen referencia a los estados inicial y final del tránsito espectroscópico. Analizando esta ecuación queda claro que la matriz  $\mathbf{J}_{\text{int}}$  solo será ortogonal si las matrices métricas de los dos estados sean iguales,  $\mathbf{G}_1 = \mathbf{G}_2$ . Concretamente, a partir de la Ecuación (6.6) se puede concluir también que la matriz de Duschinsky será ortogonal cuando el producto de matrices  $\mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{G}_2^{1/2}$  sea igual a la matriz unidad. Inspirándonos en este hecho podemos definir la matriz  $\mathbf{D}$ , como:

$$\mathbf{D} = \mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{G}_2^{1/2} \quad (6.7)$$

de forma que la similitud de la matriz  $\mathbf{D}$  con la matriz identidad puede emplearse como un indicador de la validez del enfoque en coordenadas internas. Podemos además dar una interpretación física de esta matriz si tenemos en cuenta las rotaciones entre las coordenada internas ortogonales y las originales,

$$\mathbf{S}_1 = \mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{S}'_1 \quad (6.8)$$

$$\mathbf{S}_2 = \mathbf{G}_2^{-1/2} \mathbf{S}'_2 \quad (6.9)$$

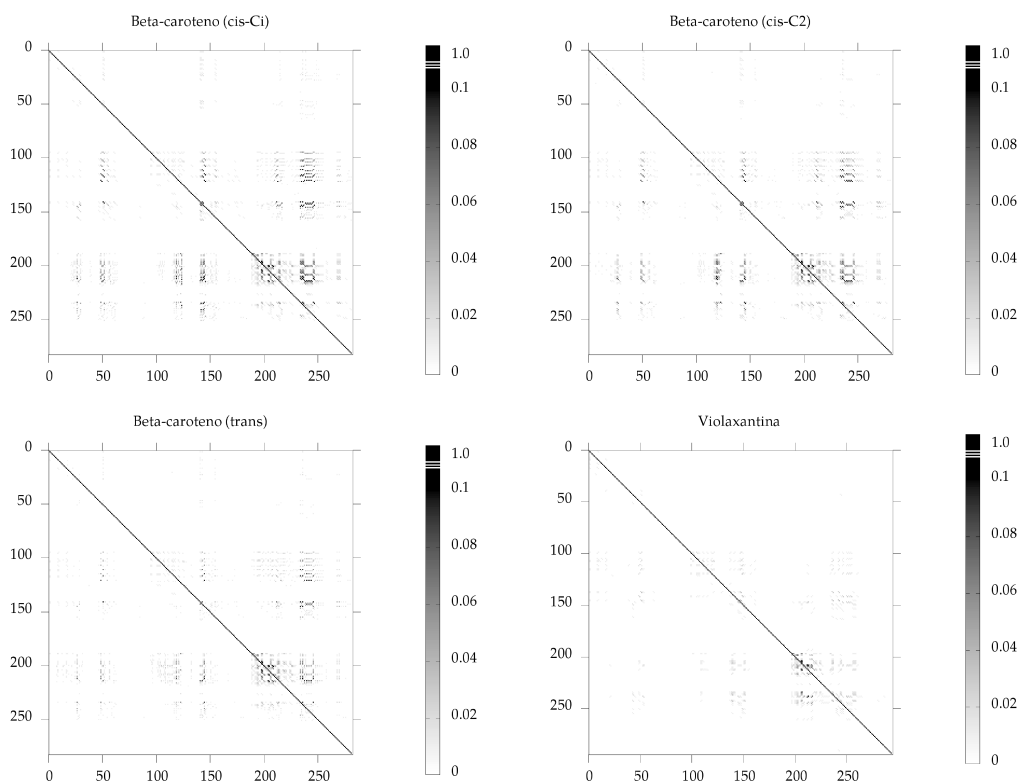
Hay que tener en cuenta la definición de las coordenadas internas mediante la matriz de Wilson implica un aproximación de primer orden, por la definición cambia en distintos puntos del espacio configuracional. Si consideramos que las coordenadas ortogonales son, sin embargo, las mismas en todo el espacio, es decir,  $\mathbf{S}'_1 = \mathbf{S}'_2 = \mathbf{S}'$ , entonces a partir de las ecuaciones anteriores podemos expresar las coordenadas internas originales  $\mathbf{S}_1$  en función de  $\mathbf{S}_2$ ,

$$\mathbf{S}_1 = \mathbf{G}_1^{-1/2} \mathbf{G}_2^{1/2} \mathbf{S}_2 = \mathbf{D} \mathbf{S}_2 \quad (6.10)$$

es decir, la matriz  $\mathbf{D}$  establece la relación entre la definición de las coordenadas internas en la conformación inicial,  $\mathbf{S}_1$ , en términos de las definidas en la conformación final,  $\mathbf{S}_2$ . Es decir, podemos identificar los elementos de la matriz como las coordenadas internas, de forma que podemos identificar aquellas coordenadas responsables de la no-ortogonalidad.

En primer lugar, con el fin de analizar esta matriz, en la Tabla 6.6 se ofrecen los valores de algunos valores clave de esta matriz, mientras que en la Figura 6.21 se representan las matrices completas en una representación bidimensional. En primer lugar, tal y como se muestra en la Tabla 6.6, el determinante es, en todos los casos, próximo al valor ideal, esto es, a la unidad, independiente del desplazamiento estructural entre los estados inicial y final. De hecho, resulta sorprendente que el valor más alejado de la unidad sea el obtenido para violaxantina, el sistema que presenta el menor desplazamiento, si bien lo más destacable es que el valor de este determinante se mantenga próximo a la unidad en todos los casos, lo que indica que, aunque las matrices  $\mathbf{G}_1$  y  $\mathbf{G}_2$  diferencian entre si, sus determinantes son muy similares.

En la Figura 6.21, donde se representan los valores absolutos de matriz  $\mathbf{D}$ , el oscurecimiento de cada punto se relaciona con el valor absoluto del elemento correspondiente. Se visualiza muy bien de este modo la apariencia de esta matriz, mostrando claramente las partes donde aparecen las mayores desviaciones respecto a la matriz unidad. Concretamente, cabe destacar que la región de la matriz con las mayores desviaciones respecto a la identidad corresponde a los elementos relacionados con las coordenadas de torsión a lo largo de la cadena conjugada, por lo que cabe esperar que sean los modos de torsión los que presenten mayores problemas en su descripción, que es precisamente lo que se observó en el análisis de la matriz de Duschinsky calculada en coordenada internas de la Figura 6.16. Resulta interesante, además, que estas desviaciones aumentan cuanto mayor es el desplazamiento estructural entre los estados inicial y final, con  $\beta$ -caroteno (*cis-C<sub>i</sub>*)  $\gtrsim$   $\beta$ -caroteno (*cis-C<sub>2</sub>*)  $>$   $\beta$ -caroteno (*trans*)  $>$  violaxantina.



**Figura 6.21** – Representación de los valores absolutos de la matriz  $D$  de los 4 sistemas estudiados, centrando la escala para mostrar más claramente las regiones problemáticas, mostrando en negro todos los valores por encima de 0.1. Los elementos de las matrices corresponden a enlaces (1-95 para bcr[ $\beta$ -caroteno]; 1-99 para vio[violaxantina]), ángulos (96-189 para bcr; 100-197 para vio) y diedros (190-282 para bcr; 198-294 para vio)

**Tabla 6.6** – Valores representativos de la matriz **D** para el tránsito  $S_0 \rightarrow S_2$  de  $\beta$ -caroteno y violaxantina, usando dos conjuntos de coordenadas internas en cada caso: uno en el que las coordenadas internas se seleccionan al azar (R) y otro en el que se incluyen los enlaces, ángulos y diedros equivalentes.

$\beta$ -caroteno						
	Det <sup>a</sup>	Traza	Mín diag <sup>b</sup>	Máx diag <sup>c</sup>	MAD off-diag <sup>d</sup>	Av  off-diag  <sup>e</sup>
Ideal	1	282	1	1	0	0
<i>cis</i> -C <sub>i</sub> (E)	1.003	282.27	0.83	1.13	0.25	2.1·10 <sup>-3</sup>
<i>cis</i> -C <sub>i</sub> (R)	1.014	282.28	0.82	1.13	0.37	1.8·10 <sup>-3</sup>
<i>cis</i> -C <sub>2</sub> (E)	0.999	282.18	0.81	1.14	0.23	1.8·10 <sup>-3</sup>
<i>cis</i> -C <sub>2</sub> (R)	1.010	282.19	0.80	1.14	0.25	1.5·10 <sup>-3</sup>
<i>trans</i> (E)	0.999	282.11	0.83	1.12	0.24	1.4·10 <sup>-3</sup>
<i>trans</i> (R)	1.001	282.11	0.83	1.12	0.24	1.2·10 <sup>-3</sup>
Violaxantina						
Ideal	1	294	1	1	0	0
C <sub>2</sub> (E)	0.968	294.00	0.83	1.14	0.14	7.2·10 <sup>-4</sup>
C <sub>2</sub> (R)	0.979	294.01	0.83	1.22	0.22	7.2·10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Determinante de la matriz  
<sup>b</sup> Valor mínimo de los elementos de la diagonal  
<sup>c</sup> Valor máximo de los elementos de la diagonal  
<sup>d</sup> Máxima valor absoluto entre los términos fuera de la diagonal  
<sup>e</sup> Promedio de los valores absolutos de los términos fuera de la diagonal



Para completar el análisis de la matriz, nos centramos en el resto de parámetros de la Tabla 6.6. En esta se observa que, aunque la traza de  $\mathbf{D}$  proporciona el valor correcto, es decir, el número de modos de vibración,  $N_{vib}$ , algunos de los elementos de la diagonal muestran desviaciones apreciables de la unidad, y estas fluctuaciones son prácticamente idénticas para todos los sistemas, independientemente de la magnitud del desplazamiento estructural entre los estados involucrados en el tránsito electrónico. En lo que respecta a los elementos fuera de la diagonal, la desviación de los correspondientes a la matriz identidad (0), son más significativos para los sistemas con mayor desplazamiento estructural, siendo el menor valor absoluto promedio fuera de la diagonal el correspondiente a violaxantina. Además, resulta de gran relevancia que, tal y como se muestra en la Tabla 6.6, los valores de la matriz  $\mathbf{D}$  se ven afectados por el conjunto de coordenadas internas que se empleen: concretamente, cuando se emplean coordenadas internas se observa que la matriz  $\mathbf{D}$  se acerca más a la matriz unidad.

Cabe destacar que el buen acuerdo entre los espectros calculados con los modelos AH (Cart) y AH (int) para violaxantina, donde los modos apenas se desplazan entre un estado y otro y las coordenadas Cartesianas son adecuadas para describirlos, lo que valida el uso de las coordenadas internas. Además, teniendo en cuenta que el resto de sistemas muestra desviaciones similares de  $\mathbf{G}_1^{-1/2}\mathbf{G}_2^{1/2}$ , podemos considerar también correctos estos cálculos, aunque la relación directa entre la desviación de  $\mathbf{D}$  respecto la matriz identidad y el desplazamiento estructural entre el estado inicial y final, previene acerca del uso de coordenadas internas con modelos armónicos para desplazamientos muy grandes.

Por último, el empleo de coordenadas internas de valencia curvilíneas, como ángulos o diedros, se introducen términos cinéticos adicionales en el Hamiltoniano [Sibert 83, Capobianco 12]. Con el fin de poder emplear la aproximación armónica con las formulaciones TI y TD descritas en el Capítulo 4, en este trabajo hemos despreciado estos términos, asumiendo el límite amplitudes de vibración muy pequeñas, que resulta razonable dentro de la aproximación armónica. Sin embargo, para emplear un enfoque anarmónico resultará necesario considerar estos términos adicionales. Por otro lado, cabe también destacar que, en el caso de que las matrices métricas de los estados inicial y final fueran idénticas, estos términos curvilíneos también se anularían, por lo que podemos considerar, de forma cualitativa, el análisis de la matriz  $\mathbf{D}$  como un indicador de la validez de despreciar estos términos cinéticos adicionales.



## CAPÍTULO 7

# Conclusiones

En esta Tesis se hemos realizado estudios de sistemas biológicos de interés terapéutico y biotecnológico empleando herramientas de la química computacional, que incluyen métodos mecanocuánticos y de mecánica molecular, así como técnicas de muestreo conformacional, como dinámica molecular, y de simulación espectroscópica. Se ha tratado, en primer lugar, el efecto de ácidos grasos y carotenoides en membranas celulares, para centrarnos, a continuación, en los carotenoides, analizando su potencial función en fotosistemas y caracterizando algunas de sus propiedades espectroscópicas en profundidad. Las conclusiones más relevantes obtenidas en este trabajo son las siguientes:

**Primera.** Se ha desarrollado un campo de fuerzas empírico para los ácidos grasos oleico (OA) y 2-hidroioleico (2OHOA) con parámetros basados en los derivados por Kukol [Kukol 09] para fosfolípidos con un modelo de átomos-unidos. Con dicho campo se han estudiado las alteraciones estructurales y dinámicas producidas por los ácidos grasos OA y 2OHOA sobre dos bicapas lipídicas de tipo fosfatidilcolina (PC), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) y 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC), que son un buen modelo de membranas celulares. Se han realizado concretamente simulaciones de dinámica molecular de bicapas fosfolipídicas con ácidos grasos colocados tanto en el exterior de la misma, para investigar el proceso de inserción, como dispersos en su interior en distintas concentraciones.

**Segunda.** Las simulaciones del proceso de inserción de OA y 2OHOA en membranas celulares ponen de manifiesto que el mecanismo de inserción lleva consigo la formación de agregados de ácido graso que entran en bloque dentro de la membrana, formando así dominios de alta concentración de ácido graso en el interior de la misma. Se ha encontrado que los agregados intermedios de 2OHOA tardan más tiempo en disolverse en la membrana que los de OA.

**Tercera.** Se ha identificado la posición que ocupan los ácidos OA y 2OHOA dentro de la bicapa PC en fase fluida, que viene dictada por la interacción de los grupos carboxilo de los ácidos grasos con la región polar de la bicapa, formada por el grupo fosfocolina de los lípidos. Las cadenas de 2OHOA se sitúan ligeramente más cerca al grupo polar de la bicapa, como

consecuencia de la interacción del sustituyente hidroxilo que hay sobre el carbono 2 de esta molécula, que no se encuentra en OA. Dicha interacción da lugar también a diferencias en los parámetros de orden de deuterio,  $S_{CD}$ , calculados en las cadenas de OA y 2OHOA, para los carbonos adyacentes al grupo carboxilo.

**Cuarta.** Se ha descrito como varían las propiedades estructurales de las bicapas de DMPC y DPPC para distintas concentraciones de ácido graso OA y 2OHOA dispersas de forma homogénea en la membrana. En concreto, se produce una disminución del área por lípido al aumentar la concentración de ácido graso, dando lugar a un empaquetamiento compacto. En cuanto al parámetro de orden de deuterio de las cadenas de fosfolípido, las alteraciones tienen lugar, principalmente, en la zona intermedia de las cadenas y están relacionadas con la acción del doble enlace *cis* de los ácidos grasos. Las alteraciones estructurales causadas por los ácidos OA y 2OHOA son muy similares.

**Quinta.** Asimismo, se ha descrito la variación de propiedades dinámicas (de transporte) en la membrana con la concentración de ácido graso, encontrando un aumento del coeficiente de autodifusión de los fosfolípidos para concentraciones altas tanto de OA como de 2OHOA, lo que pone de manifiesto un efecto fluidizante de estas moléculas. La presencia de los ácidos grasos facilita además la permeabilidad de la membrana a moléculas hidrofóbicas. Nuevamente, el efecto producido por OA y 2OHOA es muy similar, como ocurre con la alteración de las propiedades estructurales.

**Sexta.** Para evaluar la protección antirradical de distintos conformeros de  $\beta$ -caroteno, se estudiado sus propiedades antioxidantes y antiredutoras usando los parámetros de poder electrodonador ( $\omega^-$ ) y electroaceptor ( $\omega^+$ ). Dichos parámetros se han calculado mediante la teoría del funcional de la densidad, usando en concreto el funcional B3LYP y la base 6-311G++(d,p), y el modelo del continuo polarizable (PCM) para describir el efecto de un disolvente polar, agua, y otro no polar, benceno. Se ha elaborado una escala de actividad antioxidante de isómeros de  $\beta$ -caroteno basada en el parámetro  $\omega^-$ , que está en buen acuerdo con los datos experimentales. En orden decreciente de carácter antioxidante, que es prácticamente independiente de la polaridad del medio, esta escala resulta ser la siguiente: 13,15-*dicis*  $\gtrsim$  9,13'-*dicis*  $\gtrsim$  9,13-*dicis*  $>$  9,9'-*dicis*  $\gtrsim$  9,15-*dicis*  $\gtrsim$  7,13'-*dicis*  $>$  13-*cis*  $\gtrsim$  9-*cis*  $\gtrsim$  15-*cis*  $>$  7-*cis*  $>$  *all-trans*  $>$  11-*cis*  $>$  11,11'-*dicis*.

**Séptima.** Se ha establecido la relación entre los parámetros  $\omega^-$  y  $\omega^+$ , que determinan el carácter antioxidante y antireductor, con la conformación de la cadena conjugada de los carotenoides, encontrando que ambos parámetros varían sistemáticamente con dicha conformación, como también ocurre con la energía vertical (EV) entre el estado fundamental y el excitado ( $S_2$ ). De este modo, se ha encontrado que los parámetros  $\omega^-$  dependen de la extensión de la conjugación a lo largo de la cadena, que disminuye al rotar los diedros que conectan dos dobles enlaces partiendo de la conformación *cis* o *trans*. Concretamente, al aumentar el sistema  $\pi$ -conjugado, aumentan también  $\omega^-$  y  $\omega^+$  y disminuye EV.

**Octava.** Basándonos la relación prácticamente lineal entre el parámetro  $\omega^-$  y el número de enlaces de un polieno para construir un modelo de longitud efectiva de cadena conjugada,

que permite cuantificar la extensión de la conjugación a lo largo de la cadena del carotenoide en función de la conformación de los diedros. Con este modelo, se puede dar un valor de la longitud efectiva de cadena conjugada a partir de la geometría del carotenoide y, a partir de aquella, se pueden estimar las propiedades relacionadas con las mismas, tales como los parámetros  $\omega^-$  y  $\omega^+$ , o EV.

**Novena.** Para  $\beta$ -caroteno, se han calculado los perfiles energéticos asociados a la rotación de los diedros definidos entre los átomos de carbono de la cadena conjugada, empleando la teoría del funcional de la densidad (DFT), con el funcional B3LYP y la base 6-31G(d). Los resultados muestran que las rotaciones asociadas a dobles enlaces conducen a especies biradicales para las conformaciones intermedias entre *cis* y *trans*, lo que da lugar a barreras energéticas muy altas, de unas 30 kcal/mol. En lo que respecta a las rotaciones alrededor de enlaces sencillos, el efecto de conjugación hace que las conformaciones más estables sean prácticamente la *cis* o la *trans*, siendo esta última la más estable, con barreras energéticas también relativamente altas, de unas 10-12 kcal/mol, aunque significativamente menores que en el caso de dobles enlaces. Una excepción a lo anterior está en la rotación de los enlaces que unen los anillos extremos de  $\beta$ -ionona con el resto de la cadena conjugada ( $D_{\text{anillo}}$ ), donde los efectos estéricos asociados al voluminoso anillo de ionona conducen a que las geometrías más estables sean intermedias entre *cis* y *trans* (nombradas generalmente como *s-cis*). En este caso, además, las barreras energéticas son de solo 1 o 2 kcal/mol, por lo que, a temperatura ambiente, la energía térmica puede producir la rotación de este diedro.

**Décima.** Se ha obtenido un campo de fuerzas para carotenoides con un modelo de todos los átomos, ajustando los parámetros para que reproduzcan los potenciales de los diedros obtenidos con DFT antes mencionados. Los parámetros resultantes son útiles tanto para la molécula empleada en los ajustes,  $\beta$ -caroteno, como para especies similares como la zeaxantina. De acuerdo con la estrategia de parametrización seguida, este campo de fuerzas es compatible con los campos de fuerzas de todos los átomos de la distribución CHARMM para proteínas (CHARMM27) y bicapas lipídicas (CHARMM36), lo que permite el estudio de carotenoides en distintos entornos biológicos, como membranas celulares o fotosistemas.

