



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE FÍSICA "LUIS RIVERA TERRAZAS"

"PROPIEDADES LUMINISCENTES DEL TRIPTÓFANO EN DIFERENTES SOLVENTES Y SENSIBILIZADO CON EUROPIO"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
(FÍSICA)

PRESENTA
M. C. DIANA MILENA URIZA PRIAS

DIRECTORES DE TESIS
DR. JUAN FRANCISCO RIVAS SILVA
DR. ANTONIO MÉNDEZ BLAS

No. de CVU: 709846

SEPTIEMBRE DE 2021

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Instituto de Física «Luis Rivera Terrazas»**

**«Propiedades luminiscentes del Triptófano en
diferentes solventes y sensibilizado con Europio»**

Tesis presentada por

M.C. Diana Milena Uriza Prias

para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias
(Física)**

Dirigida por

**Dr. Juan Francisco Rivas Silva
Dr. Antonio Méndez Blas**

Puebla, México
Septiembre 2021

©2021 - M.C. Diana Milena Uriza Prias

Derechos Reservados

Dedicado con amor:

*A mis padres quienes con sabiduría, amor, paciencia y mucho esfuerzo
me enseñaron a navegar por el camino de la vida con vehemencia y
humildad.*

*A William por su apoyo incondicional, por estar presente en los
momentos más difíciles y también en los más felices, durante nuestra
estancia en México.*

Y a mi hermano Daniel.

Agradecimientos

En principio agradezco al Instituto de Física “Ing. Luis Rivera Terrazas”(IFUAP) por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado, así como también a todos los investigadores que me enseñaron y me ayudaron a crecer en ámbito científico.

Agradezco a todas y cada una de las personas del pueblo que contribuyen con sus impuestos, permitiendo a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) brindar la beca N° 582282 y poder llevar acabo mis estudios de posgrado.

También agradezco a mis Asesores de Tesis. Al Dr. Juan F. Rivas por su apoyo, tiempo y paciencia para enseñarme todos los conceptos y teorías necesarias para desarrollar este trabajo, así como los consejos brindados. Al Dr. Antonio Méndez Blas por su apoyo, comprensión y todas sus enseñanzas de la vida y por supuesto de la academia.

Agradezco profundamente a mi novio Willie por su compañía, su apoyo y su ayuda en todos los momentos vividos. Fuimos un gran equipo y espero que siga siendo así.

No sin menos importancia, agradezco a mi familia, pues a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes con sus consejos, su amor e interés y me impulsaron a culminar este logro.

Finalmente, agradezco también al comité sinodal, Dr. Jorge Garza Olguín, Dra. María Eugenia Mendoza Álvarez, Dr. Juan Manuel Solano Altamirano y Dr. Luis Octavio Meza Espinoza por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

Propiedades luminiscentes del Triptófano en diferentes solventes y sensibilizado con Europio

Resumen

Las propiedades luminiscentes del aminoácido Triptófano (*Trp*) son muy importantes en el campo de la biología, medicina, física y química, debido a su presencia en múltiples proteínas fundamentales. La fluorescencia del *Trp* es muy sensible al entorno local en el que se encuentre, es por ello que en este trabajo ha sido estudiada teórica y experimentalmente en medios con diferente polaridad, tales como agua, acetona y ciclohexano.

Inicialmente, se encuentra un desplazamiento de la longitud de onda de los espectros de excitación en función del parámetro de concentración para soluciones de *Trp* en agua. Para entender las causas microscópicas de este comportamiento, se realizan cálculos teóricos obtenidos a partir de cuatro clusters modelados: $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$, los cuales permiten considerar las posibles interacciones entre dos o más moléculas de *Trp*. Según la literatura, se espera que la forma más estable del *Trp* en agua sea la zwitteriónica, y para lograr su estabilidad son necesarias nueve moléculas de agua. Ya que no se tiene control sobre el parámetro de volumen en el programa Gaussian, donde son modelados los clusters, se considera que al aumentar la concentración de *Trp* la distancia entre moléculas de *Trp* adyacentes disminuye y comienzan a interactuar, de tal forma que los clusters representan un comportamiento análogo al aumento de la concentración.

Posteriormente, se demuestra la estabilidad zwitteriónica del *Trp* en acetona y se establecen dos clusters $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$ que emulan convenientemente la concentración de *Trp* en acetona. En este caso, se observa un comportamiento particular, pues la principal absorción es debida a una transferencia de carga desde el *Trp* a acetona. En el caso de *Trp* en ciclohexano, se modelaron cuatro clusters $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$, debido a la baja polaridad del solvente no se aprecian enlaces de hidrógeno soluto-solvente. Las propiedades luminiscentes en este caso son muy similares a las observadas en estado gaseoso.

Las propiedades ópticas de los clusters modelados en diferentes solventes, se obtienen mediante el estudio de estados excitados y orbitales moleculares involucrados, usando la metodología de la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) mostrando las transferencias de carga. Los datos espectroscópicos experimentales se comparan con los teóricos, y se encuentra un buen acuerdo entre ellos.

Finalmente, a partir del estudio de *Trp* en agua, se incluye el lantánido Eu^{3+} que naturalmente tiene propiedades luminiscentes debidas a las transiciones f-f. En este

caso, el *Trp* actúa como sensibilizador y transfiere energía al ión Eu^{3+} , el cual en consecuencia despliega las transiciones radiativas que lo caracterizan con una eficiencia mayor. Además, se muestran los orbitales moleculares involucrados en la absorción del complejo.

Luminescent properties of Tryptophan in different solvents and sensitized with Europium

Abstract

The luminescent properties of the amino acid Tryptophan (*Trp*) are significant in the fields of biology, medicine, physics and chemistry, due to its presence in multiple fundamental proteins. The fluorescence of *Trp* is very sensitive to the local environment in which it is found, for this reason in this work has been studied theoretically and experimentally in media with different polarities, such as water, acetone and cyclohexane.

Initially, a wavelength shift of the excitation spectra as a function of the concentration parameter is found for solutions of *Trp* in water. In order to understand the microscopic causes of this behavior, theoretical calculations obtained from four modeled clusters: $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ and $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$, which allow considering the possible interactions between two or more *Trp* molecules, are performed. According to the literature, the most stable form of *Trp* in water is expected to be the zwitterionic form, and nine water molecules are required to achieve its stability. Since there is no control over the volume parameter in the Gaussian program, for the clusters modeled, it is considered that as the concentration of *Trp* increases, the distance between adjacent *Trp* molecules decreases and they begin to interact, so that the clusters represent an analogous behavior as the concentration increases.

Subsequently, the zwitterionic stability of *Trp* in acetone is demonstrated and two clusters $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ and $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$ are established that conveniently emulate the concentration of *Trp* in acetone. In this case, a particular behavior is observed, as the main adsorption is due to a charge transfer from *Trp* to acetone. In the case of *Trp* in cyclohexane, four clusters $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ and $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$ were modeled, due to the low polarity of the solvent no solute-solvent hydrogen bonds are appreciated. The luminescent properties, in this case, are very similar to those observed in the gaseous state.

The optical properties of the modeled clusters in different solvents are obtained by studying the excited states and molecular orbitals involved, using the time-dependent density functional theory (TD-DFT) methodology showing the charge transfers. The experimental spectroscopic data are compared with the theoretical ones, and a good agreement between them is found.

Finally, from the study of *Trp* in water, we include the lanthanide Eu^{3+} which naturally has luminescent properties due to f-f transitions. In this case, the *Trp* acts

as a sensitizer and transfers energy to the Eu^{3+} ion, which consequently deploys the radiative transitions that characterize it with greater efficiency. In addition, the molecular orbitals involved in the adsorption of the complex are shown.

Publicaciones

- Uriza-Prias, D.M., Méndez-Blas, A. and Rivas-Silva, J.F “Redshift of Excitation Wavelength Caused by the Concentration of L-Tryptophan in Water: A Theoretical and Experimental Study”, *Open Journal of Physical Chemistry*, 11, 87-105, (2021). **(publicado)**
- Uriza-Prias, D.M., Méndez-Blas, A. and Rivas-Silva, J.F “A study of the effects of the polarity of the solvents acetone and cyclohexane on the luminescent properties of tryptophan”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **(enviado para publicación)**
- Uriza-Prias, D.M., Méndez-Blas, A. and Rivas-Silva, J.F “A theoretical and experimental analysis of the luminescent properties of Europium(III) complex sensitized by tryptophan”. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **(enviado para publicación)**

Participación en eventos

- “Modeling supercomplex molecules of biophysical interest: interaction and energy transfer”. Diana M. Uriza, J. F. Rivas, G. L. Celardo, Minerva. G. Melchor. 10th meeting on molecular simulations, Enero de 2018, Cuernavaca, México. (Póster)
- “Propiedades luminiscentes del aminoácido Triptófano”. Diana M. Uriza-Prias. Seminario del cuerpo académico de biofísica y mecánica estadística, Julio de 2019, Puebla, México. (Plática)
- “Propiedades luminiscentes del aminoácido Triptófano”. Diana M. Uriza-Prias, A. Méndez-Blas, J. F. Rivas-Rivas. XVIII Reunión Mexicana de Fisicoquímica, Julio de 2019, Toluca, México. (Póster)
- “Propiedades luminiscentes del aminoácido Triptófano en agua”. Diana M. Uriza-Prias. Seminario de estudiantes del IFUAP, Octubre de 2019, Puebla, México. (Plática)

- “Theoretical and experimental study of Tryptophan in water”. Diana M. Uriza-Prias, A. Méndez-Blas, J. F. Rivas-Rivas. QuEBS, Octubre de 2019, Puebla, México. (Póster)

Índice general

Índice de figuras	XVI
Índice de figuras	XVII
Índice de tablas	XXIV
Índice de tablas	XXV
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Hipótesis	6
1.3. Objetivos	7
1.4. Esquema general de la tesis	7
2. Fundamentos Teóricos	9
2.1. Aproximación de Born-Oppenheimer	10
2.2. Métodos basados en la función de onda	12
2.2.1. Aproximación de Hartree-Fock	12
2.2.2. Interacción de Configuraciones	17
2.2.3. Métodos semi-empíricos	17
2.3. Métodos basados en DFT	20
2.3.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn	21
2.3.2. Ecuaciones de Kohn-Sham	22
2.3.3. Funcionales de Intercambio y Correlación	24
2.3.4. Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT)	27
2.4. Orbitales Moleculares	28
2.4.1. Espectroscopía UV-Vis	29
2.5. Efectos del disolvente	30
2.5.1. Modelo explícito	31
2.5.2. Modelo Implícito	31
2.6. Principios de la espectroscopía	32
2.7. Fluorescencia	33
2.7.1. Transferencia de energía de resonancia	35

2.8. Propiedades de absorción y emisión del Europio	36
3. Metodología	39
3.1. Modelado de los clusters	39
3.1.1. <i>Trp</i> en agua	39
3.1.2. <i>Trp</i> en acetona	43
3.1.3. <i>Trp</i> en ciclohexano	48
3.1.4. Eu^{3+} sensibilizado con <i>Trp</i> en agua	51
3.2. Método de cálculo	53
3.3. Método experimental	53
4. Resultados y Discusión	55
4.1. Confórmeros de Triptófano	55
4.2. Absorción y emisión del <i>Trp</i> en estado gaseoso	58
4.3. Transferencia de protones del <i>Trp</i> mediada por el agua y su efecto a la absorción óptica	60
4.3.1. Reacción de transferencia de protones con PCM	61
4.3.2. Reacción de transferencia de protones con una molécula de agua	64
4.4. Propiedades luminiscentes del Triptófano en agua	67
4.4.1. Análisis experimental	67
4.4.2. Análisis teórico	69
4.5. Elección de solventes menos polares al agua para el estudio de <i>Trp</i>	77
4.6. Transferencia de protones del <i>Trp</i> mediada por acetona y su efecto a la absorción óptica	79
4.6.1. Reacción de transferencia de protones con PCM	79
4.7. Propiedades luminiscentes del Triptófano en acetona	83
4.7.1. Análisis experimental	83
4.7.2. Análisis teórico	85
4.8. Propiedades luminiscentes del Triptófano en ciclohexano	90
4.8.1. Análisis experimental	90
4.8.2. Análisis Teórico	91
4.9. Estudio de Triptófano sensibilizado con Europio en agua	98
4.9.1. Análisis experimental	98
4.9.2. Análisis teórico	104
5. Conclusiones	113
A. Aspectos generales de los métodos PM3 y PM6	117
B. Funciones Base	121
C. Análisis de posibles geometrías de <i>Trp</i> en agua	125