**Undécima.** Empleando el campo de fuerzas de todos los átomos desarrollado en este trabajo, se han realizado simulaciones de dinámica molecular de sistemas formados por bicapas lipídicas con un carotenoide inmerso en ellas,  $\beta$ -caroteno o zeaxantina, para analizar la dinámica conformacional de estas moléculas. Se encuentra que la distribución conformacional de las cadenas conjugadas dentro de la membrana es, en el caso de  $\beta$ -caroteno, muy similar a la distribución en disolución acuosa, siendo las conformaciones *s-cis* (referidas al diedro  $D_{\text{anillo}}$ , indicado anteriormente) las más probables. Para zeaxantina, se observa en disolución un comportamiento similar al de  $\beta$ -caroteno, en el seno de la membrana se estabiliza la conformación *trans* del diedro  $D_{\text{anillo}}$ , a causa de las interacciones entre los grupos hidroxilo de zeaxantina y con la región polar de la bicapa.

**Duodécima.** Se han realizado simulaciones de dinámica molecular con las técnicas de “Umbrella Sampling” de los sistemas formados por  $\beta$ -caroteno o zeaxantina inmersos en una bicapa de DMPC para calcular el potencial de fuerza media asociado a la orientación de las cadenas

dentro de la bicapa. Los resultados indican que, mientras que las moléculas de  $\beta$ -caroteno se orientan libremente en la membrana, evitando únicamente el contacto con la región polar, las moléculas de zeaxantina anclan sus dos extremos hidroxilo a las regiones polares de cada monocapa por medio de los grupos fosfocolina.

**Decimotercera.** Usando el modelo de longitud efectiva de cadena conjugada desarrollado en este trabajo, se ha evaluado la longitud efectiva de las moléculas de  $\beta$ -caroteno y zeaxantina inmersas en bicapas lipídicas a lo largo de las simulaciones de dinámica molecular. A partir de la relación de esta propiedad con los parámetros antiradicales y espectroscópicos se ha identificado en zeaxantina un aumento del poder antireductor, que intensifica la protección en membranas frente a procesos degenerativos, respecto a la situación fuera de la membrana. Esta variación no se observa en  $\beta$ -caroteno, en consonancia con los resultados experimentales y teóricos encontrados en la bibliografía. En cuanto a las propiedades espectroscópicas, la variación de la longitud efectiva a lo largo de la simulación, pone de manifiesto en ensanchamiento de la banda de absorción como consecuencia de la dinámica vibracional, que es relativamente alto, en buen acuerdo también con los resultados experimentales.

**Decimocuarta.** Se ha construido un modelo molecular de algunos fotosistemas que contienen  $\beta$ -caroteno, a partir de las estructuras cristalográficas recopiladas en la base de datos “RCSB Protein Data Bank”, incluyendo en ellos, además de las cadenas de caroteno, las moléculas de clorofila, y reconstruyendo las partes que quedan incompletas de dichos pigmentos en los datos cristalográficos. Estos modelos, junto con el campo de fuerzas desarrollado en este trabajo, han permitido optimizar de forma eficiente las geometrías de las estructuras de los carotenoides en estos complejos, encontrando que, aunque en la mayor parte de los casos todos los diedros de la cadena conjugada presentan una conformación *cis/trans*, algunos de ellos se optimizan en una conformación ligeramente distorsionada que parece confirmar las hipótesis de la presencia de cadenas retorcidas de los carotenoides en el seno de fotosistemas que pueden alterar sus propiedades. El modelo molecular presentado se postula, además, como el punto de partida para realizar simulaciones de estos sistemas.

**Decimoquinta.** Se han descrito los modos normales del isómero más estable de  $\beta$ -caroteno, con simetría  $C_i$ , a partir de la Hessiana calculada a nivel B3LYP/6-31G(d), empleando tanto coordenadas Cartesianas, que cumplen las condiciones de Eckart, como coordenadas internas, y se ha comprobando la equivalencia de ambos enfoques dentro de la aproximación armónica, que proporciona los mismos valores para las frecuencias armónicas. El uso de coordenadas Cartesianas fuera del marco de Eckart conduce a diferencias en las frecuencias de los modos pertenecientes a la representación totalmente simétrica ( $A_g$  en el grupo  $C_i$ ). Este hecho pone de manifiesto las limitaciones al definir sistemas de coordenadas, que emanan del denominado efecto de cambio de eje (*axis switching effect*), que repercute en la descripción simultánea de los modos normales de dos sistemas de coordenadas diferentes, como en el caso de transiciones entre dos estados electrónicos.

**Decimosexta.** Se han analizado las curvas de potencial asociadas a los modos normales de  $\beta$ -caroteno calculados en coordenadas Cartesianas y coordenadas internas. Se ha encontrado

que para los modos de torsión, las curvas de potencial que proporcionan las coordenadas Cartesianas se alejan excesivamente de la curva cuadrática asociada a la frecuencia armónica, mientras que en coordenadas internas, la curva de potencial se aproxima bastante bien al modelo armónico. Este hecho pone de manifiesto la mayor utilidad de las coordenadas internas para representar los movimientos de torsión dentro de la aproximación armónica.

**Decimoséptima.** Se han comparado los espectros IR y Raman del isómero  $C_i$  de  $\beta$ -caroteno calculados con el modelo armónico empleando la Hessiana calculada a nivel B3LYP/6-31G(d) con los datos experimentales tomados de la bibliografía. Se ha encontrado que, empleando el factor de escala recomendado para este método de cálculo, los espectros resultantes se encuentran en excelente acuerdo con los experimentales. Se ha analizado además el origen del efecto corrector del factor de escala, encontrando que el escalado es igualmente útil para los modos de simetría  $A_g$  y  $A_u$ . Los potenciales asociados a los distintos modos sugieren sin embargo que los modos de distinta simetría están afectados por distintos efectos anarmónicos, lo que apunta a que el escalado corrige principalmente los errores asociados al método DFT.

**Decimoctava.** Se han simulado las bandas de absorción correspondientes al tránsito  $S_0 \rightarrow S_2$ , a 77 y 300 K para tres conformeros de  $\beta$ -caroteno y uno de violaxantina. Para ello, se han implementado técnicas de simulación espectroscópica dependientes del tiempo (TD) y empleando representaciones en coordenadas internas de valencia (enlace, ángulos y diedros) en el programa *FCclasses* [Santoro 13], lo que permite, dentro de la aproximación armónica, simular espectros electrónicos con resolución vibracional a temperatura ambiente de moléculas de tamaño medio que presentan desplazamientos notables entre los mínimos de los estados electrónicos fundamental y excitado, como ocurre para algunos conformeros de  $\beta$ -caroteno.

**Decimonovena.** Comparando los espectros simulados usando las superficies de energía potencial (PESs), calculadas con los funcionales, B3LYP y CAM-B3LYP, junto con la base 6-31G(d), se encuentra para el isómero  $C_i$  de  $\beta$ -caroteno, que el funcional CAM-B3LYP da una posición de la banda más próxima a la experimental, mientras el funcional B3LYP reproduce mejor la estructura vibrónica. En cuanto al efecto del tamaño de la base, los resultados obtenidos con el funcional CAM-B3LYP y las bases 6-31G(d) y 6-31+G(d), donde la segunda introduce una función difusa sobre todos los átomos distintos de hidrógeno, indican que si bien la extensión de la base modifica ligeramente la posición de la banda, apenas se observan cambios en la estructura vibracional de la misma.

**Vigésima.** Para la simulación de los espectros electrónicos con resolución vibracional de  $\beta$ -caroteno y violaxantina, se han adoptado diferentes modelos, dentro del contexto de la aproximación armónica, para describir las superficies de potencial de los estados inicial y final. En todos los casos se reconstruye la PES del estado inicial en torno al mínimo, empleando la información de la Hessiana y, la superficie del estado final, o bien se reconstruye también, en torno al mínimo de este estado, dando lugar al modelo de Hessiana Adiabática (*Adiabatic Hessian*, AH), o bien se reconstruye en la región del mínimo del estado inicial, empleando en este caso la información del gradiente y la Hessiana, lo que

da lugar al modelo de Hessiana Vertical (*Vertical Hessian*, VH). Empleando coordenadas Cartesianas para representar los modos normales, se encuentra que el modelo VH proporciona mejores resultados que el modelo AH cuando hay grandes desplazamientos entre los mínimos de los estados inicial y final, como ocurren en los isómeros *cis* de  $\beta$ -caroteno. En el modelo VH, en el que se diagonaliza la Hessiana obtenida en un punto distinto del mínimo, pueden aparecer sin embargo frecuencias imaginarias, lo que es indicativo de la necesidad de emplear un modelo anarmónico, aunque en primera aproximación se puede mantener la aproximación armónica asignando valores arbitrarios reales a las frecuencias imaginarias.

**Vigésimoprimera.** Para la simulación de los espectros de  $\beta$ -caroteno y violaxantina, con el modelo AH, se han empleado también los modos normales definidos en coordenadas Cartesianas e internas, encontrando que las de coordenadas internas mejoran los resultados obtenidos con este modelo en el caso de grandes desplazamientos entre los mínimos del estado inicial y final. El origen de esta corrección se encuentra en la descripción más acertada que proporcionan las coordenadas internas de los modos normales de torsión para grandes desplazamientos, lo que mejora la matriz de Duschinsky que relaciona los modos normales de ambos estados. El uso de coordenadas internas, sin embargo, lleva asociado problemas de ortogonalidad de los modos normales definidos en dos conformaciones distintas, lo que puede limitar la calidad de los resultados. En concreto, para grandes desplazamientos entre los estados inicial y final, como ocurre en el isómero *cis*- $C_i$  de  $\beta$ -caroteno, el modelo VH, en coordenadas Cartesianas, da mejores resultados que el modelo AH en coordenadas internas.

**Vigésimosegunda.** Se ha evaluado por último el efecto del entorno en la forma de los espectros obtenidos en disolución. Para ello hemos empleado el modelo de solvatación implícita (PCM) en el cálculo de la Hessiana de los estados inicial y final. Nuestros resultados muestran para violaxantina que, al incluir el efecto del disolvente (piridina), la estructura vibracional de la banda de absorción se acerca más a la experimental, si bien su posición se desplaza a la zona de menor energía, alejándose del valor experimental que el espectro simulado en vacío.



## CAPÍTULO 8 / CHAPTER 8

# Summary and Conclusions

### 8.1. SUMMARY

Biological functions in living beings are conducted by rather specific entities, that have been perfected after millions of years of evolution. Not surprisingly, then, the activity of such systems is effectively enhanced by the presence of different molecules with concrete roles, such as controlling the structural properties, protecting against reactive species or actively participating in the actual functions of the system. Two remarkable examples of such biological moieties are cell membranes and photosystems, both of them formed by large bio-structures, lipid bilayers and protein complexes, respectively, which embed a wide variety of other small molecules, including fatty acids, that are present in membranes, and carotenoids, that are located both in membranes and photosystems.

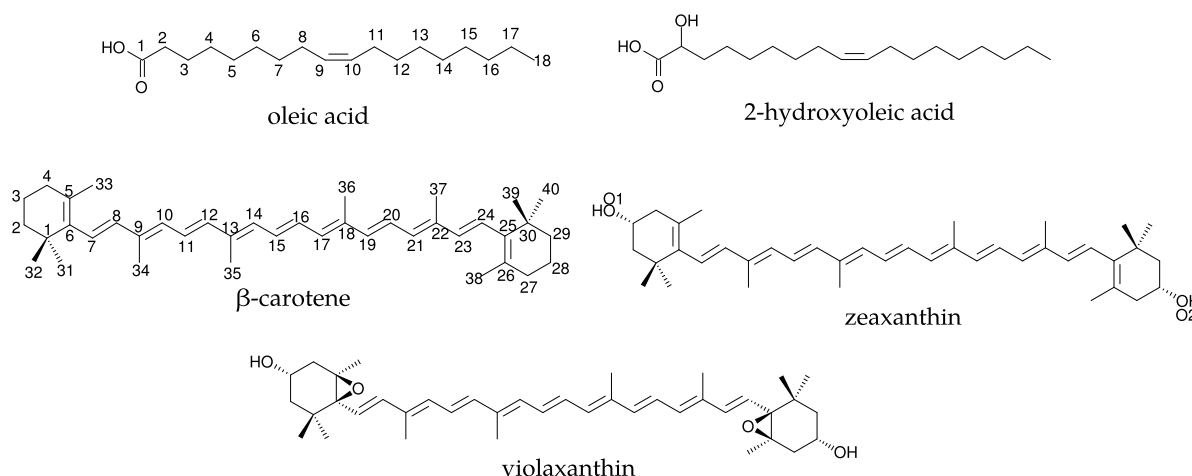
Regarding cell membranes, not only are they responsible for the physical separation of the cellular medium and the surrounding environment, but they also provide support for a large number of physiological processes that are conducted by related membrane proteins. Therefore, modifications of the bilayer structure can eventually result in drastic changes on the activity of these proteins, thus affecting the biological routes involved. This is indeed the basis for a novel group of medicinal treatments, called Membrane Lipid Therapies (MLT) [Escribá 06], which aim to revert a pathological state by perturbing the membranes that are involved in the targeted physiological path. In this context, fatty acids (FA) with *cis* double bonds are well known to be able to modify the membrane structure and, thus, they are scoped as drugs for this kind of therapies. For instance, oleic acid (OA), which is strongly related to the well-known Mediterranean Diet, has been shown to have beneficial effects on the health and, more recently, a synthetic derivative, 2-hydroxyoleic acid (2OHOA), has revealed as a more efficient therapeutic agent, with a remarkable activity against hypertension [Alemany 04, Alemany 06] and cancer [Alemany 04, Martínez 05, Borchert 08]. Having such promising characteristics, the pharmacological usage of this molecule has already been patented [Escriba 02]. Nonetheless, this therapeutic strategy will undoubtedly have further applications and it can still be exploited considering its potential selectivity, arising from the large variety of membrane compositions among living cells [Escribá 06], which, in principle, enables the distortion of an specific cell

type (2OHOA, for instance, has shown to selectively affect some tumorous cells [Martínez 05, Borchert 08]). As such, it is clearly highlighted that, in order to achieve that goal, we require a deeper understanding about the interaction that can lead to membrane perturbations and, eventually, would result in changes in membrane protein activity. The increasing interest on this field is actually responsible for the large amount of publications that have arisen in the last decade, including a number of computationally oriented works [Hyvönen 01, Knecht 06, Notman 07, Wong-ekkabut 07, Peters 09, Leekinjorn 09, Cordomi 10].

On the other hand, other undesirable modifications of the membranes can take place upon the attack of radical species, thus damaging the membranes through, e.g., lipid peroxidation [Wong-ekkabut 07], which is believed to be involved in different degenerative diseases [Markesbery 97, Diaz 97]. In this respect, the presence of carotenoids, whose antiradical character has been well established [Sies 95, Pérez-Gálvez 01], has actually been related to a reduced peroxidation in lipid bilayers [McNulty 07], which provide these molecules with a relevant therapeutic activity. The roots of such protective function are inherent to the electronic properties of the carotenoids, which can quench radical species by to either donating or accepting electron density [Cerón-Carrasco 10a]. Thus, it is expected to result in a different physiological mechanism as compared with that of fatty acids. However, the structural features do also play a very relevant role in this case, since upon the interactions between the membrane and the carotenoid, the conformation of both entities can be significantly modified [Gruszecki 05], which would influence the eventual effect of the carotenoid [McNulty 07]. Furthermore, carotenoids have also a very relevant function in photosynthetic species, where they are actually biosynthesized and located in the photosystems, which are big protein complexes are in charge of harvesting sunlight, thus promoting the electron transport that activates the photosynthesis. Within the photosystems, carotenoids act protecting against radical and overexcited molecules as well as capturing radiative energy and guiding it towards the reaction centre. In this case, these functions are dictated by both the antiradical character and the rich photochemistry of carotenoids.

These interesting properties of carotenoids are strongly related with their relatively large conjugated hydrocarbon chain, whose conformation can be remarkably distorted upon specific interactions present in complex biological environment, such as membranes and photosystems. This perturbations can effectively modify the properties of the carotenoids, what has been suggested to tune the activity of this molecules within the aforementioned bio-structures [Koyama 91, Polívka 04]. Therefore, understanding the relation between the structure and the electronic properties becomes essential in order to describe and predict the the antioxidant and spectroscopic properties. Furthermore, the latter would also require to evaluate the potential energy surface of the the different low-lying excited states that give rise to intricate photochemical pathways upon light absorption.

In the present Thesis, we aim to gain some insight on the functions of some fatty acids and carotenoids, whose structure is shown in Figure 8.1, within membranes and photosystems. To that end, we first focus on the therapeutic and protective roles against degenerative processes, evaluating the interactions and structural changes that occur in these bio-structures. For the case of carotenoids, whose properties provide them with relevant roles within both membranes and photosystems, we have further investigated their spectroscopic properties, analyzing the potential energy surfaces of the ground and the one-photon allowed excited state.



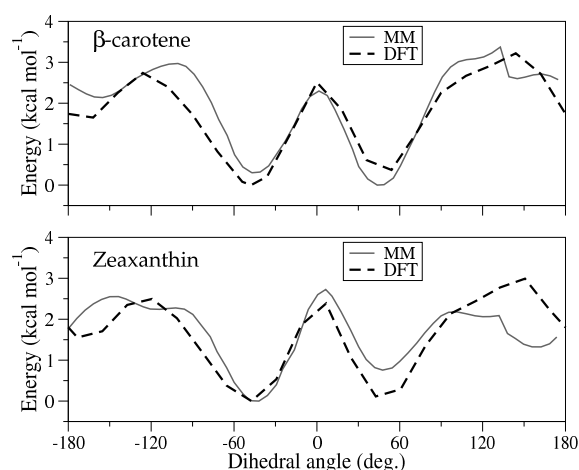
**FIGURE 8.1** – Molecular structures of the molecules whose properties are evaluated in this thesis, including two fatty acids: oleic acid and 2-hydroxyoleic acid, and three carotenoids:  $\beta$ -carotene, zeaxanthin and violaxanthin. The reference atomic labels are also included.

### 8.1.1. Protection within biological environments: from fatty acids to carotenoids

A reliable evaluation of any system requires the development of molecular models that contain the essential features of the chemical and physical processes in which we are interested. In our case, investigating the mutual effect between heterogeneous bio-macromolecules and other, smaller, biological species unavoidably requires the explicit consideration of very large entities, such as sections of lipid bilayers or whole protein complexes. Furthermore, the size of the systems guides the selection of the most appropriate method to evaluate the interactions within the system. In the case of big sized ones, as those here considered, with thousands of atoms, the only affordable methodology consists in the Molecular Mechanics method, which requires the availability of well parametrized force fields to describe every single particle in the system. Indeed, the selection of such force field becomes the first aspect to be addressed in our study.

For the case of the most relevant biochemical building blocks, such as aminoacids, nucleic acids, carbohydrates and lipids, thoroughly validated parametrizations exist and, indeed, we have selected standard force fields to describe either the bio-membranes or the proteins. Concretely, two different models have been applied to describe the phosphocholine (PC) lipid bilayers, which required different parametrization. On one hand, to study of the effect of fatty acids on cell membranes, a united-atom model has been selected and a recent parametrization for the PC lipids by Kukol [Kukol 09] has been used. On the other hand, a more detailed all-atoms representation has revealed necessary to analyze the functions of carotenoids and the CHARMM36 force field [Klauda 10] selected in this case to describe the membrane PC lipids. As for the study of photosystems, which basically consists of an ensemble of large protein complexes, the all-atoms CHARMM27 force field [Mackerell 04] has been used.

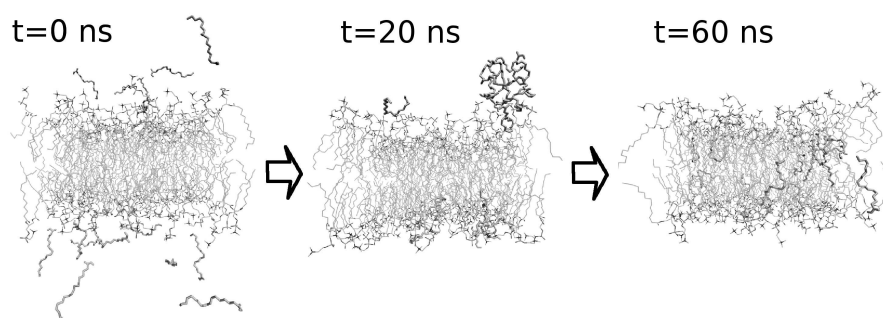
The description of other molecules with a lower predominance in biological systems is, unfortunately, as standardized as the case of proteins and membranes. Therefore, we have decided



**FIGURE 8.2** – Potential energy plots for  $\beta$ -carotene and zeaxanthin related to the rotation along the dihedral defined by C5-C6-C7-C8, which connects the ionone ring with the rest of the polyenic chain, computed at both DFT level (B3LYP/6-31G(d)) and with Molecular Mechanics (MM) using the force field developed in this work.

to build up our own force fields for fatty acids and carotenoids, which allowed us to focus the parametrization on the specific features in which we are more interested. Additionally, the derived parameters need to be compatible with those used for the rest of the molecules within the system. For fatty acids, OA and 2OHOA, we have adapted the oleate tails within some PC lipids that are already parametrized by Kukol, thus guaranteeing good compatibility between both species in the system. For the case of carotenoids, however, no parametrization existed, prior to the publication of the Thesis, which focused on the dihedral conformation along the polyenic chain, which is of paramount importance to investigate the distortions of this chain within biological system. Therefore, we have developed new parameters, for  $\beta$ -carotene and zeaxanthin, specifically, compatible with CHARMM all-atoms force fields, primarily targeting the potential energy curves associated with the rotation of the dihedral. And, as reference data, we have used the energetic plots computed at DFT level, using B3LYP functional along with the 6-31G(d) Pople style basis set for  $\beta$ -carotene, since that theoretical level has been shown useful to evaluate the structure of different carotenoids [Requena 08, Cerón-Carrasco 09a]. Among all the dihedrals, the one defined along carbons C5-C6-C7-C8 (see Figure 8.1) is the one displaying the lower energy barriers, being the most easily perturbed within biological systems, and it is, thus, very important to properly reproduce the reference energy plot with our force field for this dihedral. Precisely, a good match between the results provided by the force field and the reference data are found for both  $\beta$ -carotene and zeaxanthin, as shown in Figure 8.2, which show the validity of our parameters to describe the conformation of both carotenoids.

Once the models for all the molecules are properly build, we can use them to investigate the targeted systems in depth. The study of sizable models require to sample a large part of the multidimensional PES in order to draw reliable conclusions, and we have resorted to Molecular Dynamics simulations to obtain representative ensembles at the experimental pressure and temperature. In addition to the conformational sampling, this method provides valuable



**FIGURE 8.3** – Snapshots taken along a trajectory describing the insertion of oleic acid molecules within the membrane, at an initial (left), intermediate (centre) and final (right) time of the dynamics.

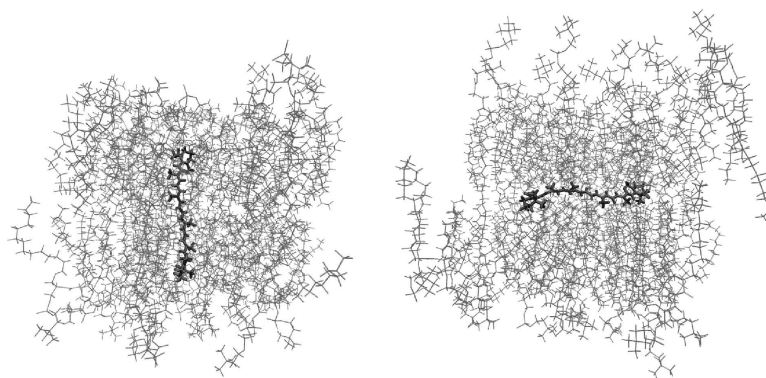
information about the dynamical behaviour of the system.

We have first focus on the effect of the fatty acids OA and 2OHOA on the structure of PC lipid bilayers. Fatty acids are incorporated to the organism through the diet, therefore, it is interesting to understand how they find their way into the membranes, and we have simulated the insertion of fatty acids, initially placed outside the membrane. Our results prove the feasibility of this process and, also important, describe an specific mechanism for this process, depicted in Figure 8.3, where the evolution of the fatty acids towards the membrane is presented for one of the simulations. Interestingly, it is shown that fatty acids aggregate before they dissolve into the membrane, what leads to a region of the membrane with high FA concentration. This results indicates that, even if the incorporated concentration of FA is not too large, there could be regions of the membrane with very large concentration and, consequently, we have subsequently study PC bilayer with different concentrations of FA homogeneously dispersed. Our results show that for concentrations of both OA and 2OHOA above 30%, significant changes on the structural and dynamical properties of the membrane occur, mainly due to the “kinked” *cis* conformation of the fatty acids tail. Such modification can then be connected with their efficiency in the context of MLT. Additionally, given their differentiated therapeutic activities, some distinct effects on the membrane properties are expectable between both fatty acids. Indeed, our results show some clear differences, as the position of the fatty acid in the bilayer, which are anchored to the polar heads through the carboxyl group. Concretely, in the case of 2OHOA, the presence of the hydroxyl substituent over carbon 2 up-shifts the position of this fatty acids towards the lipid polar heads. Interestingly, the additional hydroxyl on 2OHOA also results in a different disposition of carbons C1 to C4, as indicated by the respective order parameters. Another difference was identified along the insertion process, as the 2OHOA aggregates remain without dissolving inside the membrane for longer times. In conclusion, we have pointed out several differences between OA and 2OHOA, which could be further connected with their differentiated therapeutic power. However, this differences are rather small, their actual relation with the subsequent membrane properties modification should be further evaluated in perspective works in order to be able to rationally tailor the drug design in Membrane Lipid Therapies.

In the case of carotenoids, we have, initially, focused on their electronic properties, which

are evaluated by means of density functional theory (DFT) computations. Firstly, we have specifically explored the potential energy surface associated with the dihedral angles along the polyenic chain of  $\beta$ -carotene and zeaxanthin, identifying the structures with minimum energy. It is observed that the dihedral angle defined along C5-C6-C7-C8 is the one with the lower energy barriers for both  $\beta$ -carotene and zeaxanthin (see Figure 8.2), which is a consequence of the steric hindrance of the bulky ionone ring. As a consequence the rotation along this dihedral will be certainly possible at room temperature. Secondly, we have evaluated the ability of carotenoids to either accept or donate electron charge, which is eventually for their antioxidant and antireductant character. We have found that parameters describing partial electron transfer can be more suitable than the ionization potential and electron affinity to describe the reactivity of carotenoid towards radical quenching. We specifically use the electrodonating ( $\omega^-$ ) and electroaccepting ( $\omega^+$ ) powers, which have been proposed by Gázquez et al. [Gázquez 07] based on the electrophilicity index originally introduced by Parr et al. [Parr 99]. We have computed both parameters at different conformations along the PES of  $\beta$ -carotene, including the most stable isomers. Our results allow us to establish an scale of antioxidant character as function of the conformation, i.e., the relative ability of  $\beta$ -carotene isomers to quench radical species by donating electronic density. This scale, which has been shown to be rather independent on the polarity of the environment, actually identifies the 9- and 15-*cis* isomers as the most effective antioxidant agents, which agrees quite well with the experimental data available, thus validating our model. As for the intermediate geometries in the PES, it has been shown that both  $\omega^-$  and  $\omega^+$ , together with the vertical energy between the ground state ( $S_0$ ) and one-photon allowed excited state ( $S_2$ ), correlate similarly with the conformation of the dihedral angles along the polyenic chain, which, eventually, is found to be related to the extension of the  $\pi$ -conjugated system in every structure, since the conjugation is reduced as the dihedral connecting to adjacent double bonds deviates from either 0 or 180°. Based on these correlations, we were able to elaborate a model to quantify the effective conjugated chain length, which defines this quantity in terms of the dihedral conformation. Interestingly, this model provide a way to estimate the electronic properties of carotenoids from the structural information.

It is worth noticing that the results from the evaluation of the electronic properties of carotenoids at quantum mechanical level, has been used to develop the tools to reliably describe the system at molecular mechanical level, as the force field for carotenoids previously introduced or the effective conjugated chain model. Therefore, we can now approach the study of this molecules within biological environments. Let us start with the behaviour of carotenoids within lipid bilayers, which is studied by molecular dynamics simulations using the model systems with one carotenoid embedded in a 72-DPPC lipid bilayer, as those depicted in Figure 8.4. Concretely, we have carried out the simulations with two carotenoids,  $\beta$ -carotene and zeaxanthin, with the same structure, except for the hydroxyl groups over the ionone rings in zeaxanthin, which allow us to evaluate the effect of this polar atoms in the xanthophyll. The simulations indeed reveal a well differentiated dynamics for both carotenoids, as that of zeaxanthin is significantly affected by the electrostatic interaction of the hydroxyl groups with the lipid polar heads in the bilayer. Indeed, this effects dictates the orientation of the carotenoid within the membrane and modifies the conformational distribution of dihedral angles as compared with the results in aqueous solution. On the contrary,  $\beta$ -carotene is orientated more freely inside the



**FIGURE 8.4** – Molecular models consisting of a lipid bilayer with 72 DPPC molecules in which a carotenoid,  $\beta$ -carotene or zeaxanthin, is embedded. Two different initial orientations of the carotenoid are shown. The water molecules above and below the bilayer are not shown.

membrane and the dihedral distribution is the same both in water and within the membrane. Regarding the barrier crossings, however, both molecules display the same effect, as the crossing rate is significantly lowered inside the bilayer as compared with the dynamic in water, thus indicating that the rotation is impeded in the membrane. Interestingly, the differences degree of perturbation over both  $\beta$ -carotene and zeaxanthin upon interaction the the lipid bilayer results in a enhanced antireductant character of zeaxanthin over that of  $\beta$ -carotene. Therefore, zeaxanthin is expected to more properly quench damaging agents such as superoxyde anion ( $O_2^-$ ) by accepting electron charge [Galano 10], and this results agrees very well with the superior protective activity of zeaxanthin towards lipid peroxidation in membranes [McNulty 07].

Finally, we have approached the photosynthetic systems with  $\beta$ -carotene molecules embedded. As these entities are much more complex that the model lipid bilayers considered before, their modelization poses some additional issues. Concretely, the structures, which were taken from a crystallographic database (“RCSB Protein Data Bank”), contained a large number of missing atoms, as a consequence of the limited resolution. Among the variety of molecules present, at this initial stage of the study, in which we are primarily focus on the conformational distribution of carotenoids, we have only retained the most abundant species, that is, the protein complex and the two groups of pigments: chlorophylls and carotenoids. The missing atoms the protein have then been introduced using an homology modelling protocol [Guex 97] and for chlorophylls, which lack the flexible phytol chain and part of the porphyrin ring, the molecule has been completed stepwise, ensuring the lowest steric hindrance of the resulting structure, while ensuring the correct stereochemistry. Once the structure was complete, the interactions are described using an all-atoms model, that consisted in CHARMM based parameters for both the protein [Mackerell 04] and the chlorophylls [Foloppe 95], and the force field here developed for the  $\beta$ -carotene molecules.

In the last decade or so, a total of 26 structures of photosystems with  $\beta$ -carotene embedded, including PS-I, PS-II and cytochrome, have been resolved and introduced in the PDB database. For all this structures we have first measured the dihedral angles along the polyenic chain

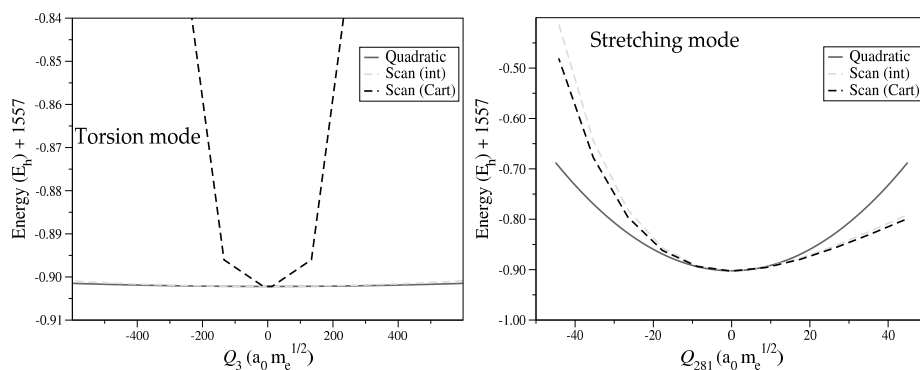
of  $\beta$ -carotene, and found that those with the highest resolution lead to structures describing the most stable structures devised in the PES computed *in vacuo*, with all dihedral except the one connecting the ionone ring with the rest of the chain, which shows a large dispersion of values, displaying well *cis/trans* conformation, while we conclude that those with poor resolution should, in principle, be discarded for further analysis. We have then focused on one of the best resolved structures which contains the most stable  $\beta$ -carotene *monocis* and *dicis* isomers which, additionally, have been identified to display enhanced antioxidant properties according with our model based on the electrodonating power ( $\omega^-$ ). To further evaluate the structures, we have performed an optimization on two of them, with both good and poor resolution. The optimized structure for the one with good resolution retained almost the original structure, which validates our parametrization. On the contrary, almost all rotated dihedrals within the poorly resolved structures were restored to a *cis/trans* conformation, although some of them seem to still show a twisted geometry. This preliminary results reveal encouraging to explore the conformation of carotenoids within photosystems, to investigate the potential distortions that may take place upon the specific interactions of within the complicated structure of the photosystems, which may potentially tune the properties of these pigments.

### 8.1.2. Spectroscopy and excited states of carotenoids

The relevant roles of carotenoids within photosystems, which include (photo)protection, energy transfer and light absorption, are directly connected with the ground and low-lying electronic excited states, which mainly originate from the conjugated chain, thus giving rise to the same levels that can be identified in polyenes. It seems therefore evident, then, that, in order to deeply understand such functions, a good knowledge of the PESs associated with those states is required. In this sense, we should be aware of the experimental and theoretical issues that arise when trying to elucidate the nature of the different levels, which have prevented a definitive view about the structure of excited states in carotenoids to date [Polívka 09b]. In Figure 8.6, we show a qualitative representation of the different levels that have been identified in different carotenoids, mainly thanks to the development of fast time-resolved spectroscopies. We have to take into account that the level ordering is approximate (build for data found for lycopene) as it is affected by the conjugation length [Polívka 10], and levels  $3A_g^-$  and  $1B_u^-$  can be above the  $S_2$  state for small polyenic chains. Furthermore, there is still an open debate about the nature of the  $S^*$  state, which shows the complexity of the photochemistry of carotenoids. From the computational point of view, some difficulties arise to describe some of the states, such as  $S_1$ ,  $3A_g^-$  and  $1B_u^-$ , due to their double excitation character. Indeed, although methods to properly compute such state do exist, they are still too costly to allow an exploration of the PES, and therefore we have focused in this work on the  $S_2$  states, which can be properly characterized by TD-DFT, so, gradient and Hessian are available for medium sized systems, such as carotenoids.

We have first addressed the exploration of the ground state (GS) potential energy surface, which have been described in terms of the harmonic approximation, where the PES is expanded with a quadratic function around the minimum, using the information provided by the Hessian compute at this point. This gives rise to the description of uncoupled normal modes, which can

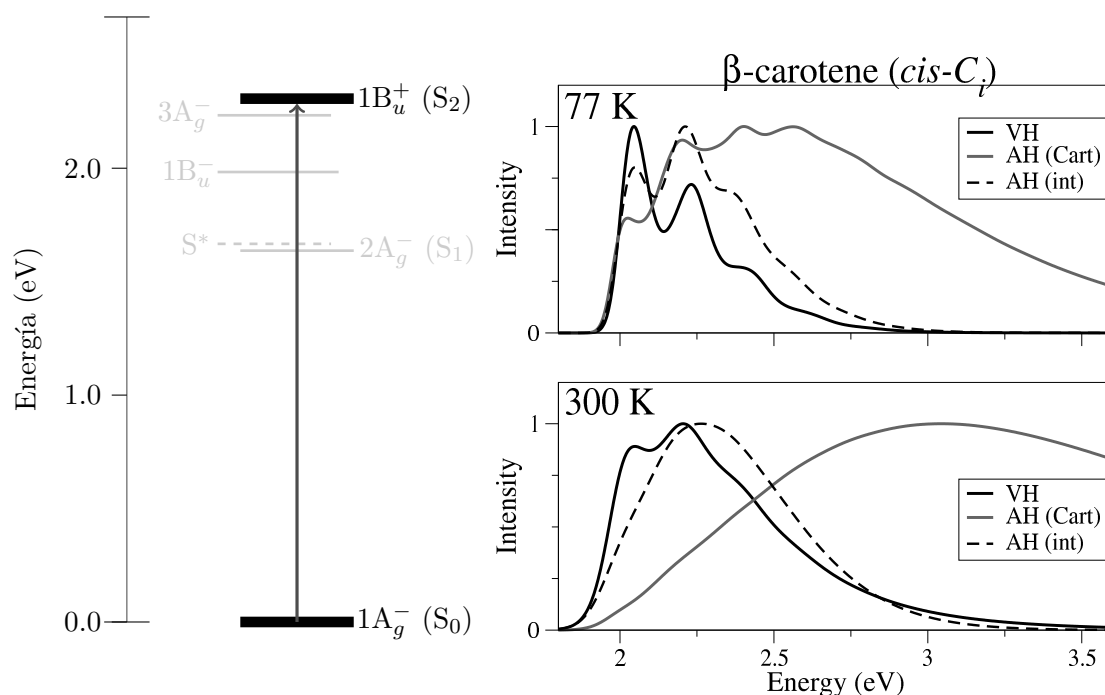




**FIGURE 8.5** – Potential energy scan along the normal modes defined in Cartesian and internal coordinates for torsion (left) and stretching (right) modes of  $\beta$ -carotene.

be defined in terms of any coordinate frame. A linear relation is normally used, which would only be valid for small displacements around the minimum. The range at which such first order description remains valid depends on the ability of the coordinates to describe the normal mode displacements. Concretely, the linear nature of Cartesian coordinates makes them unsuitable to describe the curvilinear modes, such as torsions. In this context, valence internal coordinates which include bond length, angles and dihedrals, can describe the molecular vibrational dynamics in a more natural way. For the case of  $\beta$ -carotene we have performed the normal mode analysis in both Cartesian and internal coordinates and found that, although the harmonic frequencies obtain with either approach are the same, the description of large amplitude motions of normal modes can differ significantly. To show this point further, in Figure 8.5, we have included the potential energy computed while scanning two different normal modes, one associated with a torsion and other with a bond stretching, defined in both Cartesian and internal coordinates. In agreement with our discussion, our results show that, while for the stretching mode both representation give a similar energy profile, for the torsion, very different curves are obtained with each representation, with the one in internal coordinates being much closer to the quadratic curve corresponding to the harmonic frequency of this mode. This clearly shows the usefulness of internal coordinates to describe curvilinear displacements.