D. Efecto de considerar moléculas de agua como impurezas en el disolvente acetona	129
D.1. Efecto de moléculas de agua en el espectro de absorción para el cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$	129
D.2. Efecto de moléculas de agua en el espectro de absorción para el cluster $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$	130
E. Análisis de los orbitales moleculares de Trp en ciclohexano con dos métodos de solvatación	133
F. Análisis de posibles geometrías de Trp en ciclohexano	135
G. Fundamentos teóricos de los modelos implementados en LUMPAC	139
G.1. Proceso de optimización de geometría	139
G.2. Cálculo de estados excitados	140
G.3. Cálculo de parámetros de intensidad	140
G.4. Cálculo de la tasa de emisión radiativa	143
G.5. Cálculo de tasas de transferencia de energía	144
G.6. Cálculo del rendimiento cuántico de emisiones	146
Bibliografía	149

Índice de figuras

1.1.	Figura tomada de [3]- Figure 3.2. a. Espectro de absorción y b. Espectro de fluorescencia de triptófano (TRP), tirosina (TYR) y fenilalanina (PHE) en solución agua de pH 7.0.	2
1.2.	Figura tomada de [3]- Figure 16.4. Espectro de excitación anisotrópico de triptófano en propilenglicol a -50°C	3
1.3.	Figura tomada de [7]- Fig. 2. Orbitales moleculares para el indol en el vacío. Se muestran las composiciones de las principales configuraciones de las transiciones 1L_a y 1L_b	3
1.4.	Ángulos diedros de la estructura de <i>Trp</i> propuestos por Huang et al. [26]. Los ángulos χ_1 y χ_2 se definen como $C_3 - C_\beta - C_\alpha - N$ y $C_\alpha - C_\beta - C_3 - C_{3'}$, respectivamente.	4
1.5.	Forma neutra y zwitteriónica que ocurre directamente mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno del grupo carboxilo al grupo amino.	5
2.1.	Representación de una superficie de energía potencial.	11
2.2.	Esquema representativo del espectrofotómetro de un solo haz.	33
2.3.	Representación de un diagrama de Jablonski.	34
2.4.	Figura tomada de [3]- Fig. 1.24. Transferencia de energía entre monómeros etiquetados como donador (D) y aceptor (A) que se asocian para formar un dímero. Este ejemplo representa el donador como el triptófano (Trp) y el aceptor como el dansilo (DNS).	36
2.5.	Figura tomada de [80]- Fig. 2.3. Diagrama de Dieke de los niveles de energía de algunos iones lantánidos trivalentes.	38
3.1.	Geometrías optimizadas de los confórmeros <i>Zpt</i> y <i>Zag</i> ⁺ en agua, usando el modelo PCM.	40
3.2.	Geometrías optimizadas de los clusters de <i>Trp</i> en agua, usando nueve moléculas de agua alrededor de cada <i>Trp</i>	42

3.3. Ilustración cualitativa de la masa de un soluto en un volumen determinado que aumenta con la concentración. A bajas concentraciones de soluto, la distancia media de separación entre las moléculas de soluto es grande, pero disminuye al aumentar la concentración, de forma que $\bar{r}_a < \bar{r}_b < \bar{r}_c$	42
3.4. Espectros de absorción óptica calculados para los confórmeros a) Nag^+ -PCM y b) Zag^+ -PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados con mayor fuerza de oscilador.	44
3.5. Espectros de absorción UV-Vis para diferentes clusters de <i>Trp</i> en acetona (C_3H_6O) usando un modelo de solvatación discreto y en algunos casos PCM: a) $Nag^+-(C_3H_6O)_1$, b) $Nag^+-(C_3H_6O)_1$ -PCM, c) $Zag^+-(C_3H_6O)_1$ -PCM, d) $Nag^+-(C_3H_6O)_2$, e) $Zag^+-(C_3H_6O)_2$, f) $Nag^+-(C_3H_6O)_2$ -PCM, g) $Zag^+-(C_3H_6O)_2$ -PCM, h) $Nag^+-(C_3H_6O)_3$, i) $Zag^+-(C_3H_6O)_3$, j) $Nag^+-(C_3H_6O)_3$ -PCM, k) $Zag^+-(C_3H_6O)_3$ -PCM, l) $Nag^+-(C_3H_6O)_4$, m) $Zag^+-(C_3H_6O)_4$, n) $Zag^+-(C_3H_6O)_5$ y o) $Zag^+-(C_3H_6O)_9$	45
3.6. Geometrías optimizadas de los clusters de <i>Trp</i> en acetona, usando diecisiete moléculas de acetona alrededor de cada <i>Trp</i>	48
3.7. Geometrías optimizadas de los clusters de <i>Trp</i> en ciclohexano, con el confórmero Nag^+ usando el método de solvatación a) implícito con el PCM, b) explícito con dos moléculas de ciclohexano y c) una mezcla de los dos anteriores.	49
3.8. Espectros de absorción óptica calculados para las geometrías optimizadas de los clusters de <i>Trp</i> en ciclohexano, con el confórmero Nag^+ usando el método de solvatación a) implícito con el PCM, b) explícito con 2 moléculas de ciclohexano y c) una mezcla de los dos anteriores.	50
3.9. Geometrías optimizadas de los clusters de <i>Trp</i> en ciclohexano propuestos para modelar la concentración, con el confórmero Nag^+ usando el método de solvatación PCM.	50
3.10. Geometrías optimizadas de los clusters de a) <i>Trp</i> en agua y b) $EuCl_3 \cdot 6H_2O$	51
3.11. Geometría optimizada del complejo <i>Trp</i> - $EuCl_3$ en agua.	52
4.1. Geometrías optimizadas de las estructuras neutras de <i>Trp</i> en solución de agua (PCM).	55
4.2. Geometrías optimizadas de las estructuras zwitteriónicas de <i>Trp</i> en solución de agua (PCM).	56
4.3. Espectro de absorción óptica del confórmero Nag^+ optimizado al nivel a) PM6 y b) B3LYP/6-31+G(d,p). Las líneas rojas representan los estados excitados calculados, su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador. Usando PM6 el estado más fuerte se localiza a $\lambda = 273.56$ nm y con B3LYP/6-31+G(d,p) el estado más fuerte se localiza a $\lambda = 275.22$ nm.	58

4.4. Orbitales moleculares involucrados en las primeras tres transiciones electrónicas para el conformero Nag^+ optimizado al nivel a) PM6 y b) B3LYP/6-31+G(d,p).	59
4.5. Diagrama representativo del proceso de fluorescencia del Trp en estado gaseoso con el conformero Nag^+ . Se incluyen las estructuras geométricas optimizadas del estado fundamental (EF) y del estado excitado (EE).	60
4.6. Energía relativa en función de la coordenada de reacción intrínseca (IRC) para Trp en agua modelada con PCM.	61
4.7. Espectro de absorción óptica del conformero a) Npg^+ y b) Zpg^+ en agua con PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados y su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador de cada estado. . .	62
4.8. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Npg^+ . La transición en rojo es la que tiene mayor fuerza de oscilador del sistema.	63
4.9. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura zwitteriónica, Zpg^+ . La transición en rojo es la que tiene mayor fuerza de oscilador del sistema.	63
4.10. Energía relativa en función de la coordenada de reacción intrínseca (IRC) para Trp con una molécula de agua explícita.	64
4.11. Espectro de AO del conformero a) Npg^+ y b) Zpg^+ con una molécula de agua. Las líneas rojas representan los estados excitados y su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador de cada estado.	65
4.12. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Npg^+ , y una molécula de agua. La transición en rojo es la más fuerte del sistema.	66
4.13. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Zpg^+ , y una molécula de agua. La transición en rojo es la más fuerte del sistema.	66
4.14. Comparación entre los espectros de absorción (color negro) y excitación (color rojo) para diferentes concentraciones de Trp en agua. Para cada espectro de excitación, $\lambda_{em}=357$ nm.	67
4.15. Espectro de emisión normalizado a partir del espectro de máxima excitación, para diez soluciones de Trp en agua a diferentes concentraciones, el máximo de la banda de emisión de todas las soluciones coincide en $\lambda_{em}=357$ nm.	68
4.16. Intensidad de emisión en $\lambda_{em} = 357$ nm en función de la concentración de Trp en agua.	69
4.17. Espectro de AO calculado para el conformero Zpt en los clusters modelados. (a.) $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, (b.) $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, (c.) $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y (d.) $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	70

4.18. Espectro de AO calculado para el confórmero Zag^+ en los clusters modelados. (a.) $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, (b.) $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, (c.) $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y (d.) $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	71
4.19. Espectros de excitación de Trp en agua para las concentraciones 0.01 y 2 mM, representadas por las líneas discontinuas negra y roja, respectivamente. Los estados excitados calculados para $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ son representados por las líneas azul y rosa, respectivamente.	73
4.20. Orbitales moleculares involucrados en las líneas de absorción representativas de los clusters $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ y $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ obtenidos mediante el cálculo TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p)//PM6.	74
4.21. Orbitales moleculares involucrados en las líneas de absorción representativas del cluster $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ obtenidos mediante el cálculo TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p)//PM6.	75
4.22. Diagrama representativo del proceso de luminiscencia del cluster $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ con el confórmero Zpt . Se ilustran las geometrías optimizadas del estado fundamental y del estado excitado fluorescente. Las líneas discontinuas azules muestran las longitudes de los enlaces de hidrógeno medidas en Angstroms (Å).	76
4.23. Espectro de emisión experimental de Trp en agua, representado por la línea discontinua negra. Los estados fluorescentes del cluster $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ con los confórmeros Zag^+ y Zpt	77
4.24. Espectro de excitación de diferentes solventes. La longitud de onda de emisión se especifica para cada solvente.	78
4.25. Espectro de emisión de diferentes solventes. La longitud de onda de excitación se especifica en cada panel. Se ha incluido la emisión de Trp en agua para comparar con la intensidad y región de emisión de los disolventes, y así favorecer el estudio con disolventes que no inhiban la señal del Trp	78
4.26. Energía relativa en función de la coordenada de reacción (IRC) para Trp en acetona modelada con PCM.	80
4.27. Comparación entre la energía relativa en función de la coordenada de reacción (IRC) para Trp en agua y acetona modeladas con PCM.	80
4.28. Espectro de AO del confórmero a) Nag^+ y b) Zag^+ en acetona con PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados calculados con una intensidad proporcional a la fuerza de oscilador. Nótese que el estado con mayor fuerza de oscilador relacionado a una transición directa de Trp se localiza en $\lambda = 278.79$ nm para Nag^+ y $\lambda = 275.87$ nm para Zag^+	81

4.29. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura Nag^+ en acetona. Las transiciones a $\lambda = 278.79$ nm y $\lambda = 259.6$ nm se relacionan con las transiciones ya conocidas del Trp 1L_a y 1L_b , respectivamente. Los demás orbitales muestran contribución del entorno local.	82
4.30. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura Zag^+ en acetona. Las transiciones a $\lambda = 275.87$ nm y $\lambda = 260.26$ nm se relacionan con las transiciones ya conocidas del Trp 1L_a y 1L_b , respectivamente. Los demás orbitales muestran contribución del entorno local.	82
4.31. Espectro de excitación experimental de Trp en acetona a cuatro concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta con líneas discontinuas el espectro de excitación de acetona pura. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.	83
4.32. Espectro de emisión experimental de Trp en acetona a cuatro concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta y en un recuadro un acercamiento del espectro de excitación de acetona pura. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.	84
4.33. (a) Espectro de excitación de Trp en acetona a $\lambda_{em}=350$ nm y $\lambda_{em}=381$ nm. (b) Espectro de emisión de Trp en acetona a $\lambda_{em}=291$ nm y $\lambda_{em}=344$ nm. La concentración estudiada fue de 5 mM.	85
4.34. Enlaces de hidrógeno en el estado fundamental de los clusters (a) $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y (b) $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$	86
4.35. Espectros de AO para los clusters construidos (a) $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y (b) $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$	86
4.36. Espectros de excitación normalizados de Trp en acetona para una concentración de 5 mM a diferentes longitudes de onda $\lambda_{em}=381$ nm (cuadros azules) y $\lambda_{em}=350$ nm (círculos verdes). La línea continua es el espectro de AO normalizado del cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ con las líneas de absorción representativas.	87
4.37. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$. Las dos transiciones con mayor fuerza de oscilador se localizan en $\lambda = 300$ nm y $\lambda = 289$ nm y presentan transferencia de carga $Trp \rightarrow$ acetona. Aunque a $\lambda = 293$ nm hay transferencia de carga $Trp \rightarrow Trp +$ acetona.	88
4.38. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$. Las transiciones con mayor fuerza de oscilador se localizan en $\lambda = 333$ nm y $\lambda = 325$ nm y presentan transferencia de carga $Trp \rightarrow$ acetona.	89

4.39. Espectros de excitación normalizados de <i>Trp</i> en ciclohexano a tres concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta con líneas discontinuas el espectro de excitación de ciclohexano puro. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.	90
4.40. Espectros de emisión normalizados de <i>Trp</i> en ciclohexano a tres concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta y en un recuadro un acercamiento del espectro de emisión de ciclohexano puro. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.	91
4.41. Espectros de AO para los clusters construidos (a) $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, (b) $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, (c) $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ y (d) $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$	92
4.42. Espectro de excitación normalizado de <i>Trp</i> en ciclohexano para una concentración de 0.1 mM, $\lambda_{em}=347$ nm (círculos verdes). La línea continua es el espectro de AO normalizado del cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$ con sus respectivas líneas de absorción.	93
4.43. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$. Las transiciones a $\lambda = 279$ nm y $\lambda = 263$ nm se relacionan con los estados característicos 1L_a y 1L_b , respectivamente.	93
4.44. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$. Se puede notar la contribución de ambas moléculas de <i>Trp</i> en las transiciones electrónicas.	95
4.45. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$. Se puede notar la contribución de cada molécula de <i>Trp</i> en las transiciones electrónicas.	96
4.46. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$. En este caso se mezclan los comportamientos de los clusters $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$, se observa distribuciones de carga entre varias moléculas de <i>Trp</i> y transiciones individuales de cada molécula.	96
4.47. Diagrama del proceso de emisión del cluster a) $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$ y b) $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$. Se ilustran las geometrías optimizadas del estado fundamental (EF) y estado excitado (EE) fluorescente. Las líneas verdes muestran las longitudes de los enlaces de hidrógeno del <i>Trp</i> en Angstroms (Å).	97
4.48. Espectro de emisión experimental de <i>Trp</i> en ciclohexano a 0.1 mM, representado por la línea negra. Los estados fluorescentes de los clusters $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$ se representan por la línea roja y azul, respectivamente.	97
4.49. Imagen real de la medición.	98

4.50. Espectro de excitación (curva roja) y emisión (curva azul) experimental del ion Eu^{3+} en agua, con sus respectivas transiciones.	99
4.51. Espectros de excitación de Eu^{3+} en agua a 10 mM agregando <i>Trp</i> a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM), incluyendo el espectro de excitación de Europio sin <i>Trp</i> . En todos los casos $\lambda_{em} = 590$ nm. .	100
4.52. Espectros de emisión de Eu^{3+} en agua a 10 mM agregando <i>Trp</i> a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM), incluyendo el espectro de emisión de Europio sin <i>Trp</i> . En todos los casos $\lambda_{ex} = 393$ nm. . . .	101
4.53. a) Intensidad de fluorescencia de Eu^{3+} bajo la presencia de <i>Trp</i> a diferentes concentraciones y b) en escala logarítmica de la concentración. .	101
4.54. En el panel izquierdo se presentan los espectros de excitación y en el panel derecho los espectros de emisión de <i>Trp</i> a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM) en una solución de cloruro de Europio de 10 mM en agua.	102
4.55. a) Intensidad de emisión de <i>Trp</i> en agua a diferentes concentraciones y b) en escala logarítmica de la concentración (curva roja) y en una solución de 10 mM de cloruro de Europio en agua (curva azul).	102
4.56. Superficie mapeada en color 3D del patrón espectral de excitación-emisión para una concentración de 0.01 mM de <i>Trp</i> en una solución de 10 mM de Eu^{3+} en agua.	103
4.57. Superficie mapeada en color 3D del patrón espectral de excitación-emisión para una concentración de 10 mM de <i>Trp</i> en una solución de 10 mM de Eu^{3+} en agua.	104
4.58. Esquema representativo de Jablonski de transferencia de energía de <i>Trp</i> a los niveles de emisión del ion Eu^{3+}	105
4.59. Espectros de emisión de los niveles $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ (590 nm) y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ (615 nm) medidos para el complejo <i>Trp</i> - Eu^{3+} a diferentes concentraciones de <i>Trp</i> (0.01, 0.1, 1 y 10 mM) en una solución de cloruro de Europio de 10 mM en agua.	105
4.60. Espectros de absorción del complejo de emisión de <i>Trp</i> - Eu^{3+} en agua calculado con LUMPAC (curva negra) y con Gaussian (curva azul). Las líneas rojas son los estados excitados calculados con Gaussian. . .	106
4.61. Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo <i>Trp</i> - Eu^{3+} en agua calculadas en LUMPAC. .	107
4.62. Orbitales moleculares (α , espín $\uparrow$) involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo <i>Trp</i> - Eu^{3+} en agua calculadas en Gaussian.	109
4.63. Orbitales moleculares (β , espín $\downarrow$) involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo <i>Trp</i> - Eu^{3+} en agua calculadas en Gaussian.	109

4.64. Diagrama de Jablonski para el complejo $\text{Eu}^{3+}(\text{Trp})$ en agua que muestra las trayectorias más probables para la transferencia de energía intramolecular.	111
C.1. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_2 - (\text{H}_2\text{O})_{18}$	125
C.2. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_2 - (\text{H}_2\text{O})_{18}$ con Z_{pt} . . .	126
C.3. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_2 - (\text{H}_2\text{O})_{18}$ con Z_{ag}^+ . .	126
C.4. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_3 - (\text{H}_2\text{O})_{27}$	126
C.5. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_4 - (\text{H}_2\text{O})_{36}$	127
C.6. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_3 - (\text{H}_2\text{O})_{27}$ con Z_{pt} . . .	127
C.7. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_3 - (\text{H}_2\text{O})_{27}$ con Z_{ag}^+ . .	127
C.8. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_4 - (\text{H}_2\text{O})_{36}$ con Z_{pt} . . .	128
C.9. Geometrías optimizadas para el cluster $(\text{Trp})_4 - (\text{H}_2\text{O})_{36}$ con Z_{ag}^+ . .	128
D.1. Comparación del espectro de excitación experimental de Trp en acetona (curva violeta) a $\lambda_{\text{em}} = 381$ nm, con espectros de absorción de 1 molécula de Trp con y sin moléculas de agua acompañadas de moléculas de acetona, como se describe en la parte superior de cada panel. .	130
D.2. Comparación del espectro de excitación experimental de Trp en acetona (curva violeta) a $\lambda_{\text{em}} = 381$ nm, con espectros de absorción de 2 moléculas de Trp con y sin moléculas de agua acompañadas de moléculas de acetona, como se describe en la parte superior de cada panel. .	131
E.1. Comparación de los orbitales moleculares involucrados en las transiciones más relevantes de Trp en ciclohexano modelado de de forma continua (PCM) y discreta (con dos moléculas de ciclohexano).	134
F.1. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_2 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	135
F.2. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_3 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	135
F.3. Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(\text{Trp})_4 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	136
F.4. Geometrías optimizadas del cluster $(\text{Trp})_2 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	136
F.5. Geometrías optimizadas del cluster $(\text{Trp})_3 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	136
F.6. Geometrías optimizadas del cluster $(\text{Trp})_4 - (\text{C}_6\text{H}_{12})$	137

Índice de tablas

2.1.	Transiciones observadas del espectro de absorción del Eu^{3+}	37
2.2.	Transiciones observadas del espectro de luminiscencia del Eu^{3+}	37
3.1.	Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de los confórmers de <i>Trp</i> zwitteriónicos y neutros más estables en acetona simulados con el modelo PCM con los métodos indicados. Los datos fueron reportados por Hurtado et al. [24].	43
3.2.	Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de Nag^+ y Zag^+ simulados con el modelo de solvatación discreto y en algunos casos también con el PCM. El método de cálculo para todos los casos fue B3LYP/6-31+G(d,p)//TD-B3LYP/6-311+G(d,p).	46
3.3.	Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees, calculadas al nivel PM6//B3LYP/6-311+G(d,p), para los clusters con <i>Trp</i> más estables con 17 moléculas de acetona explícitas.	47
3.4.	Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de los confórmers de <i>Trp</i> zwitteriónicos y neutros más estables en ciclohexano simulados con el modelo PCM con los métodos indicados. Los datos fueron reportados por Hurtado et al. [24].	49
4.1.	Energías electrónicas absolutas de las estructuras neutras y zwitteriónicas de <i>Trp</i> en solución de agua (PCM), medidas en Hartrees y calculadas al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).	57
4.2.	Energías electrónicas absolutas de las estructuras neutras y zwitteriónicas de <i>Trp</i> en estado gaseoso, medidas en Hartrees y calculadas al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).	57
4.3.	Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de las estructuras zwitteriónicas de <i>Trp</i> más estables, cada una con 8 moléculas de agua circundantes. Los cálculos se realizaron al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).	58
4.4.	Frecuencias de vibración de las geometrías Nag^+ optimizadas al nivel PM6 y B3LYP/6-31+G(d,p).	59

4.5. Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los cuatro clusters con el conformero <i>Zpt</i> , respectivamente.	72
4.6. Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los dos clusters de <i>Trp</i> en acetona, con el conformero <i>Zpt</i> , respectivamente.	88
4.7. Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los cuatro clusters de <i>Trp</i> en ciclohexano, con el conformero <i>Nag</i> ⁺ , respectivamente.	94
4.8. Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición del complejo <i>Trp</i> -Eu ³⁺ en agua, con dos métodos. . . .	108
4.9. Valores teóricos y experimentales de los parámetros de intensidad (Ω_λ), tasas de emisión radiativa (A_{rad}) y no radiativa (A_{nrad}) y eficiencia cuántica de emisión del nivel ⁵ <i>D</i> ₀ del complejo <i>Trp</i> -Eu ³⁺	110
4.10. Energías del estado singlete y triplete, mecanismo multipolar y de exchange, valores R_L (distancia entre el estado donante y aceptor, involucrados en el proceso de transferencia de energía), tasa de transferencia de energía (W_{ET}) y de retroalimentación o <i>back-transfer</i> (W_{BT}). . . .	110
E.1. Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición del <i>Trp</i> en ciclohexano, con dos métodos de solvatación. . . .	134

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes

La fluorescencia intrínseca de las proteínas ha jugado un rol importante en las aplicaciones bioquímicas y biofísicas. Un ejemplo de ello es la microscopía de fluorescencia de tejidos, células o estructuras subcelulares a través de biomarcadores, los cuales permiten identificar anticuerpos con fluoróforos. Asimismo, la fluorescencia ha permitido estudiar la estructura y conformación de proteínas o del ADN [1,2]. Respecto a las proteínas, existen tres aminoácidos con una fluorescencia significativa, estos son: fenilalanina, tirosina y triptófano, siendo este último el aminoácido aromático con una fluorescencia intrínseca dominante. A pesar que su presencia en proteínas es poco frecuente, alrededor de 1 mol %, sus características fotoluminiscentes permiten un estudio más profundo de sus propiedades ópticas [3]. En el organismo humano se pueden identificar diferentes proteínas que contienen triptófano (*Trp*) en su estructura, desde la tubulina en el cerebro, cuya función principal es promover procesos de transferencia de energía [4,5], hasta la mioglobina en los tejidos musculares, donde el *Trp* permite la transferencia no sólo de energía, sino también de electrones [6]. En este sentido, se puede encontrar una gran variedad de proteínas que contienen *Trp*, y aunque este aminoácido no pueda ser sintetizado por el cuerpo humano, su papel biológico es fundamental.