Once the PESs at both  $S_0$  and  $S_2$  states are described, as indicated for the GS above, this information can be used to simulate the vibrationally resolved electronic spectra. In this work, we have adopted a time-dependent (TD) scheme [Mukamel 85] which allow the proper simulation of the vibronic spectra at finite temperatures, overcoming the computational limitations that arise for large systems with time-independent (TI) approaches. To that end, the TD formulation to compute the spectra at the harmonic approximation [Tang 03, Ianconescu 04, Peng 10, Borrelli 11, Borrelli 12] has been implemented in the code *FCclasses* [Santoro 13], developed by Dr. Fabrizio Santoro. To describe the harmonic PES, both Cartesian and internal coordinates can be used, as indicated above and, in addition, different models are in use to perform the spectroscopic simulations, which differ on the points where the quadratic PES is expanded [Avila Ferrer 12]. Concretely, the initial state PES is described around the minimum, as presented for the GS, but different choices are possible for the final state of the transition. First of all, it can be build from its minimum, in a similar fashion as it is done initial state, and this gives



**FIGURE 8.6** – Approximate scheme of the low-lying states of carotenoids (left). On the right, the simulated vibronic bands corresponding to the one-photon allowed transition,  $S_0 \rightarrow S_2$ , are shown at two different temperatures and using three different models within the harmonic approximation.

rise to a model named Adiabatic Hessian (AH), which can be treated in both Cartesian and internal coordinates, which we have labelled as AH (Cart) and AH (int). Second, the PES can be constructed at the GS minimum, that is, at the Franck-Condon point, using the information of both the gradient and Hessian in the excited state, given rise to the so-called Vertical Hessian (VH) model, that we have only treated in Cartesian coordinates. We should note that AH (Cart) and VH models were already available in *FCclasses* while AH (int) has been implemented in the code for this work.

One limitation of the harmonic approach may arise when a large displacement occurs from the minimum structures of both initial and final states. In this case, the issues encountered with Cartesian coordinates to describe curvilinear modes can introduce a large error on the spectra. This is indeed the case for some carotenoids, as for  $\beta$ -carotene, for which the dihedral connecting the ionone ring actually undergoes significant displacement. As described previously, internal coordinates can be useful to overcome these problems and, indeed, they have already been suggested to be used in case of large displacements between initial and final minima [Reimers 01, Borrelli 06]. Furthermore, the VH model, in which normal modes of both states are defined at the same point, can also be useful to provide accurate spectra in the harmonic approximation, even using Cartesian coordinates. In this work, we have simulated the spectrum of the different isomers of  $\beta$ -carotene arising from the rotation of the ionone ring (see Figure 8.2), at cryogenic (77 K) and room temperature ( $\sim 300$  K), using all the models introduced within the harmonic level: AH (Cart), AH (int) and VH. In Figure 8.6, we show the spectrum simulated with all models for the  $S_0 \rightarrow S_2$  of the most stable isomer of  $\beta$ -carotene, where it is clearly observed that

AH (Cart) model results in a excessively over-broadened spectrum, which has been shown to be a consequence of the poor description of torsion normal modes, as indicated previously, thus supporting the use of either AH (int) and VH models. We need to note, however, that these two approach are still limited by some issues. For instance, with AH (int), additional kinetic terms enter the Hamiltonian due to the curvilinear nature of internal coordinates, which has been neglected in this work assuming small-amplitude vibrations, and for VH, the diagonalization if the Hessian computed in a point different from the minimum can give rise to imaginary frequencies. Both limitations will be extremely relevant when facing anharmonic effects, and their treatment is therefore scoped for future studies. Also interestingly, when the displacement between the initial and final normal modes is not large, as occurs for violaxanthin, AH (int) and AH (Cart) deliver almost the same results.

Finally, we would like to note that, to our knowledge, no finite temperature spectra of carotenoids simulated without any empirical parameter (except for a broadening function) were available before the publication of this Thesis, and therefore, our results can be useful to be compared with the experimental spectra, which can be of help to clarify different effects, such as the changes with the temperature.

## 8.2. CONCLUSIONS

Within this Thesis, we have carried out the study of biological systems with either therapeutic or biotechnological interest, using computational chemistry tools, including quantum mechanics and molecular mechanics methods, as well as conformational sampling techniques, such as molecular dynamics (MD), and spectroscopic simulations. Firstly, the effect of both fatty acids and carotenoids on cell membranes have been evaluated, to subsequently focus on the latter pigments, analysing their potential role within photosystems and evaluating some of their spectroscopic properties in depth. The main conclusion drawn from this work are summarized as follows:

- First.** An empiric force field has been developed to describe the fatty acids oleic acid (OA) and 2-hydroxyoleic acid (2OHOA) using parameters based on those derived by Kukol [Kukol 09] for phospholipids using an united-atoms model. This has allowed the evaluation of structural and dynamical modifications produced by the fatty acids OA and 2OHOA on two phosphatidylcholine (PC) lipid bilayers, 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), which are a good model for cell membranes. Concretely, molecular dynamics simulations have been carried out for phospholipid bilayers with fatty acids placed both outside the membrane, to investigate the insertion process, and dispersed inside the bilayer at different concentrations.
- Second.** The insertion process of OA and 2OHOA in cell membranes have been simulated, whose mechanism involves the formation of fatty acids aggregates that eventually enter the bilayer as a block, giving rise to high fatty acid concentrations within the bilayer. It has been found that 2OHOA aggregates take longer timer to dissolve within the bilayer.
- Third.** The position of both OA and 2OHOA within the PC bilayer in the fluid phase has been identified, finding that it is dictated by the interaction between the carboxyl group of the fatty acids and the bilayer polar region, formed by the phosphocholine group. 2OHOA chains are placed slightly closer to the bilayer polar groups, as a consequence of the interaction of the hydroxyl substituent over C2 carbon, that is not present in OA. Furthermore, such distinct interaction also leads to differences on the deuterium order parameters,  $S_{CD}$ , computed for both OA and 2OHOA, for the neighbouring carbons around the carboxyl group.
- Fourth.** The changes of the structural properties on DMPC and DPPC bilayers has been described for different concentrations of fatty acids OA and 2OHOA, which were dispersed homogeneously in the membrane. Concretely, a reduction of the area per lipid is found as the fatty acid concentration increases, resulting in a compact packing. As for the order parameter of the phospholipid tails, they undergo some modifications, mainly, on the central part of the chain, which is related with the effect of the *cis* double bond of either fatty acid. It is also relevant that the structural modifications caused by both OA and 2OHOA are very similar.

**Fifth.** Furthermore, the changes on the dynamic (transport) properties as function of the fatty acid concentration has also been described, finding an increasing of the self-diffusion coefficient for the phospholipids for high fatty acid concentrations, from which the fluidizant effect of fatty acids can be concluded. In addition, the presence of fatty acids facilitates the membrane permeability towards hydrophobic molecules. Again, the effect produced by both OA and 2OHOA is very similar, as it was the case for the changes of the structural properties.

**Sixth.** In order to evaluate the antiradical protection of different conformers of  $\beta$ -carotene, their antioxidant and antireductant properties have been evaluated in terms of the electrodonating ( $\omega^-$ ) and electroaccepting ( $\omega^+$ ) powers, respectively, which are computed by means of density functional theory, with the B3LYP functional and the 6-311G++(d,p) basis set, and the polarizable continuum model (PCM) to describe the effect a polar (water) and hydrophobic (benzene) solvents. So, in terms of the  $\omega^-$  parameter, an antioxidant scale has been derived, including some isomers of  $\beta$ -carotene, which is in good agreement with the experimental data. In decreasing order of antioxidant character, which is practically independent on the solvent polarity, this scale turns to be: 13,15-*dicis*  $\gtrsim$  9,13'-*dicis*  $\gtrsim$  9,13-*dicis*  $>$  9,9'-*dicis*  $\gtrsim$  9,15-*dicis*  $\gtrsim$  7,13'-*dicis*  $>$  13-*cis*  $\gtrsim$  9-*cis*  $\gtrsim$  15-*cis*  $>$  7-*cis*  $>$  *all-trans*  $>$  11-*cis*  $>$  11,11'-*dicis*.

**Seventh.** The relationship between the parameters that determine the antioxidant and antireductant powers,  $\omega^-$  and  $\omega^+$ , with the conformation of the carotenoid conjugated chain has been established, finding that both parameters change systematically with the conformation, as is also found for the vertical energy (VE) between the ground and excited ( $S_2$ ) states. It has been then determined that such parameters depend on the extent of the conjugation along the chain, which decreases when dihedral angles connecting two double bonds are rotated from their *cis* or *trans* conformations. Concretely, as the  $\pi$ -conjugated system is extended, both  $\omega^-$  and  $\omega^+$  increase and VE decreases.

**Eighth.** Considering the practically linear relation between  $\omega^-$  and the number of double bonds of a polyene, a model for the effective conjugated chain length has been built, which allows to quantify the extent of the conjugation along the carotenoid chain as function of the dihedral conformation. With this model, from the geometry of the carotenoid, a value for the effective conjugated length can be obtained and, in turn, it can be used to estimate the properties related with this length, such as the parameters  $\omega^-$  and  $\omega^+$ , or VE.

**Ninth.** For  $\beta$ -carotene, the energetic profiles associated with the rotation of the all the dihedrals defined along the polyenic chain have been computed, using the density functional theory, with the B3LYP functional and the 6-31G(d) basis set. The results show that the rotations associated with double bonds lead to biradical species for the intermediate conformations between *cis* and *trans*, giving rise to very high energy barriers, of about 30 kcal/mol. As for the rotations around single bonds, the conjugation effect makes that, in general, the most stable conformations correspond, approximately, to *cis* or *trans* geometries, being the latter more stable, and with energy barriers also relatively high, of about 10-12 kcal/mol, although they are smaller as compared with double bonds. A remarkable

exception is the case the rotation around the dihedral connecting the ionone ring with the rest of the polyenic chain ( $D_{\text{ring}}$ ), where the steric effects of the bulky ionone ring result in intermediate geometries, between *cis* and *trans* (normally named as *s-cis*), being the more stable. Furthermore, in this case, the energy barriers are only 1-2 kcal/mol high, and therefore, at room temperature, the thermal energy can produce the rotation around this dihedral.

**Tenth.** An all-atoms force field have been derived for carotenoids, adjusting the parameters to reproduce the DFT-computed potential plots associated with the dihedrals previously introduced. The resulting parameters reveal useful to describe the molecule use in the fitting process,  $\beta$ -carotene, as well as similar species, such as zeaxanthin. According to the strategy followed here, this force field is compatible with the all-atoms CHARMM force fields, as those for proteins (CHARMM27) or lipid bilayers (CHARMM36), which allows the study of carotenoids within different biological systems, such as membranes or photosystems.

**Eleventh.** Using the all-atom force field developed in this work, molecular dynamics simulations have been conducted for systems formed by lipid bilayers and an embedded carotenoid, either  $\beta$ -carotene or zeaxanthin, to evaluate the conformational dynamics of these molecules. We found that the conformation of the conjugated chain within the membranes is, in the case of  $\beta$ -carotene, very similar to that distribution obtained with a simulation in aqueous solution, with *s-cis* conformations (referred to the  $D_{\text{ring}}$  dihedral) being the most probable. For zeaxanthin, however, even though the behaviour in solution is similar to that observed for  $\beta$ -carotene, inside the membrane the *trans* conformation of the  $D_{\text{ring}}$  dihedral is stabilized, as a consequence of the interactions between the hydroxyl groups in zeaxanthin and the polar bilayer region.

**Twelfth.** Molecular dynamics simulations have been carried out using the Umbrella Sampling technique for these systems formed by  $\beta$ -carotene or zeaxanthin embedded in a DMPC bilayer, which has allowed us to compute the potential of mean force associated with the orientation of the chains inside the bilayer. The results indicate that, while  $\beta$ -carotene molecules are almost freely oriented within the membrane, only avoiding direct contact the the polar region, those of zeaxanthin are anchored to the polar phosphocholine groups of each monolayer through the hydroxyl groups.

**Thirteenth.** By means of the effective conjugated chain length developed in this work we have evaluated the effective length of  $\beta$ -carotene and zeaxanthin molecules embedded in lipid bilayer, along a molecular dynamics simulation. From the relationship of this property with the antiradical and spectroscopic parameters, a rise of the antireductant character of zeaxanthin is identified as compared with that in aqueous solution, which enhances its protective role within the membrane. Such a change is not observed for  $\beta$ -carotene and, interestingly, our results can satisfactorily explain the experimental observations. As for the spectroscopic properties, from the variability of the effective conjugated chain length along the simulation, the vibrational broadening of the spectrum at the simulated temperature has been estimated, finding that it is relatively large, in agreement with the experimental results.

**Fourteenth.** A molecular model for some photosystems containing  $\beta$ -carotene has been built from the crystallographic structures compiled in the “RCSB Protein Data Bank” database, including, in addition to the  $\beta$ -carotene chains, the chlorophyll molecules, fixing the partially incomplete parts of this pigment originally found in the crystallographic data. These models, together with the force field developed in this work for carotenoids, allow to efficiently optimize the geometries of all the carotenoids found in the crystallographic structures for two photosystems, finding that although most of them show a *cis/trans* conformation, some of them are optimized to a distorted conformation, what seems to confirm the hypothesis about the presence of twisted carotenoid chains inside photosystems, thus modifying their properties. The molecular model here presented is then proposed as starting point to conduct molecular dynamics simulations of these systems.

**Fifteenth.** The normal modes of the most stable isomer of  $\beta$ -carotene, which has  $C_i$  symmetry, have been described from the Hessian computed at B3LYP/6-31G(d) level, using both Cartesian coordinates, fulfilling the Eckart conditions, and valence internal coordinates (i.e., bond lengths, angles and dihedrals), first confirming the equivalence of both approaches within the harmonic approximation, as they provide the same harmonic frequencies. The use of Cartesian coordinates without introducing the Eckart frame lead to slightly different frequencies for the modes belonging to the totally symmetric representation ( $A_g$  in the  $C_i$  group). This fact highlights the limitations when defining different coordinates frames, known as the axis switching effect, what would have an effect the simultaneous description of normal modes defined at two different geometries, as the case of transitions between two electronic states.

**Sixteenth.** The potential energy curves associated with the scan of normal modes of  $\beta$ -carotene have been analyzed, defining the modes in both Cartesian and internal coordinates. We have found that in the case of modes that describe a torsion, the curves along the modes in terms of Cartesian coordinates strongly deviate from the corresponding quadratic curve associated with the harmonic frequency, while in the case of mode defined in terms of internal coordinates, the potential energy curve reasonably approaches the harmonic model. This makes evident the usefulness of internal coordinates to describe the torsion movements with a harmonic representation.

**Seventeenth.** The IR and Raman spectra of the  $C_i$  isomer of  $\beta$ -carotene, calculated with the harmonic model using the B3LYP/6-31G(d) computed Hessian, with the experimental results found in the bibliography. We have found that, by using a scaling factor appropriate for this method, the resulting spectra are in excellent agreement with the experiments. The origin of this correcting effect for the scaling factor has been analyzed more in detail, finding that the correction is equally useful for modes of both  $A_g$  and  $A_u$  symmetry, while the potential scans along those modes suggest that different anharmonic effects should apply for each one. This indicates that the scaling factor should mainly correct the error associated with the DFT method.

**Eighteenth.** For three conformers of  $\beta$ -carotene and one of violaxanthin, the vibronic bands associated with the  $S_0 \rightarrow S_2$  transition has been simulated at both 77 and 300 K. To that

end, time dependent simulation techniques and models in internal coordinates have been implemented in the *FCclasses* program [Santoro 13], what allows, in the framework of the harmonic approximation, to simulate vibrationally electronic spectra at room temperature of medium-sized molecules that undergo significant displacements between the minima of the initial and final states, as it is the case for some conformers of  $\beta$ -carotene.

**Nineteenth.** Comparing the spectra simulated from the potential energy surfaces (PES), and its derivatives, computed with two different functional, B3LYP and CAM-B3LYP, along with the 6-31G(d) basis set, it is found that, in the case of the  $\beta$ -carotene and zeaxanthin, the CAM-B3LYP functional results in a band with a more accurate energetic position in the spectrum, although the vibrational structure is better reproduced with the B3LYP functional. As for the effect of the size of the basis set, we have compared the results with the functional CAM-B3LYP along with the 6-31G(d) and 6-31+G(d) basis sets, the latter having an extra diffuse function in every non-hydrogen atom, and found that although the position of the band is slightly shifted to lower energies with the extended basis, hardly any change is observed in the vibrational structure.

**Twentieth.** For the simulation of the vibrationally resolved electronic spectra of  $\beta$ -carotene and violaxanthin, different models have been adopted, within the harmonic approximation, to describe the PES of the initial and final states. In all the cases, the initial state PES is reconstructed around the minimum, using the information provided by the Hessian and, for the final states two models are possible. Those consists in either also building the PES around the minimum, giving rise to the Adiabatic Hessian (AH) model, or at the structure corresponding to the initial states minimum, using the information of the gradient and Hessian from the final state, which is known as Vertical Hessian (VH) model. Using Cartesian coordinates to describe the normal modes, VH models is found to give better results as compared with AH in the case of large structural displacements from the initial and final states that occur for the *cis* isomers of  $\beta$ -carotene. However, with the VH model, the diagonalization of the Hessian is conducted at a point that is not a minimum and, therefore, imaginary frequencies may arise, as happened in our case. This is an indicator about the need of using anharmonic models, although at a first approximation, in this work we have retained the harmonic approximation giving reasonable real arbitrary values to the imaginary frequencies.

**Twenty-first.** Furthermore, the simulation of the spectra of  $\beta$ -carotene and violaxanthin have been computed within the AH model, using the normal modes defined in both Cartesian and internal coordinates, finding that the use of internal coordinates improves the results provided by the AH model in the case of large displacements between the minima of initial and final states. The origin of this correction is located in the better description of the torsion normal modes for large displacements, what improves the Duschinsky matrix that related the normal modes at the initial and final states. The use of internal coordinates, however, lead to some orthogonality issues for normal modes defined for different conformations, what can limit the quality of the results. Concretely, for large displacements between the minima at the initial and final states, as is the case for the isomer *cis-C<sub>i</sub>* of  $\beta$ -carotene, the VH model in Cartesian coordinates, provide better results than the AH



one in internal coordinates.

**Twenty-second.** Finally, we have evaluated the effect of the environment on the shape of the spectra obtained in solution. To that end, we have applied the polarizable continuum model (PCM) to compute the Hessian at the initial and final states. Our results for violaxanthin show that, when the effect of the solvent (pyridine) is included, the vibrational structure of the absorption band gets closer to the experimental one, as compared with the result *in vacuo*, although its position of the band is shifted towards lower energies, thus moving away from the experimental one, even further than in the case of the simulation *in vacuo*.



# Bibliografía

- [Alemany 04] R. Alemany, S. Terés, C. Baamonde, M. Benet, O. Vogler y P. V. Escribá. *2-Hydroxyoleic Acid. A New Hypotensive Molecule*. Hypertension, vol. 43, páginas 249–254, 2004.
- [Alemany 06] Regina Alemany, Oliver Vögler, Silvia Terés, Carolina Egea, Carmela Baamonde, Francisca Barceló, Carlos Delgado, Karl H. Jakobs y Pablo V. Escribá. *Antihypertensive action of 2-hydroxyoleic acid in SHR via modulation of the protein kinase A pathway and Rho kinase*. J. Lip. Res., vol. 47, no. 8, páginas 1762–1770, 2006.
- [Allen 87] M.P. Allen y C.J. Tildesley. Computer simulation of liquids. Oxford University Press, 1987.
- [Allinger 77] Norman L. Allinger. *Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms*. J. Am. Chem. Soc., vol. 99, no. 25, páginas 8127–8134, 1977.
- [Allinger 89] Norman L. Allinger, Young H. Yuh y Jenn Huei Lii. *Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1*. J. Am. Chem. Soc., vol. 111, no. 23, páginas 8551–8566, 1989.
- [Allinger 96] Norman L. Allinger, Kuohsiang Chen y Jenn-Huei Lii. *An improved force field (MM4) for saturated hydrocarbons*. J. Comput. Chem., vol. 17, no. 5-6, páginas 642–668, 1996.
- [Almlöf 95] Jan Almlöf. *Direct Methods in Electronic Structure Theory*. En David Yarkony, editor, Modern Electronic Structure Theory, Capítulo 3. World Scientific, 1995.
- [Amunts 07] Alexey Amunts, Omri Drory y Nathan Nelson. *The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution*. Nature, vol. 447, no. 7140, páginas 58–63, May 2007.
- [Amunts 10] Alexey Amunts, Hila Toporik, Anna Borovikova y Nathan Nelson. *Structure Determination and Improved Model of Plant Photosystem I*. J. Biol. Chem., vol. 285, no. 5, páginas 3478–3486, 2010.
- [Andersen 80] H. C. Andersen. *Molecular dynamics simulations at constant pressure and/or temperature*. J. Chem. Phys., vol. 72, páginas 2384–2393, 1980.