La parte dominante para el proceso de absorción y emisión del *Trp* es el grupo indol que lo constituye [7,8]. Debido a que una proteína puede tener uno o varios residuos de *Trp*, el comportamiento individual de este aminoácido como fuente principal de fluorescencia puede dar idea de los procesos químicos y biológicos de las proteínas en general [3,9]. La principal propiedad luminiscente del *Trp* es la alta sensibilidad al entorno local en el que se encuentre inmerso [10], pues sus estructuras conformacionales, la asociación de subunidades, la sustracción de enlaces, la desnaturalización o cualquier interacción, puede afectar significativamente los espectros de absorción y emisión [3]. Particularmente, los enlaces de hidrógeno que puedan formarse entre el soluto (*Trp*) y el disolvente son muy importantes para entender los procesos físicos

y químicos que intervienen en la fluorescencia. Sin embargo, el entendimiento de las propiedades ópticas del *Trp* en soluciones polares y no polares todavía es un problema abierto.

La fluorescencia de aminoácidos aromáticos ha sido estudiada desde 1956, cuando Teale et al. [11] reportaron experimentalmente los espectros de excitación y emisión de la fenilalanina, la tirosina y el triptófano en agua, observando para el *Trp* que el máximo de emisión ocurre alrededor de $\lambda = 350$ nm, mientras que la absorción máxima ocurre alrededor de $\lambda = 278$ nm (ver Fig. 1.1). Posteriormente, en 1960, Weber [12] mostró que la banda de absorción localizada en la región de 250-310 nm está compuesta de dos transiciones electrónicas isoenergéticas 1L_a y 1L_b (ver Fig. 1.2), las cuales han sido ampliamente estudiadas teórica y experimentalmente [7, 14, 15]. Estas transiciones están orientadas casi perpendicularmente. En general, el estado 1L_b genera un máximo en la absorción, alrededor de $\lambda = 290$ nm, y el estado 1L_a es el responsable de la emisión del *Trp* en solución, siendo muy sensible al ambiente local, debido a que tiene un momento dipolar grande respecto al del estado fundamental [3, 7].

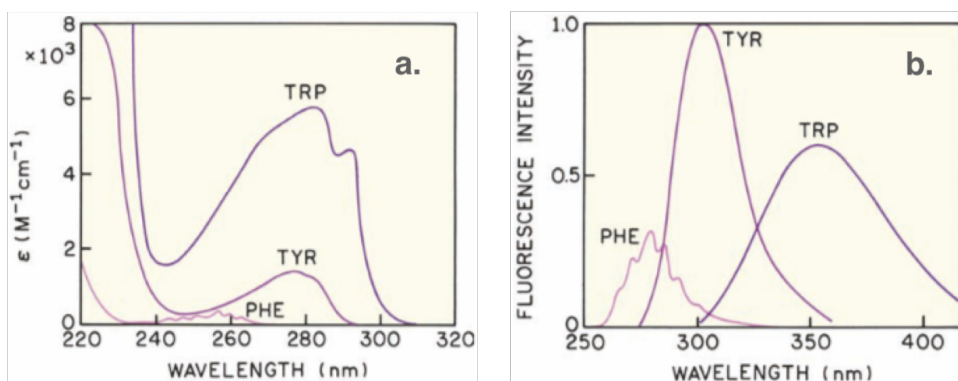


Figura 1.1: Figura tomada de [3]-**Figure 3.2**. a. Espectro de absorción y b. Espectro de fluorescencia de triptófano (TRP), tirosina (TYR) y fenilalanina (PHE) en solución agua de pH 7.0.

Es importante mencionar que los orbitales moleculares de las transiciones 1L_a y 1L_b del indol, fueron obtenidos de tratamientos mecánico-cuánticos por Callis [16] y Slater et al. [17], (ver Fig. 1.3). La transición 1L_a es una excitación con una contribución principalmente de los orbitales HOMO→LUMO, con una menor contribución de la transición HOMO-1→LUMO+1. Mientras que la transición 1L_b puede darse por una superposición casi igual de las excitaciones HOMO→LUMO+1 y HOMO-1→LUMO [7].

Un aspecto relevante del aminoácido *Trp* es su diversidad de isómeros conformacionales, de hecho existen diferentes confórmeros que han sido ampliamente estudiados [18–21], la forma de caracterizarlos es a través de los ángulos diedros χ_1 y χ_2 descritos por los átomos $C_3 - C_\beta - C_\alpha - N$ y $C_\alpha - C_\beta - C_3 - C_{3'}$ (ver Fig. 1.4), res-

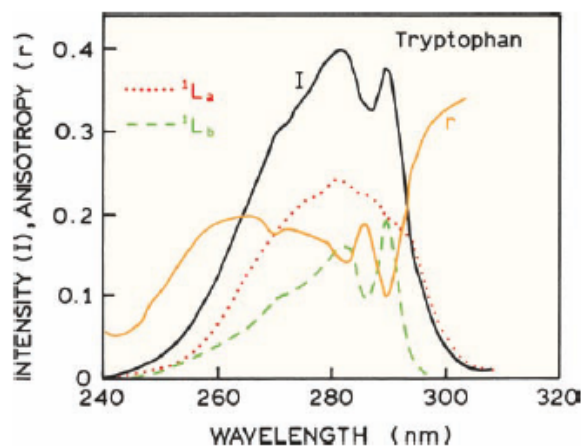


Figura 1.2: Figura tomada de [3]-**Figure 16.4**. Espectro de excitación anisotrópico de triptófano en propilenglicol a -50°C .

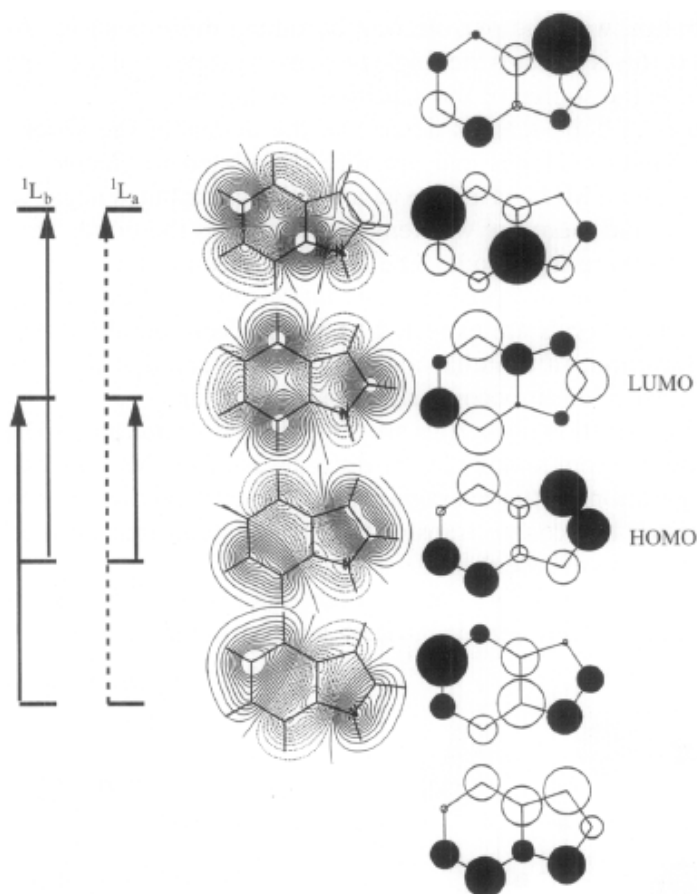


Figura 1.3: Figura tomada de [7]-**Fig. 2**. Orbitales moleculares para el indol en el vacío. Se muestran las composiciones de las principales configuraciones de las transiciones 1L_a y 1L_b .

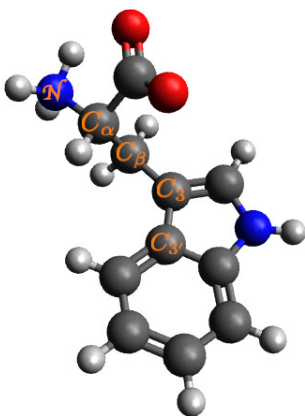


Figura 1.4: Ángulos diedros de la estructura de *Trp* propuestos por Huang et al. [26]. Los ángulos χ_1 y χ_2 se definen como $C_3 - C_\beta - C_\alpha - N$ y $C_\alpha - C_\beta - C_3 - C_{3'}$, respectivamente.

pectivamente. Cuando χ_1 toma valores cercanos a 180, 60 y -60° los conformeros son etiquetados como g^+ , t , y g^- debido a sus enlaces *gauche* y *trans*; cuando χ_2 toma valores cercanos a 90 y -90° , los conformeros son etiquetados como p (perpendicular) y a (antiperpendicular) respectivamente. La estabilidad de cada conformero depende del entorno local en el que se encuentre.

Ahora bien, algunos investigadores han realizado algunos cálculos de *Trp* en fase gaseosa o en solución para estudiar sus propiedades estructurales y espectroscópicas, en los cuales se ha considerado sus diversas estructuras conformacionales, que además dependiendo de la polaridad del ambiente, pueden ser más estables en su forma neutra o zwitteriónica (ver Fig. 1.5), pues el átomo de hidrógeno que se encuentra en el grupo carboxilo, puede transitar al grupo amino para formar carga negativa sobre el primer grupo y positiva sobre el segundo, aunque la molécula sea eléctricamente neutra [18–25]. De hecho, en el año 2005, Huang et al. [26] realizaron un extenso análisis de 648 estructuras prueba de *Trp*, encontrando 45 conformeros en fase gaseosa que representan mínimos locales a distintas temperaturas (85-498 K). Los resultados son comparables a los obtenidos por Compagnon et al. (2001) donde el conformero Trp 1, como lo etiquetan los autores, análogo al conformero Zag^+ es un mínimo global a los niveles DFT y MP2 en estado gaseoso, y se estabiliza por el enlace de hidrógeno entre $COOH-NH_2$. Posteriormente, Hurtado et al. [24] en 2014 seleccionaron los seis conformeros más estables de los propuestos por Huang et al. [26], y realizaron un análisis teórico de las estructuras de tautómeros de *Trp* en ambientes microhidratados en agua y disolventes hidrofóbicos. Este estudio es muy importante, ya que da una primera idea de los conformeros que se deben usar dependiendo de la polaridad del medio que se quiera estudiar teóricamente, pues las propiedades espectroscópicas simuladas pueden verse afectadas, en principio, por el conformero de *Trp* empleado para los cálculos [18, 19]. De hecho, en 2013 Liu et al. [21] estudiaron la fluorescencia del *Trp* en agua combinando métodos teóricos y experimentales, sin embargo, el

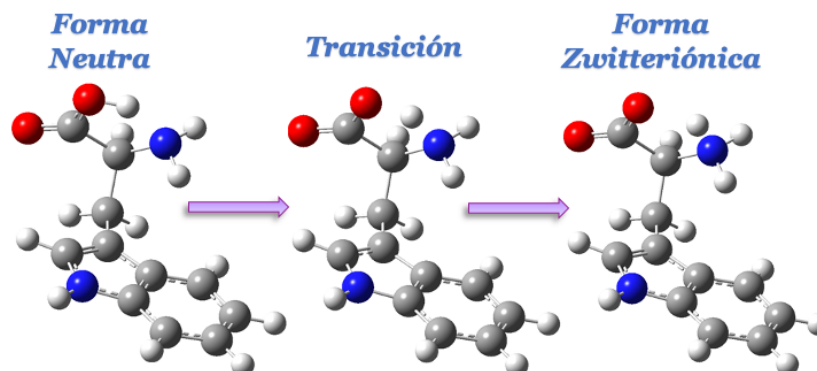


Figura 1.5: Forma neutra y zwitteriónica que ocurre directamente mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno del grupo carboxilo al grupo amino.

confórmero empleado para el modelado teórico, no es el más estable en agua, y los estados excitados de absorción y emisión podrían variar como lo propone Hurtado et al. [24].

Por otro lado, la polaridad del disolvente también afecta las propiedades luminescentes del *Trp*, debido a su sensibilidad al entorno local como se ha mencionado anteriormente. Es por esto, que el estudio de Hurtado et al. [24] puede proporcionar un punto de partida para encontrar el confórmero más estable en otros disolventes, tales como ciclohexano, benceno, cloroformo, dicloroetano, acetona y metanol, ya que los confórmeros más estables en estado gaseoso fueron sometidos a un modelo de solvatación implícito. La desventaja de este modelo, es que ignora las posibles interacciones entre el soluto *Trp* y el disolvente a través de enlaces de hidrógeno que se puedan formar.

Respecto al modelado de clusters que permitan comparar resultados teóricos y experimentales, algunos autores han estudiado el *Trp* en agua, usando moléculas de agua vivas ¹ para la *solvatación explícita* [21, 24, 25] o el *modelo implícito continuo polarizable* ² (PCM) [27] y han mostrado la preferencia de la forma neutra o zwitteriónica del *Trp*, dependiendo del modelo de solvatación o de la cantidad de moléculas de agua consideradas. Sin embargo, es bien conocido para los aminoácidos en estado gaseoso o en medios no polares que la forma neutra es la más estable, mientras que en medios polares la forma zwitteriónica es la más estable, y para garantizar la estabilidad del *Trp* zwitteriónico en agua, es necesario considerar moléculas explícitas del disolvente. Blom et al. [25] fueron los primeros autores en hacer un estudio usando espectroscopía IR y cálculos DFT para definir que el zwitterión es estable con cinco o más moléculas de agua. Aunque, Ghassemizadeh et al. [28] mostró que las

¹moléculas de agua individuales que se adicionan explícitamente alrededor de la molécula de soluto

²método que representa el disolvente como un medio homogéneo caracterizado por una permitividad

moléculas de agua forman tantos enlaces de hidrógeno como sea posible entre ellas y con el zwitterión, de modo que siete y ocho moléculas de agua permiten la formación de enlaces de hidrógeno adicionales entre los polos cargados de los grupos amino y carboxilo, los cuales generan mayor estabilidad termodinámica. Por último, Liu et al. [21] mostraron que el grupo indol se debe tener en cuenta para la solvatación, pues hay un enlace de hidrógeno importante cerca del anillo de cinco carbonos. En conclusión, nueve moléculas de agua alrededor del zwitterión de *Trp* son suficientes para obtener un modelo completo.

Para el modelado de *Trp* en disolventes menos polares, se ha demostrado que la forma zwitteriónica no puede ser despreciada [25]. Específicamente en acetona, no existe ninguna evidencia teórica del número de moléculas de acetona necesarias para un obtener un modelo teórico que permita compararse con resultados experimentales, sólo se encuentra un estudio teórico de clusters con $M^{2+}(\text{acetona})_n$, donde M es un ion de metales alcalinos y n oscila entre dos y ocho para este caso, o clusters con $M^+(\text{acetona})_n$ y n oscilando entre cuatro y seis [29, 30]. En disolventes no polares, como el ciclohexano, la ausencia de enlaces de hidrógeno es evidente, por lo que la estructura más estable es su forma neutra [3, 24].

Finalmente, es preciso mencionar que en la última década se ha aprovechado la fluorescencia de los lantánidos y la de proteínas pequeñas para desarrollar las etiquetas de unión a lantánidos (LBTs por sus siglas en inglés), que esta relacionada con la afinidad con la que proteínas muy pequeñas pueden unirse a iones lantánidos [31]. De hecho, Stuberanrauch et al. [32] mostraron la detección específica del *Trp* mediante un complejo de europio(III) luminiscente, donde la presencia de pequeñas cantidades de *Trp* potencia la emisión del complejo de europio(III) pues actúan como sensibilizadores, y con grandes cantidades de *Trp* propicia su desaparición. Así, vale la pena presentar un modelo teórico preliminar que permita entender mejor el comportamiento de este sistema, aprovechando la luminiscencia del *Trp* y del complejo de europio(III).

1.2. Hipótesis

La luminiscencia del *Trp* es altamente sensible al entorno local en el que se encuentre inmerso, específicamente la polaridad del ambiente local del aminoácido puede cambiar significativamente su espectro de absorción y emisión. Los efectos que generan disolventes tales como agua, acetona y ciclohexano, pueden ser determinados a través de cálculos de química cuántica, aplicando la teoría del funcional de las densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) a modelos propuestos de clusters *Trp* con solvatación explícita o implícita y comparando con datos experimentales.

1.3. Objetivos

Objetivo General

Describir y caracterizar teórica y experimentalmente las propiedades luminiscentes del *Trp* primero en el disolvente polar agua, y luego en el no polar ciclohexano, pasando también por el intermedio acetona. En un trabajo interdisciplinario, relacionando conceptos de la fisicoquímica y la bioquímica para el estudio de la biomolécula (*Trp*) cuyas propiedades fotoluminiscentes son relevantes y sus funciones básicas son fundamentales en la biología. Finalmente se hizo un modelo de su sensibilización en el primer caso con el ion de europio (Eu^{3+}).

Objetivos Específicos

- Encontrar los fundamentos teóricos y computacionales necesarios para el cálculo de las propiedades ópticas básicas del *Trp*.
- Determinar y analizar los parámetros experimentales importantes relacionados con la preparación de las disoluciones de *Trp* y con su caracterización por espectroscopia óptica, específicamente por fotoluminiscencia y absorción óptica.
- Obtener la energía de los estados excitados y sus respectivos espectros de absorción y emisión del *Trp* en diferentes disolventes como el agua, acetona y ciclohexano, utilizando los métodos de la química cuántica a nivel de CIS y DFT.

1.4. Esquema general de la tesis

El contenido de esta tesis está organizado de la siguiente manera:

- En el Capítulo 2 se presentan los aspectos relevantes de la teoría DFT, funcionales de energía de intercambio y correlación, funciones base, teoría TD-DFT, métodos semi-empíricos, modelos de solvatación explícita e implícita y generalidades de la espectroscopia y fluorescencia.
- En el Capítulo 3 se expone la metodología empleada para el cálculo de las propiedades ópticas de cada sistema y su medición experimental.
- En el Capítulo 4 se discuten los resultados de las propiedades espectroscópicas de cada cluster obtenidas teórica y experimentalmente.
- Finalmente, en el Capítulo 5 se describen las conclusiones de este trabajo.

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

El uso actual de metodologías para el tratamiento de átomos, moléculas y sólidos está muy extendido en todas las áreas de la ciencia. Sin embargo, la dificultad de estudiar teóricamente tales sistemas es alta, debido a la gran cantidad de partículas que los componen, por lo que se han desarrollado métodos computacionales que permitan trabajar con sistemas de cientos de átomos bajo ciertas aproximaciones. Los métodos cuánticos (QM por sus siglas en inglés) de la química computacional han sido los más eficaces y precisos para predecir y estimar la estructura de moléculas relativamente pequeñas, permitiendo así el estudio de propiedades estructurales, ópticas, estados de transición, caminos de reacción, entre otros [33]. En el presente trabajo, los QM se han empleado para estudiar las propiedades ópticas del *Trp* en diferentes solventes y con un complejo de europio(III). Para esto, es fundamental obtener las geometrías del estado fundamental y de los estados excitados. Sin embargo, al considerar sistemas cada vez con más átomos, los recursos computacionales son cada vez mayores. Así, cuando se desea analizar la geometría de sistemas modelados muy grandes se utiliza la aproximación de Hartree Fock (HF) [34], métodos semi-empíricos con parametrización como PM6 [35], o en algunos casos métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés) [36], cuando el tamaño del sistema lo permite. Estas teorías fundamentales han sido desarrolladas durante más de 70 años y hasta la fecha siguen renovándose, a través de nuevos funcionales DFT, siendo capaces de proporcionar datos teóricos que son comparables con los experimentales en muchos casos.

Los sistemas moleculares están constituidos por n -partículas interactuantes, por lo tanto se tiene un problema de muchos cuerpos que usando una aproximación no relativista, se puede describir a través de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo

$$\hat{H}\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (2.1)$$

siendo $\hat{H}$ el operador hamiltoniano, $\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ la función de onda que depende de los vectores de posición de los núcleos ($\mathbf{R}$) y de los vectores de posición de los electrones

($\mathbf{r}$), y E la energía. El hamiltoniano completo en unidades atómicas para M núcleos y N electrones es:

$$\begin{aligned}\hat{H} &= T^{elec}(r) + T^{nucl}(R) + V^{nucl-elec}(R, r) + V^{elec}(r) + V^{nucl}(R) \\ &= -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}},\end{aligned}\quad (2.2)$$

donde $r_{iA} = |\mathbf{R}_A - \mathbf{r}_i|$, similar a $r_{iB} = |\mathbf{R}_B - \mathbf{r}_i|$ es la distancia entre el electrón i y el núcleo A o el núcleo B respectivamente, $r_{ij} = |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$ es la distancia entre el electrón i y el electrón j , $R_{AB} = |\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|$ es la distancia entre el núcleo A y el núcleo B , M_A y M_B es la masa del núcleo A y B respectivamente, Z_A y Z_B es el número atómico del núcleo A y B . El primer y segundo término son los operadores de energía cinética de los electrones y núcleos respectivamente, el tercer término representa la interacción Coulombiana entre los núcleos y electrones, el cuarto y quinto término representan las interacciones electrostáticas entre electrones y entre núcleos, respectivamente.

Las interacciones entre electrones y entre núcleos son justamente la razón por la que la ecuación de Schrödinger no se pueda resolver analíticamente, pues se acoplan las coordenadas de los pares de partículas, y se debe encontrar un mecanismo que simplifique el operador $\hat{H}$ para dar solución a esta ecuación.