- [Andersson 95] Per Ola Andersson y Tomas Gillbro. *Photophysics and dynamics of the lowest excited singlet state in long substituted polyenes with implications to the very long-chain limit*. J. Chem. Phys., vol. 103, no. 7, páginas 2509–2519, 1995.
- [Andzelm 95] Jan Andzelm, Christoph Kölmel y Andreas Klamt. *Incorporation of solvent effects into density functional calculations of molecular energies and geometries*. J. Chem. Phys., vol. 103, no. 21, páginas 9312–9320, 1995.
- [Anezo 03] C. Anezo, A. H. de Vries, H. D. Holtje, D. P. Tieleman y S. J. Marrink. *Methodological Issues in Lipid Bilayer Simulations*. J. Phys. Chem. B, vol. 107, páginas 9424–9433, 2003.
- [Atkins 04] P.W. Atkins y R.S. Friedman. *Molecular quantum mechanics*. Oxford, 2004.
- [Avila Ferrer 12] Francisco Jose Avila Ferrer y Fabrizio Santoro. *Comparison of vertical and adiabatic harmonic approaches for the calculation of the vibrational structure of electronic spectra*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 14, páginas 13549–13563, 2012.
- [Bachar 04] Michal Bachar, Patrick Brunelle, D. Peter Tieleman y Arvi Rauk. *Molecular Dynamics Simulation of a Polyunsaturated Lipid Bilayer Susceptible to Lipid Peroxidation*. J. Phys. Chem. B, vol. 108, no. 22, páginas 7170–7179, 2004.
- [Bachar 10] Michal Bachar, Patrick Brunelle, D. Peter Tieleman y Arvi Rauk. *Molecular Dynamics Simulation of a Polyunsaturated Lipid Bilayer Susceptible to Lipid Peroxidation*. J. Phys. Chem. B, vol. 114, no. 50, páginas 17002–17002, 2010.
- [Baniulis 09] Danas Baniulis, Eiki Yamashita, Julian P. Whitelegge, Anna I. Zatsman, Michael P. Hendrich, S. Saif Hasan, Christopher M. Ryan y William A. Cramer. *Structure-Function, Stability, and Chemical Modification of the Cyanobacterial Cytochrome b6f Complex from Nostoc sp. PCC 7120*. J. Biol. Chem., vol. 284, no. 15, páginas 9861–9869, 2009.
- [Baranyai 90] A. Baranyai y Evans D. J. *New Algorithm for Constrained Molecular-Dynamics Simulation of Liquid Benzene and Naphthalene*. Mol. Phys., vol. 70, páginas 53–63, 1990.
- [Barceló 04] F. Barceló, J. Prades, S. S. Funari, J. Frau, R. Alemany y P. V. Escribá. *The hypotensive drug 2-hydroxyoleic acid modifies the structural properties of model membranes*. Mol. Membr. Biol., vol. 21, página 261, 2004.
- [Barone 12] Vincenzo Barone, Alberto Baiardi, Malgorzata Biczysko, Julien Bloino, Chiara Cappelli y Filippo Lipparini. *Implementation and validation of a multi-purpose virtual spectrometer for large systems in complex environments*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 14, páginas 12404–12422, 2012.
- [Bastida 07] A. Bastida, C. Cruz, J. Zúñiga, A. Requena y B. Miguel. *The Ehrenfest method with quantum corrections to simulate the relaxation of molecules in solution*:

- Equilibrium and dynamics.* J. Chem. Phys., vol. 126, páginas 14503–14514, 2007.
- [Beauchamp 12] Kyle A. Beauchamp, Yu-Shan Lin, Rhiju Das y Vijay S. Pande. *Are Protein Force Fields Getting Better? A Systematic Benchmark on 524 Diverse NMR Measurements.* J. Chem. Theory Comput., vol. 8, no. 4, páginas 1409–1414, 2012.
- [Becke 88] A.D. Becke. *Density-Functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior.* Phys. Rev. B, vol. 38, páginas 3098–3100, 1988.
- [Becke 93] A.D. Becke. *A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories.* J. Chem. Phys., vol. 98, páginas 1372–1377, 1993.
- [Berendsen 81] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren y J. Hermans. In *intermolecular forces*, Capítulo Interaction models for water in relation to protein hydration, página 331. Reidel, Dordrecht, The Netherlands, 1981.
- [Berendsen 84] H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, A DiNola y J. R. Haak. *Molecular dynamics with coupling to an external bath.* J. Chem. Phys., vol. 81, páginas 3684–3690, 1984.
- [Berendsen 91] H.J.C. Berendsen. *Transport Properties Computed by Linear Response through Weak Coupling to a Bath.* En Madeleine Meyer y Vassilis Pontikis, editores, *Computer Simulation in Materials Science*, volume 205 of *NATO ASI Series*, páginas 139–155. Springer Netherlands, 1991.
- [Berendsen 95] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel y R. van Drunen. *GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation.* Comp. Phys. Comm., vol. 91, páginas 43–56, 1995.
- [Berger 97] O. Berger, O. Edholm y F. Jahnig. *Molecular Dynamics Simulations of a Fluid Bilayer of Dipalmitoylphosphatidylcholine at Full Hydration, Constant Pressure, and Constant Temperature.* Biophys. J., vol. 72, páginas 2002–2013, 1997.
- [Besler 90] Brent H. Besler, Kenneth M. Merz y Peter A. Kollman. *Atomic charges derived from semiempirical methods.* J. Comput. Chem., vol. 11, no. 4, páginas 431–439, 1990.
- [Biczysko 11] Malgorzata Biczysko, Julien Bloino, Fabrizio Santoro y Vincenzo Barone. *Time-independent approaches to simulate electronic spectra lineshapes: From small molecules to macrosystems*, Capítulo 8, páginas 361–443. John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [Biesiadka 04] Jacek Biesiadka, Bernhard Loll, Jan Kern, Klaus-Dieter Irrgang y Athina Zouni. *Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2 Å resolution: a closer look at the Mn-cluster.* Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 6, páginas 4733–4736, 2004.

- [Birge 86] Robert R. Birge. *Two-photon spectroscopy of protein-bound chromophores*. Acc. Chem. Res., vol. 19, no. 5, páginas 138–146, 1986.
- [Bloino 10] Julien Bloino, Malgorzata Biczysko, Fabrizio Santoro y Vincenzo Barone. *General Approach to Compute Vibrationally Resolved One-Photon Electronic Spectra*. J. Chem. Theory Comput., vol. 6, no. 4, páginas 1256–1274, 2010.
- [Böhm 02] Volker Böhm, Ni Luh Puspitasari-Nienaber, Mario G. Ferruzzi y Steven J. Schwartz. *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of  $\alpha$ -Carotene,  $\beta$ -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 50, no. 1, páginas 221–226, 2002.
- [Borchert 08] G. H. Borchert, M. Giggey, F. Kolar, T. M. Wong, P. H. Backx y P. V. Escriba. *2-Hydroxyoleic acid effects cardiomyocyte  $[Ca^{2+}]_i$  transient and contractility in a region-dependent manner*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol, vol. 294, páginas H1948–H1995–134, 2008.
- [Borrelli 06] Raffaele Borrelli y Andrea Peluso. *The vibrational progressions of the  $N \rightarrow V$  electronic transition of ethylene: A test case for the computation of Franck-Condon factors of highly flexible photoexcited molecules*. J. Chem. Phys., vol. 125, no. 19, página 194308, 2006.
- [Borrelli 11] Raffaele Borrelli y Andrea Peluso. *The temperature dependence of radiationless transition rates from ab initio computations*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 13, páginas 4420–4426, 2011.
- [Borrelli 12] Raffaele Borrelli, Amedeo Capobianco y Andrea Peluso. *Generating Function Approach to the Calculation of Spectral Band Shapes of Free-Base Chlorin Including Duschinsky and Herzberg-Teller Effects*. J. Phys. Chem. A, vol. 116, no. 40, páginas 9934–9940, 2012.
- [Brooks 09] B. R. Brooks, C. L. Brooks III, A. D. Mackerell, L. Nilsson, R. J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caffisch, L. Caves, Q. Cui, A. R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, y M. Karplus. *CHARMM: The Biomolecular simulation Program*. J. Comput. Chem., vol. 30, páginas 1545–1615, 2009.
- [Broser 10] Matthias Broser, Azat Gabdulkhakov, Jan Kern, Albert Guskov, Frank Müh, Wolfram Saenger y Athina Zouni. *Crystal Structure of Monomeric Photosystem II from Thermosynechococcus elongatus at 3.6-Å Resolution*. J. Biol. Chem., vol. 285, no. 34, páginas 26255–26262, 2010.
- [Broser 11] Matthias Broser, Carina Glöckner, Azat Gabdulkhakov, Albert Guskov, Joachim Buchta, Jan Kern, Frank Müh, Holger Dau, Wolfram Saenger y Athina Zouni. *Structural Basis of Cyanobacterial Photosystem II Inhibition*

- by the Herbicide Terbutryn*. J. Biol. Chem., vol. 286, no. 18, páginas 15964–15972, 2011.
- [Busquets 94] M. A. Busquets, C. Mestres, M. A. Alsina, J. M. Garcia Antón y F. Reig. *Miscibility of dipalmitoylphosphatidylcholine, oleic acid and cholesterol measured by DSC and compression isotherms of monolayers*. Thermochim. Acta, vol. 232, páginas 261–269, 1994.
- [Bussi 07] G. Bussi, D. Donadio y M. Parrinello. *Canonical sampling through velocity rescaling*. J. Chem. Phys., vol. 126, página 014101, 2007.
- [Calhoun 12] Tessa R. Calhoun, Jeffrey A. Davis, Matthew W. Graham y Graham R. Fleming. *The separation of overlapping transitions in  $\beta$ -carotene with broadband 2D electronic spectroscopy*. Chem. Phys. Lett., vol. 523, no. 0, páginas 1–5, 2012.
- [Cammi 05] R. Cammi, S. Corni, B. Mennucci y J. Tomasi. *Electronic excitation energies of molecules in solution: State specific and linear response methods for nonequilibrium continuum solvation models*. J. Chem. Phys., vol. 122, no. 10, página 104513, 2005.
- [Capobianco 12] Amedeo Capobianco, Raffaele Borrelli, Canio Noce y Andrea Peluso. *Franck-Condon factors in curvilinear coordinates: the photoelectron spectrum of ammonia*. Theor. Chem. Acc., vol. 131, páginas 1–10, 2012.
- [Case 05] D. A. Case, T. E. Cheatham, III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang y R. Woods. *The Amber biomolecular simulation programs*. J. Comput. Chem., vol. 26, páginas 1668–1688, 2005.
- [Cederbaum 76] L. S. Cederbaum y W. Domcke. *A many-body approach to the vibrational structure in molecular electronic spectra. I. Theory*. J. Chem. Phys., vol. 64, páginas 603–611, 1976.
- [Ceperly 80] D.M. Ceperly y B.J. Alder. *Ground State of the Electron Gas by a Stochastic Method*. Phys. Rev. Lett., vol. 45, páginas 566–569, 1980.
- [Cerezo 13] J. Cerezo y F. Santoro. *TDspectrum, a routine for TD calculations within FCclasses*, 2013.
- [Cerón-Carrasco 09] J. P. Cerón-Carrasco, A. Bastida, J. Zúñiga, A. Requena y B. Miguel. *Density Functional Theory Study of the Stability and Vibrational Spectra of the  $\beta$ -Carotene Isomers*. J. Phys. Chem. A, vol. 113, no. 36, páginas 9899–9907, 2009.
- [Cerón-Carrasco 10a] J. P. Cerón-Carrasco, A. Bastida, A. Requena, J. Zúñiga y B. Miguel. *A Theoretical Study of the Reaction of  $\beta$ -Carotene with the Nitrogen Dioxide Radical in Solution*. J. Phys. Chem. B, vol. 114, no. 12, páginas 4366–4372, 2010.

- [Cerón-Carrasco 10b] J. P. Cerón-Carrasco, A. Requena y C. M. Marian. *Theoretical study of the low-lying excited states of  $\beta$ -carotene isomers by a multireference configuration interaction method*. Chem. Phys., vol. 373, no. 1–2, páginas 98–103, 2010.
- [Cerón-Carrasco 09] José Pedro Cerón-Carrasco. *Modelización teórica en entornos biológicos: estudio de la interacción entre pares de bases de ADN y del carácter antioxidante de los carotenoides*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 2009.
- [Chapman 11] Henry N. Chapman, Petra Fromme, Anton Barty, Thomas A. White, Richard A. Kirian, Andrew Aquila, Mark S. Hunter, Joachim Schulz, Daniel P. DePonte, Uwe Weierstall, R. Bruce Doak, Filipe R. N. C. Maia, Andrew V. Martin, Ilme Schlichting, Lukas Lomb, Nicola Coppola, Robert L. Shoeman, Sascha W. Epp, Robert Hartmann, Daniel Rolles, Artem Rudenko, Lutz Foucar, Nils Kimmel, Georg Weidenspointner, Peter Holl, Mengning Liang, Miriam Barthelmess, Carl Caleman, Sebastien Boutet, Michael J. Bogan, Jacek Krzywinski, Christoph Bostedt, Sasa Bajt, Lars Gumprecht, Benedikt Rudek, Benjamin Erk, Carlo Schmidt, Andre Homke, Christian Reich, Daniel Pietschner, Lothar Struder, Gunter Hauser, Hubert Gorke, Joachim Ullrich, Sven Herrmann, Gerhard Schaller, Florian Schopper, Heike Soltau, Kai-Uwe Kuhnel, Marc Messerschmidt, John D. Bozek, Stefan P. Hau-Riege, Matthias Frank, Christina Y. Hampton, Raymond G. Sierra, Dmitri Starodub, Garth J. Williams, Janos Hajdu, Nicusor Timneanu, M. Marvin Seibert, Jakob Andreasson, Andrea Rocker, Olof Jonsson, Martin Svenda, Stephan Stern, Karol Nass, Robert Andritschke, Claus-Dieter Schroter, Faton Krasniqi, Mario Bott, Kevin E. Schmidt, Xiaoyu Wang, Ingo Grotjohann, James M. Holton, Thomas R. M. Barends, Richard Neutze, Stefano Marchesini, Raimund Fromme, Sebastian Schorb, Daniela Rupp, Marcus Adolph, Tais Gorkhover, Inger Andersson, Helmut Hirsemann, Guillaume Potdevin, Heinz Graafsma, Bjorn Nilsson y John C. H. Spence. *Femtosecond X-ray protein nanocrystallography*. Nature, vol. 470, no. 7332, páginas 73–77, February 2011.
- [Chiu 95] S. W. Chiu, M. Clark, V. Balaji, S. Subramaniam, H. L. Scott y E. Jakobsson. *Incorporation of Surface Tension into Molecular Dynamics Simulation of an Interface: A Fluid Phase Lipid Bilayer Membrane*. Biophys. J., vol. 69, páginas 1230–1245, 1995.
- [Christensson 09] Niklas Christensson, Franz Milota, Alexandra Nemeth, Jaroslaw Sperling, Harald F. Kauffmann, Tõnu Pullerits y Jürgen Hauer. *Two-Dimensional Electronic Spectroscopy of  $\beta$ -Carotene*. J. Phys. Chem. B, vol. 113, no. 51, páginas 16409–16419, 2009. PMID: 19954155.
- [Cogdell 87] Richard J. Cogdell y Harry A. Frank. *How carotenoids function in photosynthetic bacteria*. Biochim. Biophys. Acta, Rev. Bioenerg., vol. 895, no. 2, páginas 63–79, 1987.



- [Cong 08] Hong Cong, Dariusz M. Niedzwiedzki, George N. Gibson y Harry A. Frank. *Ultrafast Time-Resolved Spectroscopy of Xanthophylls at Low Temperature*. J. Phys. Chem. B, vol. 112, no. 11, páginas 3558–3567, 2008.
- [Cordomi 10] A. Cordomi, J. Prades, J. Frau, O. Vogler, S. S. Funari, J. J. Perez, P. V. Escribá y F. Barceló. *Interactions of fatty acids with phosphatidylethanolamine membranes: X-ray diffraction and molecular dynamics studies*. J. Lipid Res., vol. 51, páginas 1113–1124, 2010.
- [Cornell 95] Wendy D. Cornell, Piotr Cieplak, Christopher I. Bayly, Ian R. Gould, Kenneth M. Merz, David M. Ferguson, David C. Spellmeyer, Thomas Fox, James W. Caldwell y Peter A. Kollman. *A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules*. J. Am. Chem. Soc., vol. 117, no. 19, páginas 5179–5197, 1995.
- [Damjanović 02] Ana Damjanović, Ioan Kosztin, Ulrich Kleinekathöfer y Klaus Schulten. *Excitons in a photosynthetic light-harvesting system: A combined molecular dynamics, quantum chemistry, and polaron model study*. Phys. Rev. E, vol. 65, no. 3, página 031919, Mar 2002.
- [Dapprich 99] Stefan Dapprich, István Komáromi, K. Suzie Byun, Keiji Morokuma y Michael J. Frisch. *A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives*. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, vol. 461-462, páginas 1–21, 1999.
- [Darden 93] T. Darden, D. York y L. Pedersen. *Particle mesh Ewald: An  $N\text{-log}(N)$  method for Ewald sums in large systems*. J. Chem. Phys., vol. 98, páginas 10089–10092, 1993.
- [Diaz 97] M. N. Diaz, B. Frei, J. A. Vita y J. F. Keane. *Mechanisms of disease-antioxidants and atherosclerotic heart disease*. N. Engl. J. Med., vol. 337, páginas 408–416, 1997.
- [Douliez 95] J. P. Douliez, A. Leonard y E. J. Dufourc. *Restatement of Order Parameters in Biomembranes - Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings*. Biophys. J., vol. 68, páginas 1727–1739, 1995.
- [Dreuw 05] Andreas Dreuw y Martin Head-Gordon. *Single-Reference ab Initio Methods for the Calculation of Excited States of Large Molecules*. Chem. Rev., vol. 105, no. 11, páginas 4009–4037, 2005.
- [Dunlap 83] B. I. Dunlap. *Fitting the Coulomb potential variationally in X alpha molecular calculations*. J. Chem. Phys., vol. 78, no. 6, páginas 3140–3142, 1983.
- [Durell 94] Stewart R. Durell, Bernard R. Brooks y Arieh Ben-Naim. *Solvent-Induced Forces between Two Hydrophilic Groups*. J. Phys. Chem., vol. 98, no. 8, páginas 2198–2202, 1994.

- [Duschinsky 37] F. Duschinsky. *On the Interpretation of Electronic Spectra of Polyatomic Molecules. I. The Franck-Condon Principle*. Acta Physicochim.: URSS, vol. 7, páginas 551–566., 1937.
- [Eckart 35] Carl Eckart. *Some Studies Concerning Rotating Axes and Polyatomic Molecules*. Phys. Rev., vol. 47, páginas 552–558, Apr 1935.
- [Edberg 86] R. Edberg, Evans D. J. y Morriss G. P. *Constrained Molecular-Dynamics Simulations of Liquid Alkanes with a New Algorithm*. J. Chem. Phys., vol. 84, páginas 6933–6939, 1986.
- [Egberts 88] E. Egberts y H. J. C. Berendsen. *Molecular dynamics simulation of a smectic liquid crystal with atomic detail*. J. Chem. Phys., vol. 89, no. 6, páginas 3718–3732, 1988.
- [Eichinger 00] M. Eichinger, H. Heller y H. Grubmuller. *EGO - An efficient molecular dynamics program and its application to protein dynamics simulations*. En Rüdiger Esser, Peter Grassberger, Johannes Grotendorst y Marius Lewerenz, editores, Workshop on Molecular Dynamics on Parallel Computers, páginas 154–174, Singapore 912805, 2000. World Scientific.
- [Escriba 02] Pablo V. Escriba. *Use of hidroxiolic acid and similar compounds in the production of medicaments*, 2002.
- [Escribá 03] P. V. Escribá, J. M. Sanchez-Dominguez, R. Alemany, J. S. Perona y V. Ruiz-Gutierrez. *Alteration of lipids, G proteins, and PKC in cell membranes of elderly hypertensives*. Hypertension, vol. 41, páginas 176–182, 2003.
- [Escribá 06] P. V. Escribá. *Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine*. Trends Mol. Med., vol. 12, páginas 34–43, 2006.
- [Escribá 08] P. V. Escribá, J. M. González-Rosb, F. M. Go ni, L. Vigh, L. Sánchez-Magraner, P. K. J. Kinnunen, A. M. Fernández, X. Busquets, I. Horváth y G. Barceló-Coblijn. *Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies*. J. Cell. Mol. Med., vol. 12, páginas 829–875, 2008.
- [Escudero 98] A. Escudero, J. C. Montilla, J. M. Garcia, M. C. Sanchez-Quevedo, J. L. Periago, P. Hortelano y M. D. Suarez. *Effect of dietary (n9), (n6) and (n3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1394, páginas 65–73, 1998.
- [Ewald 21] P. Ewald. *Die Berechnung optischer und elektrostatischer Gitterpotentiale*. Ann. Phys., vol. 369, páginas 253–287, 1921.
- [Farag 12] Marwa Hamdi Farag. *Study of the IR spectrum oand the vibrational relaxation of peptides in water solution*. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 2012.
- [Feller 95] S. E. Feller, Y. Zhang, R. W. Pastor y B. R. Brooks. *Constant pressure molecular dynamics simulation: The Langevin piston method*. J. Chem. Phys. 103 (11), vol. 103, páginas 4613–4621, 1995.