2.1. Aproximación de Born-Oppenheimer

Debido a que la masa de los núcleos es muy grande comparada con la masa de los electrones, y por tanto el movimiento de los electrones es más rápido que el de los núcleos. Es posible tomar a los núcleos con sus posiciones fijas y resolver las ecuaciones que describen el movimiento de los electrones, considerando que los electrones se mueven en un campo generado por los núcleos fijos, esta es la aproximación de Born-Oppenheimer [37]. Así, la función de onda se puede separar en

$$\Psi(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \Psi_{nucl}(\mathbf{R}) \Psi_{elec}(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (2.3)$$

donde $\Psi_{nucl}(\mathbf{R})$ es la función de onda que depende de la posición de los núcleos, y $\Psi_{elec}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ es la función de onda que depende de la posición de los electrones y paramétricamente de la posición de los núcleos. Consecuentemente, el hamiltoniano electrónico, $\hat{H}_{elec}$, se puede escribir de la siguiente forma:

$$\hat{H}_{elec} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}}. \quad (2.4)$$

Entonces, la ecuación de Schrödinger que describirá el movimiento de los electrones será

$$\hat{H}_{elec} \Psi_{elec}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \epsilon_{elec} \Psi_{elec}(\mathbf{r}, \mathbf{R}), \quad (2.5)$$

donde la energía electrónica, ϵ_{elec} , también dependerá paramétricamente de las posiciones de los núcleos $\epsilon_{elec} = \epsilon_{elec}(\mathbf{R})$. Además, la energía total, ϵ_{tot} , considerando la constante de repulsión entre núcleos, es generalmente llamada superficie de energía potencial de Born-Oppenheimer (ver Fig. 2.1) y se define como

$$\epsilon_{tot} = \epsilon_{elec} + \frac{1}{2} \sum_{A \neq B} \frac{Z_A Z_B}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|}, \quad (2.6)$$

de esta ecuación es posible obtener la geometría de equilibrio y las frecuencias de vibración. Hasta aquí se ha resuelto el problema electrónico, ahora el problema de los núcleos puede solucionarse reemplazando en la ecuación (2.1) las coordenadas electrónicas por sus valores promedio, que proporciona la función de onda electrónica. De este modo, se obtiene un hamiltoniano nuclear, $\hat{H}_{nucl}$, que describe el movimiento de los núcleos inmersos en un campo promedio de electrones y se puede expresar como

$$\begin{aligned} \hat{H}_{nucl} &= -\frac{1}{2} \sum_i \frac{\nabla_{\mathbf{R}_i}^2}{M_i} + \epsilon_{elec}(\mathbf{R}) + \frac{1}{2} \sum_{i \neq j} \frac{Z_i Z_j}{|\mathbf{R}_i - \mathbf{R}_j|}, \\ &= -\frac{1}{2} \sum_i \frac{\nabla_{\mathbf{R}_i}^2}{M_i} + \epsilon_{tot}. \end{aligned} \quad (2.7)$$

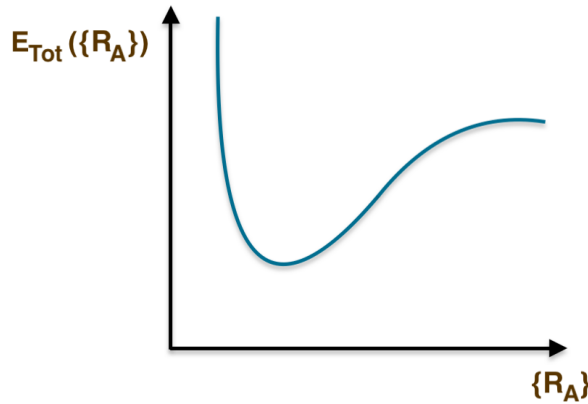


Figura 2.1: Representación de una superficie de energía potencial.

Así que ϵ_{tot} es una energía potencial que sienten los núcleos, y su ecuación de movimiento se describe a partir de

$$\hat{H}_{nucl} \Psi_{nucl}(\mathbf{R}) = \epsilon_{nucl} \Psi_{nucl}(\mathbf{R}). \quad (2.8)$$

La aproximación de Born-Oppenheimer representa un mecanismo útil para resolver sistemas de muchos cuerpos, sin embargo de la ecuación (2.2) las interacciones electrostáticas aún son complicadas de tratar, debido la correlación que existe entre los electrones [38].

2.2. Métodos basados en la función de onda

2.2.1. Aproximación de Hartree-Fock

El fundamento de la teoría de los orbitales moleculares (MO por sus siglas en inglés) es la aproximación de Hartree-Fock (HF), pues se basa principalmente en la teoría de la estructura electrónica. El movimiento de cada electrón, que por sí solo es un sistema muy complejo, puede ser descrito por una función de onda de una sola partícula, la cual es definida como *orbital*. Es decir, un *orbital* se define como una función de onda para una sola partícula, un electrón. Entonces, para considerar las funciones de onda de los electrones en una molécula es conveniente usar orbitales moleculares que se fundamentan en la estructura electrónica molecular del sistema [39].

Un orbital espacial $\Psi_i(\mathbf{r})$ es una función que depende del vector de posición $\mathbf{r}$ y describe la distribución espacial de un electrón, tal que $|\Psi_i(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r}$ es la probabilidad de encontrar el electrón en un elemento de volumen $d\mathbf{r}$. Adicionalmente, es necesario describir de un electrón su espín, el cual consiste de dos funciones orto-normales $\alpha(\sigma)$ y $\beta(\sigma)$ que representan espín hacia arriba ($\uparrow$) y espín hacia abajo ($\downarrow$), respectivamente. De forma que una función de onda para un electrón que describe su distribución espacial y su espín es un *orbital espín*, $\chi(\mathbf{x})$, donde $\mathbf{x} = \{\mathbf{r}, \sigma\}$ es la coordenada espacio-espín [40, 41], entonces los orbitales espín se pueden expresar como

$$\chi(\mathbf{x}) = \begin{cases} \Psi(\mathbf{r})\alpha(\sigma), \\ \Psi(\mathbf{r})\beta(\sigma) \end{cases}. \quad (2.9)$$

Para una colección de electrones se deben tomar en cuenta funciones de onda para N electrones. Sin embargo, antes de considerar la forma exacta de la función de onda para el sistema que interactúa completamente, se estudia primero un sistema más simple de un sistema que no interacciona, cuya función de onda es un simple producto de orbitales de espín (llamado producto de Hartree) para cada electrón de la forma

$$\Psi_{HP}(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \chi_1(\mathbf{x}_1)\chi_2(\mathbf{x}_2) \cdots \chi_N(\mathbf{x}_N). \quad (2.10)$$

Sin embargo, este producto aún no satisface el principio de anti-simetría. Pues, al considerar dos electrones en la ecuación (2.10) e intercambiar las coordenadas, se obtiene

$$\Psi_{HP}(\mathbf{x}_2, \mathbf{x}_1) = \chi_1(\mathbf{x}_2)\chi_2(\mathbf{x}_1), \quad (2.11)$$

en su lugar se debería obtener el negativo de la función de onda, ecuación (2.10). Para ello, la única manera es que

$$\chi_1(\mathbf{x}_2)\chi_2(\mathbf{x}_1) = -\chi_1(\mathbf{x}_1)\chi_2(\mathbf{x}_2), \quad (2.12)$$

y esto generalmente no es cierto.

Para satisfacer completamente el principio de anti-simetría, es posible construir una función de onda como una combinación lineal apropiada de los productos de Hartree, considerando las permutaciones entre coordenadas de espín, así

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) = \frac{1}{\sqrt{2}}[\chi_1(\mathbf{x}_1)\chi_2(\mathbf{x}_2) - \chi_1(\mathbf{x}_2)\chi_2(\mathbf{x}_1)], \quad (2.13)$$

siendo $1/\sqrt{2}$ una constante de normalización. A continuación, si se multiplica la función de onda $\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2)$ por un operador de *intercambio* ($\hat{\mathbf{P}}_{12}$) que intercambie los electrones 1 y 2, se obtiene

$$\begin{aligned} \hat{\mathbf{P}}_{12}\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2) &= \frac{1}{\sqrt{2}}(\chi_1(\mathbf{x}_2)\chi_2(\mathbf{x}_1) - \chi_1(\mathbf{x}_1)\chi_2(\mathbf{x}_2)) \\ &= -\Psi(\mathbf{x}_2, \mathbf{x}_1). \end{aligned} \quad (2.14)$$

De manera que al intentar poner dos electrones en el mismo orbital, es decir $\chi_1 = \chi_2$, la función de onda $\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2)$ se hace cero, por lo tanto se cumple el principio de exclusión de Pauli, como consecuencia del principio de anti-simetría [39].

Ahora, para sistemas de N electrones la solución de la ecuación (2.13) se puede generalizar definiendo de forma explícita la función de onda a través de un determinante de orbitales de espín llamado determinante de Slater [42], y está dado de la siguiente forma:

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \chi_1(\mathbf{x}_1) & \chi_2(\mathbf{x}_1) & \cdots & \chi_N(\mathbf{x}_1) \\ \chi_1(\mathbf{x}_2) & \chi_2(\mathbf{x}_2) & \cdots & \chi_N(\mathbf{x}_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_1(\mathbf{x}_N) & \chi_2(\mathbf{x}_N) & \cdots & \chi_N(\mathbf{x}_N) \end{vmatrix} \quad (2.15)$$

donde $1/\sqrt{N!}$ es el factor de normalización. Este determinante contiene N electrones en las coordenadas $\mathbf{x}_N$ ocupando los orbitales N de espín χ_N . Nótese que las filas etiquetan los electrones en el orden que sigue: $\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N$, y las columnas etiquetan los orbitales de espín $\chi_1, \chi_2, \dots, \chi_N$. Por lo tanto, el intercambio de dos electrones equivale a intercambiar dos filas del determinante, lo cual genera inmediatamente un cambio de signo por las propiedades matriciales, y consecuentemente se cumple el principio de anti-simetría.

Una vez definida la forma funcional de la función de onda, a través del determinante de Slater (ecuación (2.15)), el cual se construye a partir de la configuración electrónica que se desea estudiar en átomos o moléculas; se puede encontrar a partir del principio variacional, el valor esperado de la energía, como sigue

$$E_{elec} = \langle \hat{H}_{elec} \rangle = \frac{\langle \Psi_0 | \hat{H}_{elec} | \Psi_0 \rangle}{\langle \Psi_0 | \Psi_0 \rangle}, \quad (2.16)$$

donde la forma de la función de onda (2.15), ha sido expresada en la notación de Dirac como

$$\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N) = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_N\rangle = |\Psi_0\rangle. \quad (2.17)$$

Sustituyendo el determinante de Slater en el valor esperado de la energía, se obtienen 3 términos:

$$E_{elec} = \sum_{i=1}^N h_{ii} + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^N (\mathcal{J}_{ij} - \mathcal{K}_{ij}). \quad (2.18)$$

El primer término está relacionado con la energía cinética; y con la interacción de los núcleos con cada uno de los electrones del sistema, como se muestra:

$$h_{ii} = \int d\mathbf{x}_1 \chi_i^*(\mathbf{x}_1) \left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v(\mathbf{r}) \right] \chi_i(\mathbf{x}_1). \quad (2.19)$$

El segundo término está relacionado con la interacción Coulombiana de un electrón en el orbital de espín χ_i y considera la distribución de carga promedio de los demás electrones. El término se define como integral Coulombiana, así:

$$\mathcal{J}_{ij} = \int \int d\mathbf{x}_1 d\mathbf{x}_2 \chi_i^*(\mathbf{x}_1) \chi_i(\mathbf{x}_1) \frac{1}{r_{12}} \chi_j^*(\mathbf{x}_2) \chi_j(\mathbf{x}_2). \quad (2.20)$$

Por último, el tercer término está relacionado con la anti-simetría de la función de onda, que considera el intercambio de los orbitales de espín χ_i y χ_j , por tal razón se denomina como integral de *intercambio* y se expresa como:

$$\mathcal{K}_{ij} = \int \int d\mathbf{x}_1 d\mathbf{x}_2 \chi_i^*(\mathbf{x}_1) \chi_j(\mathbf{x}_1) \frac{1}{r_{12}} \chi_j^*(\mathbf{x}_2) \chi_i(\mathbf{x}_2). \quad (2.21)$$

Particularmente, el método variacional aplicado en la teoría de HF permite minimizar la energía respecto a los orbitales de espín. Tales orbitales que minimizan la energía son llamados los “mejores” orbitales y se pueden encontrar usando el cálculo variacional, a través de multiplicadores de Lagrange para garantizar que los orbitales de espín sean orto-normales [39]. Entonces, usando el funcional $\mathcal{L}$ dado por

$$\mathcal{L}[\{\chi_i\}] = E_{HF}[\{\chi_i\}] - \sum_{ij} \epsilon_{ij} (\langle \chi_i | \chi_j \rangle - \delta_{ij}), \quad (2.22)$$

donde ϵ_{ij} es el multiplicador de Lagrange y $\langle \chi_i | \chi_j \rangle$ es el solapamiento entre orbitales de espín definido por

$$\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \int \chi_i^*(\mathbf{x}) \chi_j(\mathbf{x}) d\mathbf{x}. \quad (2.23)$$

Asumiendo por conveniencia que la primera variación es $d\mathcal{L} = 0$, se obtienen las ecuaciones de HF que definen cada uno de los orbitales de espín

$$\hat{f} \chi_i = \epsilon_i \chi_i, \quad (2.24)$$

siendo ϵ_i el valor propio de energía asociado al orbital χ_i y $\hat{f}$ el operador de Fock de cada orbital, dado por

$$\hat{f}(1) = -\frac{1}{2}\nabla_1^2 + v(\mathbf{r}_1) + \sum_{\mathbf{b}} (\mathcal{J}_{\mathbf{b}}(\mathbf{1}) - \mathcal{K}_{\mathbf{b}}(\mathbf{1})). \quad (2.25)$$

Para resolver las ecuaciones de HF numéricamente, es necesario dar una *propuesta* inicial para los orbitales y llevar a cabo un proceso iterativo, a este procedimiento se le conoce como el método de campo autoconsistente (SCF por sus siglas en inglés).