- [Fermi 27] E. Fermi. *Un Metodo Statistico per la Determinazione di Alcune Proprieta dell'Atomo*. Rend. Accad. Naz. Lincei., vol. 6, páginas 602–607, 1927.
- [Ferreira 04] Kristina N. Ferreira, Tina M. Iverson, Karim Maghlaoui, James Barber y So Iwata. *Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center*. Science, vol. 303, no. 5665, páginas 1831–1838, 2004.
- [Fock 30] V. Fock. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*. Z. Physik., vol. 61, páginas 126–148, 1930.
- [Foloppe 95] Nicolas Foloppe, Michel Ferrand, Jacques Breton y Jeremy C. Smith. *Structural model of the photosynthetic reaction center of Rhodobacter capsulatus*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf., vol. 22, no. 3, páginas 226–244, 1995.
- [Foresman 96] James Foresman y AEleen Frisch. Exploring chemistry with electronic structure methods. second edition. Gaussian, Inc, 1996.
- [Frank 00] Harry A. Frank, James A. Bautista, Jesusa S. Josue y Andrew J. Young. *Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants: Energies of the Lowest Excited Singlet States of Violaxanthin and Zeaxanthin*. Biochemistry, vol. 39, no. 11, páginas 2831–2837, 2000.
- [French 74] A. P. French. Vibraciones y ondas. Editorial Reverté, 1974.
- [Frisch 09] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski y D. J. Fox. *Gaussian 09 Revision A.2*, 2009. Gaussian Inc. Wallingford CT.
- [Fuciman 10] Marcel Fuciman, Pavel Chabera, Anita Zupcanova, Petr Hribek, Juan B. Arelano, Frantisek Vacha, Jakub Psencik y Tomas Polivka. *Excited state properties of aryl carotenoids*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 12, páginas 3112–3120, 2010.
- [Furche 02] Philipp Furche y Reinhart Ahlrichs. *Adiabatic time-dependent density functional methods for excited state properties*. J. Chem. Phys., vol. 117, no. 16, páginas 7433–7447, 2002.

- [Galano 07] Annia Galano. *Relative Antioxidant Efficiency of a Large Series of Carotenoids in Terms of One Electron Transfer Reactions*. J. Phys. Chem. B, vol. 111, no. 44, páginas 12898–12908, 2007.
- [Galano 10] Annia Galano, Rubicelia Vargas y Ana Martínez. *Carotenoids can act as antioxidants by oxidizing the superoxide radical anion*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 12, páginas 193–200, 2010.
- [García de la Torre 05] J García de la Torre, A. Ortega, H.E. Pérez Sánchez y J.G. Hernández Cifre. *MULTIHYDRO and MONTEHYDRO: Conformational search and Monte Carlo calculation of solution properties of rigid or flexible bead models*. Biophys. Chem., vol. 116, páginas 121–128, 2005.
- [Garcia-Roves 07] Pablo Garcia-Roves, Janice M. Huss, Dong-Ho Han, Chad R. Hancock, Eduardo Iglesias-Gutierrez, May Chen y John O. Holloszy. *Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle*. Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 104, no. 25, páginas 10709–10713, 2007.
- [Gázquez 07] José L. Gázquez, Andrés Cedillo y Alberto Vela. *Electrodonating and Electroaccepting Powers*. J. Phys. Chem. A, vol. 111, no. 10, páginas 1966–1970, 2007.
- [Gill 91] Peter M. W. Gill y John A. Pople. *The prism algorithm for two-electron integrals*. Int. J. Quantum Chem., vol. 40, no. 6, páginas 753–772, 1991.
- [González González 12] Alicia González González. *Espectroscopía Raman Laser de Substancias de Interés Biológico y Nutricional*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2012.
- [Gradinaru 01] Claudiu C. Gradinaru, John T. M. Kennis, Emmanouil Papagiannakis, Ivo H. M. van Stokkum, Richard J. Cogdell, Graham R. Fleming, Robert A. Niederman y Rienk van Grondelle. *An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna*. Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 98, no. 5, páginas 2364–2369, 2001.
- [Gross 85] E. K. U. Gross y Walter Kohn. *Local density-functional theory of frequency-dependent linear response*. Phys. Rev. Lett., vol. 55, páginas 2850–2852, Dec 1985.
- [Gruszecki 90] Wieslaw I. Gruszecki y Jan Sielewiesiuk. *Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, vol. 1023, no. 3, páginas 405 – 412, 1990.
- [Gruszecki 99] Wieslaw I. Gruszecki. *Carotenoids in Membranes*. En Harry A. Frank, Andrew J. Young, George Britton y Richard J. Cogdell, editores, The Photochemistry of Carotenoids, páginas 363–379. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999.

- [Gruszecki 05] Wieslaw I. Gruszecki y Kazimierz Strzalka. *Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1740, no. 2, páginas 108–115, May 2005.
- [Gruszecki 10] Wieslaw I. Gruszecki. *Carotenoids in Lipid Membranes*. En John T. Landrum, editor, Carotenoids. Physical, Chemical, and Biological Functions and Properties. CRC Press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2010.
- [Guex 97] N. Guex y M.C. Peitsch. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, vol. 18, páginas 2714–2723, 1997.
- [Guido 13] Ciro A. Guido, Stefan Knecht, Jacob Kongsted y Benedetta Mennucci. *Benchmarking Time-Dependent Density Functional Theory for Excited State Geometries of Organic Molecules in Gas-Phase and in Solution*. J. Chem. Theory Comput., vol. 9, no. 5, páginas 2209–2220, 2013.
- [Guskov 09] Albert Guskov, Jan Kern, Azat Gabdulkhakov, Matthias Broser, Athina Zouni y Wolfram Saenger. *Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride*. Nat. Struct. Mol. Biol., vol. 16, no. 3, páginas 334–342, March 2009.
- [Halgren 01] Thomas A Halgren y Wolfgang Damm. *Polarizable force fields*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 11, no. 2, páginas 236–242, 2001.
- [Hall 51] G. G. Hall. *The Molecular Orbital Theory of Chemical Valency. VIII. A Method of Calculating Ionization Potentials*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, vol. 205, no. 1083, páginas 541–552, 1951.
- [Han 06] Rui-Min Han, Yu-Xi Tian, Yi-Shi Wu, Peng Wang, Xi-Cheng Ai, Jian-Ping Zhang y Leif H. Skibsted. *Mechanism of Radical Cation Formation from the Excited States of Zeaxanthin and Astaxanthin in Chloroform*. Photochem. Photobiol., vol. 82, no. 2, páginas 538–546, 2006.
- [Han 10] Rui-Min Han, Chang-Hui Chen, Yu-Xi Tian, Jian-Ping Zhang y Leif H. Skibsted. *Fast Regeneration of Carotenoids from Radical Cations by Isoflavonoid Dianions: Importance of the Carotenoid Keto Group for Electron Transfer*. J. Phys. Chem. A, vol. 114, no. 1, páginas 126–132, 2010.
- [Hartmann 04] Dieter Hartmann, Petra A Th $\tilde{A}$  $\frac{1}{4}$ rmann, Volker Spitzer, Wolfgang Schalch, Birke Manner y William Cohn. *Plasma kinetics of zeaxanthin and 3'-dehydro-lutein after multiple oral doses of synthetic zeaxanthin*. Am. J. Clin. Nutr., vol. 79, no. 3, páginas 410–417, 2004.
- [Hartree 28a] D.R. Hartree. *The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field Part I theory and methods*. Proc. Camb. Phil. Soc., vol. 24, páginas 89–110, 1928.

- [Hartree 28b] D.R. Hartree. *The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field Part II some results and discussion*. Proc. Camb. Phil. Soc., vol. 24, páginas 111–132, 1928.
- [Hartree 28c] D.R. Hartree. *The wave mechanics of an atom with a non-Coulomb central field Part III Term values and intensities in series an optical spectra*. Proc. Camb. Phil. Soc., vol. 24, páginas 426–437, 1928.
- [Hazra 04] Anirban Hazra, Hannah H. Chang y Marcel Nooijen. *First principles simulation of the UV absorption spectrum of ethylene using the vertical Franck-Condon approach*. J. Chem. Phys., vol. 121, no. 5, páginas 2125–2136, 2004.
- [Hehre 69] W. J. Hehre, R. F. Stewart y J. A. Pople. *Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. I. Use of Gaussian Expansions of Slater-Type Atomic Orbitals*. J. Chem. Phys., vol. 51, páginas 2657–2664, 1969.
- [Hehre 73] W. J. Hehre, W. A. Lathan, R. Ditchfield, M. D. Newton y J. A. Pople. *GAUSSIAN 70, QCPE 13, 236*, 1973. (not available).
- [Heller 93] H. Heller, M. Schaefer y K. Schulten. *Molecular Dynamics Simulation of a Bilayer of 200 Lipids in the Gel and in the Liquid-Crystal Phases*. J. Phys. Chem., vol. 97, páginas 8343–8360, 1993.
- [Hess 97] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen y J. G. E. M. Fraaije. *LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations*. J. Comput. Chem., vol. 18, páginas 1463–1472, 1997.
- [Hess 08] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel y E. Lindahl. *GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation*. J. Chem. Theory Comput., vol. 4, páginas 435–447, 2008.
- [Hetzer 98] Georg Hetzer, Peter Pulay y Hans-Joachim Werner. *Multipole approximation of distant pair energies in local {MP2} calculations*. Chem. Phys. Lett., vol. 290, no. 1-3, páginas 143–149, 1998.
- [Hill 46] Terrell L. Hill. *On Steric Effects*. The Journal of Chemical Physics, vol. 14, no. 7, páginas 465–465, 1946.
- [Hill 60] T.L. Hill. *An introduction to statistical mechanics*. Addison-Wesley, 1960.
- [Hirao 97] Kimihiko Hirao, Haruyuki Nakano y Kenichi Nakayama. *A complete active space valence bond method with nonorthogonal orbitals*. J. Chem. Phys., vol. 107, no. 23, páginas 9966–9974, 1997.
- [Hockney 74] R. W. Hockney, S. P. Goel y J. Eastwood. *Quiet High Resolution Computer Models of a Plasma*. J. Comp. Phys., vol. 14, páginas 148–158, 1974.
- [Hohenberg 64] P. Hohenberg y W. Kohn. *Inhomogeneous Electron Gas*. Phys. Rev., vol. 136, no. 3B, páginas B864–B871, Nov 1964.

- [Hoover 85] W. G. Hoover. *Canonical dynamics: equilibrium phase-space distributions*. Phys. Rev. A, vol. 31, páginas 1695–1697, 1985.
- [Hoyrup 01] P. Hoyrup, J. Davidsen y K. Jorgensen. *Lipid Membrane Partitioning of Lysolipids and Fatty Acids: Effects of Membrane Phase Structure and Detergent Chain Length*. J. Phys. Chem. B, vol. 105, páginas 2649–2657, 2001.
- [Hub 10] Jochen S. Hub, Bert L. de Groot y David van der Spoel. *g-wham – A Free Weighted Histogram Analysis Implementation Including Robust Error and Autocorrelation Estimates*. J. Chem. Theory Comput., vol. 6, no. 12, páginas 3713–3720, 2010.
- [Huh 12] J Huh y R Berger. *Coherent state-based generating function approach for Franck-Condon transitions and beyond*. J. Phys.: Conf. Ser., vol. 380, no. 1, página 012019, 2012.
- [Hyvönen 01] M. T. Hyvönen, K. Öörni, P. T. Kovanen y M. Ala-Korpela. *Changes in a Phospholipid Bilayer Induced by the Hydrolysis of a Phospholipase {A2} Enzyme: A Molecular Dynamics Simulation Study*. Biophysical Journal, vol. 80, no. 2, páginas 565 – 578, 2001.
- [Ianculescu 04] Reuven Ianculescu y Eli Pollak. *Photoinduced Cooling of Polyatomic Molecules in an Electronically Excited State in the Presence of Dushinskii Rotations*. J. Phys. Chem. A, vol. 108, no. 39, páginas 7778–7784, 2004.
- [Improta 11] Roberto Improta. *Uv-visible absorption and emission energies in condensed phase by pcm/td-dft methods*, páginas 37–75. John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [Inoue 01] T. Inoue, S. Yanagihara, Y. Misono y M. Suzuki. *Effect of fatty acids on phase behavior of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer: saturated versus unsaturated fatty acids*. Chem. Phys. Lipids, vol. 109, no. 2, páginas 117–133, 2001.
- [Ishikita 05] Hiroshi Ishikita, Bernhard Loll, Jacek Biesiadka, Artur Galstyan, Wolfram Saenger y Ernst-Walter Knapp. *Tuning electron transfer by ester-group of chlorophylls in bacterial photosynthetic reaction center*. {FEBS} Letters, vol. 579, no. 3, páginas 712–716, 2005.
- [Jacquemin 09] Denis Jacquemin, Valerie Wathelet, Eric A. Perpète y Carlo Adamo. *Extensive TD-DFT Benchmark: Singlet-Excited States of Organic Molecules*. J. Chem. Theory Comput., vol. 5, no. 9, páginas 2420–2435, 2009.
- [Jacquemin 12] Denis Jacquemin, Aurélien Planchat, Carlo Adamo y Benedetta Mennucci. *TD-DFT Assessment of Functionals for Optical 0-0 Transitions in Solvated Dyes*. J. Chem. Theory Comput., vol. 8, no. 7, páginas 2359–2372, 2012.

- [Jailaubekov 11] Askat E. Jailaubekov, Mikas Vengris, Sang-Hun Song, Toshiyuki Kusumoto, Hideki Hashimoto y Delmar S. Larsen. *Deconstructing the Excited-State Dynamics of  $\beta$ -Carotene in Solution*. J. Phys. Chem. A, vol. 115, no. 16, páginas 3905–3916, 2011.
- [Jaime 07] Laura Jaime, José A. Mendiola, Elena Ibáñez, Pedro J. Martín-Álvarez, Alejandro Cifuentes, Guillermo Reglero y Francisco J. Señoráns.  *$\beta$ -Carotene Isomer Composition of Sub- and Supercritical Carbon Dioxide Extracts. Antioxidant Activity Measurement*. J. Agric. Food Chem., vol. 55, no. 26, páginas 10585–10590, 2007.
- [Jemiola-Rzeminska 05] Malgorzata Jemiola-Rzeminska, Marta Pasenkiewicz-Gierula y Kazimierz Strzalka. *The behaviour of  $\beta$ -carotene in the phosphatidylcholine bilayer as revealed by a molecular simulation study*. Chem. Phys. Lipids, vol. 135, no. 1, páginas 27–37, 2005.
- [Jing 12] Yuanyuan Jing, Renhui Zheng, Hui-Xue Li y Qiang Shi. *Theoretical Study of the Electronic–Vibrational Coupling in the  $Q_y$  States of the Photosynthetic Reaction Center in Purple Bacteria*. J. Phys. Chem. B, vol. 116, no. 3, páginas 1164–1171, 2012.
- [Jordan 01] Patrick Jordan, Petra Fromme, Horst Tobias Witt, Olaf Klukas, Wolfram Saenger y Norbert Krausz. *Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution*. Nature, vol. 411, no. 6840, páginas 909–917, June 2001.
- [Jorgensen 83] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffrey D. Madura, Roger W. Impey y Michael L. Klein. *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. J. Chem. Phys., vol. 79, no. 2, páginas 926–935, 1983.
- [Jorgensen 88] William L. Jorgensen y Julian. Tirado-Rives. *The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin*. J. Am. Chem. Soc., vol. 110, no. 6, páginas 1657–1666, 1988.
- [Josue 02] Jesusa S. Josue y Harry A. Frank. *Direct Determination of the  $S_1$  Excited-State Energies of Xanthophylls by Low-Temperature Fluorescence Spectroscopy*. J. Phys. Chem. A, vol. 106, no. 19, páginas 4815–4824, 2002.
- [Kamiya 03] Nobuo Kamiya y Jian-Ren Shen. *Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7-Å resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 100, no. 1, páginas 98–103, 2003.
- [Kandt 07] Christian Kandt, Walter L. Ash y D. Peter Tieleman. *Setting up and running molecular dynamics simulations of membrane proteins*. Methods, vol. 41, no. 4, páginas 475–488, 2007. Structural Biology of Membrane Proteins.



- [Karki 11] Khadga Karki y Danilo Roccatano. *Molecular Dynamics Simulation Study of Chlorophyll a in Different Organic Solvents*. J. Chem. Theory Comput., vol. 7, no. 4, páginas 1131–1140, 2011.
- [Kawakami 09] Keisuke Kawakami, Yasufumi Umena, Nobuo Kamiya y Jian-Ren Shen. *Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 106, no. 21, páginas 8567–8572, 2009.
- [Kendall 97] Rick A. Kendall y Herbert A. Früchtl. *The impact of the resolution of the identity approximate integral method on modern ab initio algorithm development*. Theoretical Chemistry Accounts, vol. 97, no. 1-4, páginas 158–163, 1997.
- [Kim 12] Hyun Woo Kim, Aaron Kelly, Jae Woo Park y Young Min Rhee. *All-Atom Semiclassical Dynamics Study of Quantum Coherence in Photosynthetic Fenna–Matthews–Olson Complex*. J. Am. Chem. Soc., vol. 134, no. 28, páginas 11640–11651, 2012.
- [Klamt 93] A. Klamt y G. Schuurmann. *COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, vol. 0, páginas 799–805, 1993.
- [Klauda 10] Jeffery B. Klauda, Richard M. Venable, J. Alfredo Freites, Joseph W. O'Connor, Douglas J. Tobias, Carlos Mondragon-Ramirez, Igor Vorobyov, Alexander D. MacKerell y Richard W. Pastor. *Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types*. J. Phys. Chem. B, vol. 114, no. 23, páginas 7830–7843, 2010.
- [Kleinschmidt 09] Martin Kleinschmidt, Christel M. Marian, Mirko Waletzke y Stefan Grimme. *Parallel multireference configuration interaction calculations on mini- $\beta$ -carotenes and  $\beta$ -carotene*. J. Chem. Phys., vol. 130, no. 4, página 044708, 2009.
- [Knecht 06] Volker Knecht, Alan E. Mark y Siewert Jan Marrink. *Phase Behavior of a Phospholipid/Fatty Acid/Water Mixture Studied in Atomic Detail*. J. Am. Chem. Soc., vol. 128, páginas 2030–2034, 2006.
- [Kobus 97] Jacek Kobus. *Diatomic Molecules: Exact Solutions of {HF} Equations*. volume 28 of *Advances in Quantum Chemistry*, páginas 1 – 14. Academic Press, 1997.
- [Koch 01] Wolfram Koch y Max C. Holthausen. *Front matter and index*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.
- [Kohn 65] W. Kohn y L. J. Sham. *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Phys. Rev., vol. 140, no. 4A, páginas A1133–A1138, Nov 1965.

- [Kosumi 09] Daisuke Kosumi, Masazumi Fujiwara, Ritsuko Fujii, Richard J. Cogdell, Hideki Hashimoto y Masayuki Yoshizawa. *The dependence of the ultrafast relaxation kinetics of the S2 and S1 states in  $\beta$ -carotene homologs and lycopene on conjugation length studied by femtosecond time-resolved absorption and Kerr-gate fluorescence spectroscopies*. J. Chem. Phys., vol. 130, no. 21, página 214506, 2009.
- [Koyama 91] Yasushi Koyama. *New trends in photobiology: Structures and functions of carotenoids in photosynthetic systems*. J. Photochem. Photobiol., B, vol. 9, no. 3–4, páginas 265–280, 1991.
- [Kubo 55] Ryogo Kubo y Yutaka Toyozawa. *Application of the Method of Generating Function to Radiative and Non-Radiative Transitions of a Trapped Electron in a Crystal*. Prog. Theor. Phys., vol. 13, no. 2, páginas 160–182, 1955.
- [Kucerka 05] Norbert Kucerka, Yufeng Liu, Nanjun Chu, Horia I. Petrache, Stephanie Tristram-Nagle y John F. Nagle. *Structure of Fully Hydrated Fluid Phase DMPC and DLPC Lipid Bilayers Using X-Ray Scattering from Oriented Multilamellar Arrays and from Unilamellar Vesicles*. Biophys. J., vol. 88, páginas 2626–2637, 2005.
- [Kuki 91] Michitaka Kuki, Yasushi Koyama y Hiroyoshi Nagae. *Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of  $\beta$ -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state*. J. Phys. Chem., vol. 95, no. 19, páginas 7171–7180, 1991.
- [Kukol 09] Andreas Kukol. *Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins*. Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 5, no. 3, páginas 615–626, 2009.
- [Kumar 92] Shankar Kumar, John M. Rosenberg, Djamel Bouzida, Robert H. Swendsen y Peter A. Kollman. *THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method*. J. Comput. Chem., vol. 13, no. 8, páginas 1011–1021, 1992.
- [Kurashige 04] Yuki Kurashige, Haruyuki Nakano, Yoshihide Nakao y Kimihiko Hirao. *The  $\pi \rightarrow \pi^*$  excited states of long linear polyenes studied by the CASCI-MRMP method*. Chem. Phys. Lett., vol. 400, no. 4–6, páginas 425–429, 2004.
- [Kurusu 03] Genji Kurisu, Huamin Zhang, Janet L. Smith y William A. Cramer. *Structure of the Cytochrome b6f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity*. Science, vol. 302, no. 5647, páginas 1009–1014, 2003.
- [Kusumi 88] Akihiro Kusumi y Marta Pasenkiewicz-Gierula. *Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine membranes: effects of alkyl chain length, unsaturation, and cholesterol as studied by a spin-label method*. Biochemistry, vol. 27, páginas 4407–4415, 1988.

- [Lami 11] Alessandro Lami y Fabrizio Santoro. Time-dependent approaches to calculation of steady-state vibronic spectra: From fully quantum to classical approaches, Capítulo 10, páginas 475–516. John Wiley & Sons, Inc., 2011.
- [Larsen 03] Delmar S. Larsen, Emmanouil Papagiannakis, Ivo H.M. van Stokkum, Mikas Vengris, John T.M. Kennis y Rienk van Grondelle. *Excited state dynamics of  $\beta$ -carotene explored with dispersed multi-pulse transient absorption*. Chem. Phys. Lett., vol. 381, no. 5–6, páginas 733–742, 2003.
- [Lee 88] C. Lee, W. Yang y R.G. Parr. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys. Rev. B, vol. 37, páginas 785–789, 1988.
- [Leekinjorn 09] S. Leekinjorn, H. J. Cho, Y. Wu, N. T. Wright, A. K. Sum y C. Chan. *The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayers membranes*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1788, páginas 1508–1516, 2009.
- [Levin 94] Galit Levin y Shoshana Mokady. *Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans  $\beta$ -carotene in vitro*. Free Radical Biol. Med., vol. 17, no. 1, páginas 77–82, 1994.
- [Levin 97] G Levin, M Yeshurun y S Mokady. *In vivo antiperoxidative effect of 9-cis beta-carotene compared with that of the all-trans isomer*. Nutr. Cancer, vol. 27, no. 3, páginas 293–297, 1997.
- [Levine 01] Ira N. Levine. Química cuántica. Pearson Education, Madrid, 2001.
- [Levy 82] M. Levy. *Electron densities in search of Hamiltonians*. Phys. Rev. A, vol. 26, páginas 1200–1208, 1982.
- [Levy 84] Mel Levy, John P. Perdew y Virahat Sahni. *Exact differential equation for the density and ionization energy of a many-particle system*. Phys. Rev. A, vol. 30, páginas 2745–2748, Nov 1984.
- [Lindahl 01a] E. Lindahl, B. Hess y D. van der Spoel. *GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis*. J. Mol. Model., vol. 7, páginas 306–317, 2001.
- [Lindahl 01b] Erik Lindahl y Olle Edholm. *Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers*. J. Chem. Phys., vol. 115, páginas 4938–4950, 2001.
- [Lindh 91] R. Lindh, U. Ryu y B. Liu. *The reduced multiplication scheme of the Rys quadrature and new recurrence relations for auxiliary function based two-electron integral evaluation*. J. Chem. Phys., vol. 95, no. 8, páginas 5889–5897, 1991.

- [Lingenheil 08] M. Lingenheil, R. Denschlag, R. Reichold y P. Tavan. *The “Hot-Solvent/Cold Solute” Problem Revisited*. J. Chem. Theory Comput., vol. 4, páginas 1293–1306, 2008.
- [Loccisano 05] A. Loccisano, A.M.W., J. Evanseck y A.D. MacKerell, Jr. *Toppar stream file for retinol and retinal parameters*. In CHARMM c36aug12 release. (Downloaded from: [http://mackerell.umaryland.edu/CHARMM\\_ff\\_params.html](http://mackerell.umaryland.edu/CHARMM_ff_params.html)), 2005.
- [Loll 05] Bernhard Loll, Jan Kern, Wolfram Saenger, Athina Zouni y Jacek Biesiadka. *Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II*. Nature, vol. 438, no. 7070, páginas 1040–1044, December 2005.
- [Lukes 11] Vladimír Lukes, Niklas Christensson, Franz Milota, Harald F. Kauffmann y Jürgen Hauer. *Electronic ground state conformers of  $\beta$ -carotene and their role in ultrafast spectroscopy*. Chem. Phys. Lett., vol. 506, no. 1-3, páginas 122–127, 2011.
- [MacKerell 98] A. D. MacKerell, D. Bashford, Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiórkiewicz-Kuczera, D. Yin y M. Karplus. *All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins*. J. Phys. Chem. B, vol. 102, no. 18, páginas 3586–3616, 1998. CHARMM22.
- [Mackerell 04] Alexander D. Mackerell, Michael Feig y Charles L. Brooks. *Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: Limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations*. J. Comput. Chem., vol. 25, no. 11, páginas 1400–1415, 2004.
- [Madjet 06] M. E. Madjet, A. Abdurahman y T. Renger. *Intermolecular Coulomb Couplings from Ab Initio Electrostatic Potentials: Application to Optical Transitions of Strongly Coupled Pigments in Photosynthetic Antennae and Reaction Centers*. J. Phys. Chem. B, vol. 110, no. 34, páginas 17268–17281, 2006. PMID: 16928026.
- [Manby 01] F. R. Manby, P. J. Knowles y A. W. Lloyd. *The Poisson equation in density fitting for the Kohn-Sham Coulomb problem*. J. Chem. Phys., vol. 115, no. 20, páginas 9144–9148, 2001.
- [Manby 03] Frederick R. Manby. *Density fitting in second-order linear- $r$ [sub 12] M[olash]ller–Plesset perturbation theory*. The Journal of Chemical Physics, vol. 119, no. 9, páginas 4607–4613, 2003.

- [Markesbery 97] W. R. Markesbery. *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic. Biol. Med., vol. 23, páginas 134–147, 1997.
- [Marrink 07] S. J. Marrink, H. J. Risselada, S. Yefimov, D. P. Tieleman y A. H. deVries. *The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations*. J. Phys. Chem. B, vol. 111, páginas 7812–7824, 2007.
- [Marrink 13] Siewert J. Marrink y D. Peter Tieleman. *Perspective on the Martini model*. Chem. Soc. Rev., páginas –, 2013.
- [Martin 98] Charles H. Martin y Robert R. Birge. *Reparametrizing MNDO for Excited-State Calculations by Using ab Initio Effective Hamiltonian Theory: Application to the 2,4-Pentadien-1-iminium Cation*. J. Phys. Chem. A, vol. 102, no. 5, páginas 852–860, 1998.
- [Martínez 05] J. Martínez, A. Gutierrez, J. Casas, V. Llado, A. Lopez-Bellan, J. Besalduch, A. Dopazo y P.V. Escribá. *The Repression of E2F-1 Is Critical for the Activity of Minerval against Cancer*. J. Pharmacol. Exp. Ther., vol. 315, páginas 466–474, 2005.
- [Martínez 09a] Ana Martínez. *Donator–Acceptor Map and Work Function for Linear Polyene-Conjugated Molecules. A Density Functional Approximation Study*. J. Phys. Chem. B, vol. 113, no. 10, páginas 3212–3217, 2009.
- [Martínez 09b] L. Martínez, R. Andrade, E. G. Birgin y J. M. Martínez. *Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. J. Comput. Chem., vol. 30, páginas 2157–2164, 2009.
- [Maynard 98] A. T. Maynard, M. Huang, W. G. Rice y D. G. Covell. *Reactivity of the HIV-1 nucleocapsid protein p7 zinc finger domains from the perspective of density-functional theory*. Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 95, no. 20, páginas 11578–11583, 1998.
- [McNulty 07] Hyesun P. McNulty, Jungsoo Byun, Samuel F. Lockwood, Robert F. Jacob y R. Preston Mason. *Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis*. Biochim. Biophys. Acta, Biomembr., vol. 1768, no. 1, páginas 167 – 174, 2007.
- [McWeeny 60] R. McWeeny. *Some Recent Advances in Density Matrix Theory*. Rev. Mod. Phys., vol. 32, no. 2, páginas 335–369, Apr 1960.
- [McWeeny 62] R. McWeeny. *Perturbation Theory for the Fock-Dirac Density Matrix*. Phys. Rev., vol. 126, no. 3, páginas 1028–1034, May 1962.
- [Mendes-Pinto 13] Maria M. Mendes-Pinto, Denise Galzerano, Alison Telfer, Andrew A. Pascal, Bruno Robert y Cristian Ilioaia. *Mechanisms Underlying Carotenoid Absorption in Oxygenic Photosynthetic Proteins*. J. Biol. Chem., vol. 288, no. 26, páginas 18758–18765, 2013.

- [Metropolis 53] N. Metropolis, A.W. Rosenbluth ad M.N. Rosenbluth y A.H. Teller. *Equation of the State Calculations by Fast Computing Machines*. J. Chem. Phys., vol. 21, no. 6, páginas 1087–1092, 1953.
- [Miertus 81] S. Miertus, E. Scrocco y J. Tomasi. *Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects*. Chem. Phys., vol. 55, no. 1, páginas 117–129, 1981.
- [Miyamoto 92] S. Miyamoto y P. A. Kollman. *SETTLE: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models*. J. Comput. Chem., vol. 13, páginas 952–962, 1992.
- [Møller 34] Chr. Møller y M. S. Plesset. *Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems*. Phys. Rev., vol. 46, páginas 618–622, Oct 1934.
- [Mukamel 85] Shaul Mukamel, Shuji Abe y Reza Islampour. *Generating function for electronic spectra of polyatomic molecules*. J. Phys. Chem., vol. 89, no. 2, páginas 201–204, 1985.
- [Müller 11] Lars Müller, Pascale Goupy, Kati Fröhlich, Olivier Dangles, Catherine Caris-Veyrat y Volker Böhm. *Comparative Study on Antioxidant Activity of Lycopene (Z)-Isomers in Different Assays*. J. Agric. Food Chem., vol. 59, no. 9, páginas 4504–4511, 2011.
- [Nagle 00] J. F. Nagle y S. Tristram-Nagle. *Structure of lipid bilayers*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1469, páginas 159–195, 2000.
- [Neria 96] Eyal Neria, Stefan Fischer y Martin Karplus. *Simulation of activation free energies in molecular systems*. J. Chem. Phys., vol. 105, no. 5, páginas 1902–1921, 1996.
- [Niedzwiedzki 06] Dariusz M. Niedzwiedzki, James O. Sullivan, Tomáš Polívka, Robert R. Birge y Harry A. Frank. *Femtosecond Time-Resolved Transient Absorption Spectroscopy of Xanthophylls*. J. Phys. Chem. B, vol. 110, no. 45, páginas 22872–22885, 2006.
- [Niedzwiedzki 07] Dariusz Niedzwiedzki, Jeremy F. Kosciielecki, Hong Cong, James O. Sullivan, George N. Gibson, Robert R. Birge y Harry A. Frank. *Ultrafast Dynamics and Excited State Spectra of Open-Chain Carotenoids at Room and Low Temperatures*. J. Phys. Chem. B, vol. 111, no. 21, páginas 5984–5998, 2007.
- [Nosé 84] S. Nosé. *A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble*. Mol. Phys., vol. 52, páginas 255–268, 1984.
- [Notman 07] R. Notman, M. G. Noro y J. Anwar. *Interaction of Oleic Acid with Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Bilayers Simulated by Molecular Dynamics*. J. Phys. Chem. B, vol. 111, páginas 12748–12755, 2007.

- [Ochterski 99] Joseph W. Ochterski. *Vibrational Analysis in Gaussian*. Rapport technique, Gaussian Inc. (downloaded from: [http://www.gaussian.com/g\\_tech/white.htm](http://www.gaussian.com/g_tech/white.htm)), 1999.
- [Ongpipattanakul 91] Boonsri Ongpipattanakul, Ronald Burnette, Russell Potts y Michael Francoeur. *Evidence that Oleic Acid Exists in a Separate Phase Within Stratum Corneum Lipids*. Pharm. Res., vol. 8, páginas 350–354, 1991.
- [Onufriev 04] Alexey Onufriev, Donald Bashford y David A. Case. *Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model*. Proteins: Struct., Funct., Bioinf., vol. 55, no. 2, páginas 383–394, 2004.
- [Ostroumov 11] Evgeny E. Ostroumov, Michael Reus Marc G. Müller y Alfred R. Holzwarth. *On the Nature of the "Dark S\* $\hat{A}$ ' $\hat{A}$ ' Excited State of  $\beta$ -Carotene*. J. Phys. Chem. A, vol. 115, no. 16, páginas 3698–3712, 2011.
- [Ozkan 90] Ilker Ozkan. *Franck-Condon Principle for Polyatomic Molecules: Axis-Switching Effects and Transformation of Normal Coordinates*. J. Mol. Spectrosc., vol. 139, páginas 147–162, 1990.
- [Pagnan 89] A. Pagnan, R. Corocher, G. B. Ambrosio, S. Ferrari, P. Guarini, D. Piccolo, A. Opportuno, A. Bassi, O. Olivieri y G. Baggio. *Effects of an olive-oil-rich diet on erythrocyte membrane lipid composition and cation transport systems*. Clin. Sci., vol. 76, páginas 87–93, 1989.
- [Pang 09] Yoonsoo Pang, Matthew A. Prantil, Aaron J. Van Tassle, Garth A. Jones y Graham R. Fleming. *Excited-State Dynamics of 8'-Apo- $\beta$ -caroten-8'-al and 7',7'-Dicyano-7'-apo- $\beta$ -carotene Studied by Femtosecond Time-Resolved Infrared Spectroscopy*. J. Phys. Chem. B, vol. 113, no. 39, páginas 13086–13095, 2009. PMID: 19736997.
- [Pariser 56] Rudolph Pariser. *Theory of the Electronic Spectra and Structure of the Polyacenes and of Alternant Hydrocarbons*. J. Chem. Phys., vol. 24, no. 2, páginas 250–268, 1956.
- [Parr 89] R.G. Parr y W. Yang. *Density-functional theory of atoms and molecules*. International Series of Monographs on Chemistry. Oxford University Press, USA, 1989.
- [Parr 99] Robert G. Parr, László v. Szentpály y Shubin Liu. *Electrophilicity Index*. J. Am. Chem. Soc., vol. 121, no. 9, páginas 1922–1924, 1999.
- [Parrinello 81] M. Parrinello y A. Rahman. *Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method*. J. Appl. Phys., vol. 52, páginas 7182–7190, 1981.
- [Patey 73] G.N. Patey y J.P. Valleau. *The free energy of spheres with dipoles: Monte Carlo with multistage sampling*. Chem. Phys. Lett., vol. 21, no. 2, páginas 297 – 300, 1973.

- [Patra 04] Michael Patra, Mikko Karttunen, Marja T. Hyvonen, Emma Falck y Ilpo Vattulainen. *Lipid Bilayers Driven to a Wrong Lane in Molecular Dynamics Simulations by Subtle Changes in Long-Range Electrostatic Interactions*. J. Phys. Chem. B, vol. 108, páginas 4485–4494, 2004.
- [Peng 96] Chunyang Peng, Philippe Y. Ayala, H. Bernhard Schlegel y Michael J. Frisch. *Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states*. J. Comput. Chem., vol. 17, no. 1, páginas 49–56, 1996.
- [Peng 10] Qian Peng, Yingli Niu, Chunmei Deng y Zhigang Shuai. *Vibration correlation function formalism of radiative and non-radiative rates for complex molecules*. Chem. Phys., vol. 370, no. 1–3, páginas 215–222, 2010.
- [Perdew 86] John P. Perdew. *Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas*. Phys. Rev. B, vol. 33, páginas 8822–8824, Jun 1986.
- [Perdew 96] John P. Perdew, Kieron Burke y Matthias Ernzerhof. *Generalized Gradient Approximation Made Simple*. Phys. Rev. Lett., vol. 77, páginas 3865–3868, Oct 1996.
- [Pérez-Gálvez 01] Antonio Pérez-Gálvez y M. Isabel Mínguez-Mosquera. *Structure–Reactivity Relationship in the Oxidation of Carotenoid Pigments of the Pepper (*Capsicum annuum* L.)*. J. Agric. Food Chem., vol. 49, no. 10, páginas 4864–4869, 2001.
- [Peters 09] G. H. Peters, F. Y. Hansen, M. S. Moller y P. Westh. *Effects of Fatty Acid Inclusion in a DMPC Bilayer Membrane*. J. Phys. Chem. B, vol. 113, páginas 92–102, 2009.
- [Petrache 00] Horia I. Petrache, Steven W. Dodd y Michael F. Brown. *Area per Lipid and Acyl Length Distributions in Fluid Phosphatidylcholines Determined by <sup>2</sup>H NMR Spectroscopy*. Biophys. J., vol. 79, páginas 3172–3192, 2000.
- [Phillips 05] J.C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R.D. Skeel, L. Kale y K. Schulten. *Scalable molecular dynamics with NAMD*. J. Comput. Chem., vol. 26, páginas 1781–1802, 2005.
- [Piggot 12] Thomas J. Piggot, Ángel Piñeiro y Syma Khalid. *Molecular Dynamics Simulations of Phosphatidylcholine Membranes: A Comparative Force Field Study*. J. Chem. Theory Comput., vol. 8, no. 11, páginas 4593–4609, 2012.
- [Poger 10a] David Poger y Alan E. Mark. *On the Validation of Molecular Dynamics Simulations of Saturated and cis-Monounsaturated Phosphatidylcholine Lipid Bilayers: A Comparison with Experiment*. Journal of Chemical Theory and Computation, vol. 6, no. 1, páginas 325–336, 2010.
- [Poger 10b] David Poger, Wilfred F. Van Gunsteren y Alan E. Mark. *A new force field for simulating phosphatidylcholine bilayers*. J. Comput. Chem., vol. 31, no. 6, páginas 1117–1125, 2010.