Ahora bien, la forma de representar los orbitales de espín es a través de un conjunto de bases $(b_\mu)_{\mu=1}^k$ que transforman las ecuaciones de HF en las ecuaciones Roothaan [43], donde las funciones base de los orbitales atómicos se definen como

$$\chi_i = \sum_{\mu=1}^k C_{\mu i} b_\mu, \quad (2.26)$$

esta aproximación se conoce como combinación lineal de orbitales atómicos (LCAO por sus siglas en inglés), que al reemplazar en (2.24) se obtiene

$$f(\mathbf{x}_1) \sum_{\nu=1}^k C_{\nu i} b_\nu(\mathbf{x}_1) = \epsilon_i \sum_{\nu=1}^k C_{\nu i} b_\nu(\mathbf{x}_1). \quad (2.27)$$

Multiplicando la ecuación anterior por el complejo conjugado $b_\mu^*(\mathbf{x}_1)$ e integrando, se obtiene una ecuación matricial

$$\sum_{\nu} C_{\nu i} \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) f(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1) = \epsilon_i \sum_{\nu} C_{\nu i} \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1), \quad (2.28)$$

donde se identifican dos elementos de matriz

$$S_{\mu\nu} = \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1), \quad (2.29)$$

$$F_{\mu\nu} = \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) f(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1). \quad (2.30)$$

Generalmente $S_{\mu\nu}$ es conocida como la matriz de solapamiento que puede calcularse explícitamente a través de las integrales. $F_{\mu\nu}$ es llamada como la matriz de *Fock*. Por lo tanto, las ecuaciones de Hartree-Fock-Roothaan se pueden escribir de la forma [39]

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} C_{\nu i} = \epsilon_i \sum_{\nu} S_{\mu\nu} C_{\nu i}, \quad (2.31)$$

o de forma más compacta como

$$\mathbf{FC} = \mathbf{SC}\epsilon, \quad (2.32)$$

siendo $\mathbf{C}$ una matriz cuadrada de los coeficientes de expansión $C_{\mu i}$ de tamaño $k \times k$

$$\mathbf{C} = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} & \cdots & C_{1k} \\ C_{21} & C_{22} & \cdots & C_{2k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ C_{k1} & C_{k2} & \cdots & C_{kk} \end{pmatrix}, \quad (2.33)$$

y ϵ es la matriz diagonal de las energías orbitales

$$\epsilon = \begin{pmatrix} \epsilon_1 & & & \\ & \epsilon_2 & & 0 \\ & & \ddots & \\ 0 & & & \epsilon_k \end{pmatrix}. \quad (2.34)$$

Las integrales de la matriz de Fock (2.30) pueden ser escritas explícitamente de la forma

$$\begin{aligned} F_{\mu\nu} &= \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) h(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1) + \sum_j^{N/2} \int d\mathbf{x}_1 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) [2\mathcal{J}_j(\mathbf{x}_1) - \mathcal{K}_j(\mathbf{x}_1)] b_\nu(\mathbf{x}_1) \\ &= H_{\mu\nu}^{core} + \sum_j^{N/2} 2(\mu\nu|jj) - (\mu j|j\nu), \end{aligned} \quad (2.35)$$

donde la primera integral se ha definido como la matriz hamiltoniana del *núcleo efectivo*, la cual describe la energía cinética y atracción nuclear de un electrón, dado el operador h_{ii} (2.19), así

$$H_{\mu\nu}^{core} = T_{\mu\nu} + V_{\mu\nu}^{nucl}, \quad (2.36)$$

el segundo término de (2.35) que involucra dos electrones, $F_{\mu\nu}$, puede ser escrito considerando la combinación lineal de los orbitales moleculares como

$$\begin{aligned} F_{\mu\nu} &= H_{\mu\nu}^{core} + \sum_j^{N/2} \sum_{\lambda\sigma} C_{\lambda j} C_{\sigma j}^* [2(\mu\nu|\sigma\lambda) - (\mu\lambda|\sigma\nu)] \\ &= H_{\mu\nu}^{core} + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} [(\mu\nu|\sigma\lambda) - \frac{1}{2}(\mu\lambda|\sigma\nu)] \\ &= H_{\mu\nu}^{core} + G_{\mu\nu}, \end{aligned} \quad (2.37)$$

donde se puede observar que $G_{\mu\nu}$ depende de la matriz densidad P y el conjunto de integrales $(\mu\nu|\lambda\sigma)$ de dos electrones

$$(\mu\nu|\sigma\lambda) = \int d\mathbf{x}_1 d\mathbf{x}_2 b_\mu^*(\mathbf{x}_1) b_\nu(\mathbf{x}_1) r_{12}^{-1} b_\lambda^*(\mathbf{x}_2) b_\sigma(\mathbf{x}_2). \quad (2.38)$$

2.2.2. Interacción de Configuraciones

La interacción de configuraciones (CI por sus siglas en inglés), en principio permite obtener una solución al problema de muchos electrones. Las funciones de onda, al igual que en la aproximación de HF, se definen por orbitales construidos por determinantes de Slater. La diferencia principal con HF es que para considerar la correlación de electrones, CI emplea una función de onda definida por una combinación lineal de los N orbitales de espín de menor energía $|\Psi_0\rangle$, el conjunto de posibles determinantes que incluyen $|\Psi_0\rangle$, como los determinantes de excitación simple $|\Psi_a^r\rangle$, que se diferencian de $|\Psi_0\rangle$ por que el orbital de espín χ_a se reemplaza por χ_r . De forma análoga, los determinantes de excitaciones dobles $|\Psi_{ab}^{rs}\rangle$, y así sucesivamente. Estas funciones de onda son usadas para expandir la función de onda exacta de muchos electrones $|\Phi_0\rangle$, de la forma

$$|\Phi_0\rangle = c_0|\Psi_0\rangle + \sum_{ar} c_r^a |\Psi_a^r\rangle + \sum_{\substack{a<b \\ r<s}} c_{ab}^{rs} |\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \sum_{\substack{a<b<c \\ r<s<t}} c_{abc}^{rst} |\Psi_{abc}^{rst}\rangle + \dots, \quad (2.39)$$

las restricciones en los índices de cada suma garantizan que un determinante excitado sea incluido una sola vez [39]. Desafortunadamente para CI, el conjunto completo de orbitales de espín para ser exacto sería infinito, así que es necesario aproximar el método truncando el conjunto de funciones base. De esta forma surgen los métodos de excitaciones simples (CIS por sus siglas en inglés), seguido por complejidad los que consideran excitaciones simples y dobles (CISD por sus siglas en inglés), y así sucesivamente excitaciones superiores CISDT, CISDTQ y full CI, que considera todas las excitaciones posibles.

Head-Gordon, Pople y otros investigadores han empleado la interacción de configuraciones como punto de partida para el estudio de estados electrónicos excitados.

2.2.3. Métodos semi-empíricos

Los métodos semi-empíricos pueden ser considerados como una simplificación de los métodos ab initio, en los que se considera la teoría de orbitales moleculares, a través del cálculo de una función de onda, el cual implica la evaluación de una serie de integrales después de un procedimiento algebraico autoconsistente SCF. Los métodos semi-empíricos son generalmente aplicados a sistemas considerablemente grandes y son aún más aproximados y menos exigentes que los ab initio, pues combinan la teoría física con valores experimentales, de forma que evitan la evaluación de muchas integrales complejas y usa datos experimentales para aproximar tales integrales.

Pople et al. [44] señala las condiciones generales que debe satisfacer un tratamiento aproximado de los orbitales moleculares, para proporcionar un análisis cualitativo apropiado de las estructuras electrónicas de moléculas grandes. Estas condiciones son:

1. Los métodos deben ser tan simples como para considerar moléculas significativamente grandes sin un esfuerzo computacional excesivo. Pues, es poco probable en un futuro cercano disponer de funciones de onda comparables para moléculas grandes. Por lo tanto, en este caso la teoría mecánico-cuántica aplicada debe ser aproximada.

2. Las aproximaciones introducidas al método no deben ser tan drásticas como para eliminar alguna de las fuerzas físicas principales que determinan la estructura. Por ejemplo, las estabilidades relativas de los electrones en los diferentes niveles de energía atómica, la capacidad de enlace de los orbitales atómicos y la repulsión electrostática entre los electrones. Pues estas características tienen importantes consecuencias químicas y todas ellas deben ser retenidas en un tratamiento realista.

3. Las funciones de onda aproximadas deben formularse de manera imparcial, sin incorporar implícitamente ideas preconcebidas derivadas de discusiones cualitativas convencionales. Por ejemplo, en un estudio teórico fundamental de la localización de un orbital de enlace de dos electrones debería basarse en una teoría mecánico-cuántica que no haga referencia a los enlaces a los enlaces de pares de electrones en su justificación. Pues, las teorías de orbitales moleculares satisfacen este tipo de condición en la medida en que cada electrón sea tratado como si fuera libre de moverse en cualquier lugar del marco molecular.

4. La teoría debe desarrollarse de forma que los resultados puedan ser interpretados en detalle y utilizarse para apoyar o descartar hipótesis cualitativas. Por ejemplo, es útil si la distribución de la carga electrónica calculada a partir de una función de onda, puede dividirse fácilmente en contribuciones de átomos individuales, que pueden compararse con las discusiones cualitativas. Por regla general, los tratamientos mecánicos cuánticos aproximados son más fáciles de interpretar de esta manera, que las complejas y precisas funciones de onda, en los casos en que estas últimas están disponibles.

5. Por último, la teoría debe ser lo suficientemente general como para tener en cuenta todos los electrones químicamente efectivos. Normalmente, esto significa todos los electrones de la capa de valencia.

Al considerar sólo los electrones de valencia, los elementos del núcleo se convierten en un núcleo atómico más sus electrones de núcleo. Es decir, que se tiene una nube de electrones de valencia, en vez de una nube de todos los electrones moviéndose en un marco de núcleos. La energía total SCF para el método semi-empírico (SE) se calcula de forma análoga a la de un cálculo ab initio de la energía Hartree-Fock y se puede expresar como

$$E_{SE}^{total} = E_{SE} + V_{CC} = \sum_{i=1}^N \epsilon_i + \frac{1}{2} \sum_{r=1}^M \sum_{s=1}^M P_{rs} H_{rs}^{core} + V_{CC}. \quad (2.40)$$

Aquí, N será ahora la mitad del número de electrones de valencia, es decir que N es el número de orbitales moleculares formados por los electrones que se incluyen en el conjunto de bases. E_{SE} es la energía electrónica de valencia y V_{CC} es la repulsión core-core en lugar de la repulsión núcleo-núcleo.