- [Polívka 04] Tomáš Polívka y Villy Sundström. *Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States—From Solution to Natural and Artificial Systems*. Chem. Rev., vol. 104, no. 4, páginas 2021–2072, 2004.
- [Polívka 09a] Tomáš Polívka, Sergei P. Balashov, Pavel Chàbera, Eleonora S. Imasheva, Arkady Yartsev, Villy Sundström y Janos K. Lanyi. *Femtosecond Carotenoid to Retinal Energy Transfer in Xanthorhodopsin*. Biophys. J., vol. 96, no. 6, páginas 2268–2277, 2009.
- [Polívka 09b] Tomáš Polívka y Villy Sundström. *Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy*. Chem. Phys. Lett., vol. 477, no. 1-3, páginas 1–11, 2009.
- [Polívka 10] Tomáš Polívka y Harry A. Frank. *Molecular Factors Controlling Photosynthetic Light Harvesting by Carotenoids*. Acc. Chem. Res., vol. 43, no. 8, páginas 1125–1134, 2010.
- [Polly 04] Robert Polly, Hans-Joachim Werner, Frederick R. Manby y Peter J. Knowles. *Fast Hartree-Fock theory using local density fitting approximations*. Mol. Phys., vol. 102, no. 21-22, páginas 2311–2321, 2004.
- [Ponder 87] J. W. Ponder y F. M. Richards. *An efficient newton-like method for molecular mechanics energy minimization of large molecules*. J. Comput. Chem., vol. 8, páginas 1016–1024, 1987.
- [Pople 54] J.A. Pople y R.K. Nesbet. *Self-Consistent Orbitals for Radicals*. J. Chem. Phys., vol. 22, páginas 571–572, 1954.
- [Pronk 13] Sander Pronk, Szilárd Páll, Roland Schulz, Per Larsson, Pär Bjelkmar, Rossen Apostolov, Michael R. Shirts, Jeremy C. Smith, Peter M. Kasson, David van der Spoel, Berk Hess y Erik Lindahl. *GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit*. Bioinformatics, vol. 29, no. 7, páginas 845–854, 2013.
- [Pulay 92] P. Pulay y G. Fogarasi. *Geometry optimization in redundant internal coordinates*. J. Chem. Phys., vol. 96, no. 4, páginas 2856–2860, 1992.
- [Rahman 64] A. Rahman. *Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon*. Phys. Rev., vol. 136, páginas A405–A411, 1964.
- [Rauhut 95] Guntram Rauhut y Peter Pulay. *Transferable Scaling Factors for Density Functional Derived Vibrational Force Fields*. J. Phys. Chem., vol. 99, no. 10, páginas 3093–3100, 1995.
- [Reimers 01] Jeffrey R. Reimers. *A practical method for the use of curvilinear coordinates in calculations of normal-mode-projected displacements and Duschinsky rotation matrices for large molecules*. J. Chem. Phys., vol. 115, no. 20, páginas 9103–9109, 2001.

- [Requena 04] A. Requena y J. Zúñiga. *Espectroscopía*. Pearson Education, 2004.
- [Requena 08] A. Requena, J. P. Cerón-Carrasco, A. Bastida, J. Zúñiga y B. Miguel. *A Density Functional Theory Study of the Structure and Vibrational Spectra of  $\beta$ -Carotene, Capsanthin, and Capsorubin*. *J. Phys. Chem. A*, vol. 112, no. 21, páginas 4815–4825, 2008.
- [Roothaan 51] C. C. J. Roothaan. *New Developments in Molecular Orbital Theory*. *Rev. Mod. Phys.*, vol. 23, páginas 69–89, Apr 1951.
- [Ryckaert 77] J. P. Ryckaert, G. Ciccotti y H. J. C. Berendsen. *Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes*. *J. Comp. Phys.*, vol. 23, páginas 327–341, 1977.
- [Sando 01] Gerald M. Sando y Kenneth G. Spears. *Ab Initio Computation of the Duschinsky Mixing of Vibrations and Nonlinear Effects*. *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, no. 22, páginas 5326–5333, 2001.
- [Santoro 07a] Fabrizio Santoro, Roberto Improta, Alessandro Lami, Julien Bloino y Vincenzo Barone. *Effective method to compute Franck-Condon integrals for optical spectra of large molecules in solution*. *J. Chem. Phys.*, vol. 126, no. 8, página 084509, 2007.
- [Santoro 07b] Fabrizio Santoro, Alessandro Lami, Roberto Improta y Vincenzo Barone. *Effective method to compute vibrationally resolved optical spectra of large molecules at finite temperature in the gas phase and in solution*. *J. Chem. Phys.*, vol. 126, no. 18, página 184102, 2007.
- [Santoro 08] Fabrizio Santoro, Alessandro Lami, Roberto Improta, Julien Bloino y Vincenzo Barone. *Effective method for the computation of optical spectra of large molecules at finite temperature including the Duschinsky and Herzberg–Teller effect: The Qx band of porphyrin as a case study*. *J. Chem. Phys.*, vol. 128, no. 22, página 224311, 2008.
- [Santoro 13] F. Santoro. *FCclasses, a Fortran 77 code, visit: <http://village.pi.iccom.cnr.it>, development version*, 2013.
- [Sashima 00] Tokutake Sashima, Yasushi Koyama, Takashi Yamada y Hideki Hashimoto. *The 1Bu<sup>+</sup>, 1Bu<sup>-</sup>, and 2Ag- Energies of Crystalline Lycopene,  $\beta$ -Carotene, and Mini-9- $\beta$ -carotene as Determined by Resonance-Raman Excitation Profiles: Dependence of the 1Bu<sup>-</sup> State Energy on the Conjugation Length*. *J. Phys. Chem. B*, vol. 104, no. 20, páginas 5011–5019, 2000.
- [Sayvetz 39] Aaron Sayvetz. *The Kinetic Energy of Polyatomic Molecules*. *J. Chem. Phys.*, vol. 7, no. 6, páginas 383–389, 1939.
- [Scalmani 06] Giovanni Scalmani, Michael J. Frisch, Benedetta Mennucci, Jacopo Tomasi, Roberto Cammi y Vincenzo Barone. *Geometries and properties of excited*

- states in the gas phase and in solution: Theory and application of a time-dependent density functional theory polarizable continuum model.* J. Chem. Phys., vol. 124, no. 9, página 094107, 2006.
- [Scalmani 10] Giovanni Scalmani y Michael J. Frisch. *Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism.* J. Chem. Phys., vol. 132, no. 11, página 114110, 2010.
- [Schmid 11] Nathan Schmid, Andreas Eichenberger, Alexandra Choutko, Sereina Riniker, Moritz Winger, Alan Mark y Wilfred van Gunsteren. *Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7.* European Biophysics Journal, vol. 40, páginas 843–856, 2011. 10.1007/s00249-011-0700-9 GROMOS 54A7 and 54B7: Improved lipids and small peptide curvature.
- [Schrödinger 96] E. Schrödinger. 'nature and the greeks' and 'science and humanism'. Canto (Cambridge University Press). Cambridge University Press, 1996.
- [Scott 96] Anthony P. Scott y Leo Radom. *Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Moller-Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors.* J. Phys. Chem., vol. 100, no. 41, páginas 16502–16513, 1996.
- [Scott 99] W.R.P. Scott, P.H. Huenenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Krueger y W.F. van Gunsteren. *The GROMOS Biomolecular Simulation Program Package.* J. Phys. Chem. A, vol. 103, páginas 3596–3607, 1999.
- [Sharp 64] T. E. Sharp y H. M. Rosenstock. *Franck—Condon Factors for Polyatomic Molecules.* J. Chem. Phys., vol. 41, no. 11, páginas 3453–3463, 1964.
- [Sibert 83] Edwin L. Sibert, James T. Hynes y William P. Reinhardt. *Fermi resonance from a curvilinear perspective.* J. Phys. Chem., vol. 87, no. 12, páginas 2032–2037, 1983.
- [Sies 95] H. Sies y W. Stahl. *Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants.* Am. J. Clin. Nutr., vol. 62, no. 6, páginas 1315S–1321S, 1995.
- [Singh 84] U. Chandra Singh y Peter A. Kollman. *An approach to computing electrostatic charges for molecules.* J. Comput. Chem., vol. 5, no. 2, páginas 129–145, 1984.
- [Slater 29] J.C. Slater. *The theory of complex spectra.* Phys. Rev., vol. 34, páginas 1293–1322, 1929.
- [Slater 74] J.C. Slater. Quantum theory of molecules and solids, volume 4, the self-consistent field for molecules and solids. McGraw-Hill, New York, 1974.
- [Soler 10] Miguel Ángel Soler. *Estudio de la relajación vibracional de N-metilacetamida en disolución acuosa.* Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 2010.

- [Sousa 07] S.F. Sousa, P.A. Fernandes y M.J. Ramos. *General Performance of Density Functionals*. J. Phys. Chem. A, vol. 111, páginas 10439–10452, 2007.
- [Stephens 94] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski y M.J. Frisch. *Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields*. J. Phys. Chem., vol. 98, páginas 11623–11627, 1994.
- [Stevens 63] R. M. Stevens, R. M. Pitzer y W. N. Lipscomb. *Perturbed Hartree—Fock Calculations. I. Magnetic Susceptibility and Shielding in the LiH Molecule*. J. Chem. Phys., vol. 38, no. 2, páginas 550–560, 1963.
- [Stroebel 03] David Stroebel, Yves Choquet, Jean-Luc Popot y Daniel Picot. *An atypical haem in the cytochrome b6f complex*. Nature, vol. 426, no. 6965, páginas 413–418, November 2003.
- [Swope 82] W.C. Swope, H.C. Andersen, Berens, P.H. y K.R.A Wilson. *Computer-simulation method for the calculation of equilibrium-constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters*. J. Chem. Phys., vol. 76, páginas 637–649, 1982.
- [Szabo 96] Attila Szabo y Neil S. Ostlund. *Modern quantum chemistry: Introduction to advanced electronic structure theory*. Dover Publications, 1996. Original Edition: Macmillan Publishing Co., Inc (1982) Revised Edition: McGraw-Hill, Inc. (1989) Dover edition is a unaltered republication of the "First Edition, Revised", originally published by the McGraw-Hill Publishing Company, New York, 1989.
- [Tang 03] Jau Tang, Ming Tsung Lee y Sheng Hsien Lin. *Effects of the Duschinsky mode-mixing mechanism on temperature dependence of electron transfer processes*. J. Chem. Phys., vol. 119, no. 14, páginas 7188–7196, 2003.
- [Tao 03] Jianmin Tao, John P. Perdew, Viktor N. Staroverov y Gustavo E. Scuseria. *Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids*. Phys. Rev. Lett., vol. 91, página 146401, Sep 2003.
- [Tawada 04] Yoshihiro Tawada, Takao Tsuneda, Susumu Yanagisawa, Takeshi Yanai y Kimihiko Hirao. *A long-range-corrected time-dependent density functional theory*. J. Chem. Phys., vol. 120, no. 18, páginas 8425–8433, 2004.
- [Thomas 27] L.H. Thomas. *The Calculation of Atomic Fields*. Proc. Camb. Phil. Soc., vol. 23, páginas 542–548, 1927.
- [Tieleman 96] D. P. Tieleman y H. J. C. Berendsen. *Molecular dynamics simulations of a fully hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with different macroscopic boundary conditions and parameters*. J. Chem. Phys., vol. 105, no. 11, páginas 4871–4880, 1996.

- [Tieleman 97] D. P. Tieleman, S. J. Marrink y H. J. C. Berendsen. *A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayers systems*. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1331, no. A2, páginas 235–270, 1997.
- [Tomasi 94] Jacopo Tomasi y Maurizio Persico. *Molecular Interactions in Solution: An Overview of Methods Based on Continuous Distributions of the Solvent*. *Chem. Rev.*, vol. 94, no. 7, páginas 2027–2094, 1994.
- [Tomasi 05] Jacopo Tomasi, Benedetta Mennucci y Roberto Cammi. *Quantum Mechanical Continuum Solvation Models*. *Chem. Rev.*, vol. 105, no. 8, páginas 2999–3094, 2005.
- [Torrie 74] Glenn M. Torrie y John P. Valleau. *Monte Carlo free energy estimates using non-Boltzmann sampling: Application to the sub-critical Lennard-Jones fluid*. *Chem. Phys. Lett.*, vol. 28, no. 4, páginas 578 – 581, 1974.
- [Torrie 77] G.M. Torrie y J.P. Valleau. *Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling*. *J. Comput. Phys.*, vol. 23, no. 2, páginas 187 – 199, 1977.
- [Tully 98] J.C. Tully. Modern methods for multidimensional dynamics computations in chemistry, Capítulo Nonadiabatic Dynamics, páginas 34–72. World Scientific, 1998.
- [Umena 11] Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen y Nobuo Kamiya. *Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9[thinsp]Å*. *Nature*, vol. 473, no. 7345, páginas 55–60, May 2011.
- [van Buuren 93] Aldert R. van Buuren, Siewert Jan Marrink y Herman J. C. Berendsen. *A molecular dynamics study of the decane/water interface*. *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 36, páginas 9206–9212, 1993.
- [van der Spoel 05] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark y H. J. C. Berendsen. *GROMCAS: Fast, Flexible, and Free*. *J. Comp. Chem.*, vol. 26, páginas 1701–1718, 2005.
- [van der Spoel 10] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen y H. J. C. Berendsen. *Gromacs User Manual version 4.5*. [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org), 2010.
- [van Duin 01] Adri C. T. van Duin, Siddharth Dasgupta, Francois Lorant y William A. Goddard. *ReaxFF: A Reactive Force Field for Hydrocarbons*. *J. Phys. Chem. A*, vol. 105, no. 41, páginas 9396–9409, 2001.
- [van Gisbergen 98] S. J. A. van Gisbergen, F. Kootstra, P. R. T. Schipper, O. V. Gritsenko, J. G. Snijders y E. J. Baerends. *Density-functional-theory response-property calculations with accurate exchange-correlation potentials*. *Phys. Rev. A*, vol. 57, páginas 2556–2571, Apr 1998.

- [Vanommeslaeghe 10] K. Vanommeslaeghe, E. Hatcher, C. Acharya, S. Kundu, S. Zhong, J. Shim, E. Darian, O. Guvench, P. Lopes, I. Vorobyov y A. D. Mackerell. *CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields*. J. Comput. Chem., vol. 31, no. 4, páginas 671–690, 2010.
- [Verlet 67] L. Verlet. *Computer experiments on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules*. Phys. Rev., vol. 159, páginas 98–103, 1967.
- [Vicario 98] I. M. Vicario, D. Malkova, E. K. Lund y I. T. Johnson. *Olive-oil supplementation in healthy adults: effect in health membrane FA composition and platelet function*. Ann. Nutr. Metab., vol. 42, páginas 160–169, 1998.
- [Vivas 12] M. G. Vivas y C. R. Mendonca. *Temperature Effect on the Two-Photon Absorption Spectrum of All-trans- $\beta$ -carotene*. J. Phys. Chem. A, vol. 116, no. 26, páginas 7033–7038, 2012.
- [von Doering 95] W. von Doering, Chariklia Sotiriou-Leventis y W. R. Roth. *Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans- $\beta$ -carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- $\beta$ -carotene*. J. Am. Chem. Soc., vol. 117, no. 10, páginas 2747–2757, 1995.
- [Wang 91] Y. Wang y J.P. Perdew. *Correlation hole of the spin-polarized electron gas, with exact small-wave-vector and high-density scaling*. Phys. Rev. B, vol. 44, páginas 13298–13307, 1991.
- [Wang 04] Junmei Wang, Romain M. Wolf, James W. Caldwell, Peter A. Kollman y David A. Case. *Development and testing of a general amber force field*. J. Comput. Chem., vol. 25, no. 9, páginas 1157–1174, 2004.
- [Wang 12] Wenjing Wang, Zahra Nossoni, Tetyana Berbasova, Camille T. Watson, Ipek Yapici, Kin Sing Stephen Lee, Chrysoula Vasileiou, James H. Geiger y Babak Borhan. *Tuning the Electronic Absorption of Protein-Embedded All-trans-Retinal*. Nature, vol. 338, páginas 1340–1343, 2012.
- [Warshel 76] A. Warshel y M. Levitt. *Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. J. Mol. Biol., vol. 103, no. 2, páginas 227–249, 1976.
- [Werner 03] Hans-Joachim Werner, Frederick R. Manby y Peter J. Knowles. *Fast linear scaling second-order Moller-Plesset perturbation theory (MP2) using local and density fitting approximations*. J. Chem. Phys., vol. 118, no. 18, páginas 8149–8160, 2003.
- [Werner 10] H.-J. Werner, P. J. Knowles, G. Knizia, F. R. Manby, M. Schütz, P. Celani, T. Korona, R. Lindh, A. Mitrushenkov, G. Rauhut, K. R. Shamasundar, T. B. Adler, R. D. Amos, A. Bernhardsson, A. Berning, D. L. Cooper, M. J. O.

- Deegan, A. J. Dobbyn, F. Eckert, E. Goll, C. Hampel, A. Hesselmann, G. Hetzer, T. Hrenar, G. Jansen, C. Köppl, Y. Liu, A. W. Lloyd, R. A. Mata, A. J. May, S. J. McNicholas, W. Meyer, M. E. Mura, A. Nicklass, D. P. O'Neill, P. Palmieri, K. Pflüger, R. Pitzer, M. Reiher, T. Shiozaki, H. Stoll, A. J. Stone, R. Tarroni, T. Thorsteinsson, M. Wang y A. Wolf. *MOLPRO, version 2010.1, a package of ab initio programs*, 2010. see <http://www.molpro.net>.
- [Widom 63] B. Widom. *Somo topics in the theory of fluids*. J. Chem. Phys., vol. 39, páginas 2802–2812, 1963.
- [Wilson 55] E. B. Wilson, J. C. Decius y P. C. Cross. *Molecular vibrations. the theory of infrared and raman vibrational spectra*. Dover, 1955.
- [Wohlert 06] J. Wohlert y O. Edholm. *Dynamics in atomistic simulations of phospholipid membranes: nuclear magnetic resonance relaxation rates and lateral diffusion*. J. Chem. Phys., vol. 125, páginas 204703–204710, 2006.
- [Wohlleben 04] Wendel Wohlleben, Tiago Buckup, Hideki Hashimoto, Richard J. Cogdell, Jennifer L. Herek y Marcus Motzkus. *Pump-Deplete-Probe Spectroscopy and the Puzzle of Carotenoid Dark States*. J. Phys. Chem. B, vol. 108, no. 10, páginas 3320–3325, 2004.
- [Wong-ekkabut 07] J. Wong-ekkabut, Z. Xu, W. Triampo, I.M. Tang, D.P. Tieleman y L. Monticelli. *Effect of Lipid Peroxidation on the Properties of Lipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study*. Biophys. J., vol. 93, páginas 4225–4236, 2007.
- [Yamashita 07] E. Yamashita, H. Zhang y W.A. Cramer. *Structure of the Cytochrome b6f Complex: Quinone Analogue Inhibitors as Ligands of Heme cn*. J. Mol. Biol., vol. 370, no. 1, páginas 39–52, 2007.
- [Yan 86] Yi Jing Yan y Shaul Mukamel. *Eigenstate-free, Green function, calculation of molecular absorption and fluorescence line shapes*. J. Chem. Phys., vol. 85, no. 10, páginas 5908–5923, 1986.
- [Yan 06] Jiusheng Yan, Genji Kurisu y William A. Cramer. *Intraprotein transfer of the quinone analogue inhibitor 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone in the cytochrome b6f complex*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 103, no. 1, páginas 69–74, 2006.
- [Yanai 04] Takeshi Yanai, David P Tew y Nicholas C Handy. *A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP)*. Chem. Phys. Lett., vol. 393, no. 1–3, páginas 51–57, 2004.
- [Yoneya 94] M. Yoneya, H. J. C. Berendsen y K. Hirasawa. *A Noniterative Matrix Method for Constraint Molecular-Dynamics Simulations*. Mol. Simul., vol. 13, páginas 395–405, 1994.

- [Zicha 99] J. Zicha, J. Kuneš y M. A. Devynck. *Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension: a review*. Am. J. Hypertens., vol. 12, páginas 315–331, 1999.