Al considerar los electrones del core como parte de los núcleos atómicos, significa que se necesitan funciones base solo para los electrones de valencia, las cuales serán menores. Por ejemplo, un cálculo ab initio para el etileno C_2H_4 , necesita cinco funciones base para cada carbono y una función base (1s) para cada hidrógeno, un total de 14 funciones base, mientras que con un cálculo SE se necesita cuatro funciones para cada carbono y una para cada hidrógeno, un total de 12 funciones base. La ventaja del conjunto de bases SE es que es pequeña comparada con los cálculos ab initio de conjunto de bases mínimas.

Para los métodos SE, las funciones base ϕ corresponden a los orbitales atómicos. Además, en vez de aproximar las funciones de Slater como funciones gaussianas, como en cálculos ab initio, se utilizan las funciones de Slater. Sin embargo, mientras que para los cálculos SE estas integrales son parametrizadas. La forma matemática completa de las funciones base es necesaria para calcular las integrales de solapamiento $\langle \phi_r | \phi_s \rangle$, las cuales se usan para calcular las integrales del core y las integrales de repulsión de electrones. Estas funciones base se construyen de forma análoga al método ab initio, en el que se usan combinaciones lineales de las funciones base para construir los orbitales moleculares, que a su vez se multiplican por funciones de espín.

Las integrales del core y las integrales de repulsión de dos electrones, no son calculadas con primeros principios, lo cual implicaría un Hamiltoniano explícito y funciones (ver (2.35)), sino que la mayoría de estas integrales se toman como cero, y las demás se evalúan de forma empírica a partir de los tipos de átomos implicados y sus distancias.

Las integrales que se hacen cero se desestiman a partir del diferencial de la integral de solapamiento dS

$$\begin{aligned} S &= \int \phi_r(\mathbf{r}_1) \phi_s(\mathbf{r}_1) dv_1 \\ dS &= \phi_r(\mathbf{r}_1) \phi_s(\mathbf{r}_1) dv_1 \end{aligned} \tag{2.41}$$

Los métodos SE de tipo SCF toman la matriz de solapamiento como una matriz unitaria, $S = 1$, de tal forma que no es necesario diagonalizar la matriz de Fock, ecuación (2.32), para obtener los coeficientes de los orbitales moleculares y los niveles de energía [45].

Existen diferentes métodos SE de tipo SCF, el primero llamado método de Pariser-ParrPople (PPP) fué propuesto en 1953 [46]. Luego, en 1965 en fue propuesto el método de desestimación completa de solapamiento diferencial (CNDO por sus siglas en inglés) [47], el cual es mejorado con el método de omisión intermedia del solapamiento diferencial (INDO por sus siglas en inglés) [48]. Finalmente, el método de desestimación de la superposición diferencial diatómica (NDDO) es el método mejorado de los anteriores mencionados y tomado como la base de los métodos semi-empíricos actualmente más populares, como el método de Austin 1 (AM1 por sus siglas en inglés) y el método paramétrico (PM3 por sus siglas en inglés) [47, 49, 50].

Los métodos SE que se fundamentan en NDDO, fueron desarrollados principalmente por Dewar [51], quien justifica que los parámetros experimentales están diseñados para reproducir dos aspectos importantes, la geometría y el calor de formación. Este método genera energías electrónicas que se calculan usando la ecuación (2.40), donde la repulsión core-core, es necesaria para optimizar la geometría, y genera una energía semi-empírica total. Esta energía, la energía interna total de la molécula, excepto la energía vibracional de punto cero, se utiliza para calcular el calor de formación (entalpía de formación) de la molécula [52].

Las generalidades de los métodos PM3 y PM6 son descritas en el apéndice A.

2.3. Métodos basados en DFT

Análogo a la teoría de Hartree-Fock, existe la teoría del funcional de la densidad (DFT) que se ha convertido en el método preferido para algunos investigadores, en los últimos 50 años, para la solución de sistemas de estado sólido y/o moléculas que implican un conjunto de electrones puntuales, que interaccionan y se mueven cuánticamente en el campo de potencial generado por un conjunto de núcleos atómicos fijos, según la aproximación de Born-Oppenheimer. El método DFT tiene dos ventajas importantes; la primera es, en principio, su exactitud y la segunda es la sencillez de sus cálculos computacionales comparados con el método de Hartree [53].

La densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ de un sistema molecular es el número determinado de electrones por unidad de volumen en un estado dado, esta es la variable fundamental para DFT, en vez de la función de onda $\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)$ para HF. Por supuesto, $\rho(\mathbf{r})$ se define en términos de la función de onda como [54]

$$\rho(\mathbf{r}_1) = N \int \cdots \int |\Psi(\mathbf{x}_1, \mathbf{x}_2, \dots, \mathbf{x}_N)|^2 ds_1 d\mathbf{x}_2 \cdots d\mathbf{x}_N, \quad (2.42)$$

nótese que en la integral no aparece la diferencial en la variable $\mathbf{r}_1$, sólo del espín s_1 .

Algunas de las propiedades representativas de la densidad electrónica $\rho(\mathbf{r})$ son:

- Es una función positiva que depende sólo de las tres variables espaciales, y se desvanece en el infinito

$$\rho(\mathbf{r} \rightarrow \infty) = 0 \quad \int \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N. \quad (2.43)$$

- Es una observable que puede ser medida experimentalmente, por ejemplo con difracción de rayos X.
- En cualquier posición de un átomo, el gradiente de $\rho(\mathbf{r})$ tiene una discontinuidad

$$\lim_{r, A \rightarrow 0} [\nabla_r + 2Z_A] \bar{\rho}(\mathbf{r}) = 0, \quad (2.44)$$

como ya se ha mencionado anteriormente Z_A es la carga nuclear y $\bar{\rho}(\mathbf{r})$ es el promedio estadístico de la densidad electrónica.

- El decaimiento exponencial para grandes distancias de todos los núcleos

$$\rho(\mathbf{r}) \sim \exp[-2\sqrt{2I}|\mathbf{r}|], \quad (2.45)$$

siendo I la energía de ionización [55].

2.3.1. Teoremas de Hohenberg-Kohn

Los primeros en utilizar la densidad electrónica como funcional de la energía fueron Thomas y Fermi en 1927 [56, 57] para estudiar átomos modelados como sistemas con un potencial positivo (núcleos) localizados en un gas de electrones uniforme (homogéneo), proponiendo la famosa funcional de energía cinética de Thomas-Fermi en términos de la densidad local de algún punto. Sin embargo, en 1964 el primer teorema de Hohenberg-Kohn (H-K) [58] demuestra que la densidad de electrones puede utilizarse como función básica para determinar de forma única el operador hamiltoniano y, por tanto las propiedades del sistema.

El primer teorema de H-K afirma que el potencial externo $V_{ext}(\mathbf{r})$ está determinado, dentro de una constante trivial aditiva, por la densidad de electrones $\rho(\mathbf{r})$, que a su vez determina la función de onda del estado fundamental. Para probar esta afirmación, se asume que existen dos potenciales externos $V_{ext}(\mathbf{r})$ y $V'_{ext}(\mathbf{r})$ los cuales difieren en más de una constante, pero cada potencial tiene la misma $\rho(\mathbf{r})$ para su estado fundamental [54]. Los respectivos operadores hamiltonianos son $\hat{H}$ y $\hat{H}'$, y sus respectivas funciones de onda son Ψ y Ψ' . Considerando Ψ' como una función trivial para $\hat{H}$

$$\begin{aligned} E_0 \langle \Psi' | \hat{H} | \Psi' \rangle &= \langle \Psi' | \hat{H}' | \Psi' \rangle + \langle \Psi' | \hat{H} - \hat{H}' | \Psi' \rangle \\ &= E'_0 + \int \rho(\mathbf{r}) [V_{ext}(\mathbf{r}) - V'_{ext}(\mathbf{r})] d\mathbf{r}, \end{aligned} \quad (2.46)$$

equivalentemente, se considera Ψ como una función trivial para $\hat{H}'$

$$\begin{aligned} E'_0 \langle \Psi | \hat{H}' | \Psi \rangle &= \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle + \langle \Psi | \hat{H}' - \hat{H} | \Psi \rangle \\ &= E_0 - \int \rho(\mathbf{r}) [V_{ext}(\mathbf{r}) - V'_{ext}(\mathbf{r})] d\mathbf{r}, \end{aligned} \quad (2.47)$$

E_0 y E'_0 son las energías del estado fundamental para $\hat{H}$ y $\hat{H}'$ respectivamente.

Sumando las ecuaciones (2.46) y (2.47) se obtiene $E_0 + E'_0 < E'_0 + E_0$, lo cual es una contradicción y no hay dos potenciales externos diferentes que tengan una misma $\rho(\mathbf{r})$ en su estado fundamental. Entonces $\rho(\mathbf{r})$ determina el número de electrones N y el potencial externo $V_{ext}(\mathbf{r})$, y con esto todas las propiedades del estado fundamental, tales como la energía cinética $T[\rho(\mathbf{r})]$, la energía potencial $V[\rho(\mathbf{r})]$ y la energía total $E[\rho(\mathbf{r})]$, así

$$E[\rho(\mathbf{r})] = E_{Ne}[\rho(\mathbf{r})] + T[\rho(\mathbf{r})] + E_{ee}[\rho(\mathbf{r})] = \int \rho(\mathbf{r}) V_{ext}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + F_{HK}[\rho(\mathbf{r})], \quad (2.48)$$

considerando que $F_{HK}[\rho(\mathbf{r})]$ es un funcional, ingrediente principal para la teoría del funcional de la densidad y se puede escribir como

$$F_{HK}[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] + E_{ee}[\rho(\mathbf{r})]. \quad (2.49)$$

Una vez conocido este funcional universal, la ecuación de Schrödinger se resuelve de forma exacta. Pero, este funcional depende de los funcionales para la energía cinética $T[\rho(\mathbf{r})]$ y de la interacción electrón-electrón $E_{ee}[\rho(\mathbf{r})]$, los cuales son completamente desconocidos, sólo es posible extraer la repulsión clásica $J[\rho(\mathbf{r})]$ del segundo término

$$E_{ee}[\rho(\mathbf{r})] = \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{no-cla}[\rho(\mathbf{r})] = J[\rho(\mathbf{r})] + E_{no-cla}[\rho(\mathbf{r})], \quad (2.50)$$

la contribución no-clásica $E_{no-cla}[\rho(\mathbf{r})]$ está relacionada con la corrección de la auto-interacción y la *correlación* de Coulomb e *intercambio*. En este sentido, el gran desafío del método DFT es encontrar los funcionales para $T[\rho(\mathbf{r})]$ y $E_{ee}[\rho(\mathbf{r})]$.

Ahora bien, el segundo teorema de H-K afirma que puede proporcionar la energía más baja del sistema si y sólo si la densidad con la que se trabajará es justamente la del estado fundamental [54]. Esto es análogo al principio variacional para las funciones de onda

$$E_0 \leq E[\tilde{\rho}] = T[\tilde{\rho}] + E_{Ne}[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}], \quad (2.51)$$

la densidad prueba $\tilde{\rho}$ debe satisfacer las condiciones de frontera, tal que $\tilde{\rho}(\mathbf{r}) \geq 0$ y $\int \tilde{\rho}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$.

Para demostrar la ecuación (2.51) se parte del principio variacional establecido para funciones de onda. Como se mencionó en el primer teorema, $\tilde{\rho}$ define su propio $\tilde{H}$ y $\tilde{\Psi}$, la cual puede tomarse como función prueba para el hamiltoniano generado a partir del potencial externo V_{ext} . Entonces

$$\langle \tilde{\Psi} | \hat{H} | \tilde{\Psi} \rangle = T[\tilde{\rho}] + E_{ee}[\tilde{\rho}] + \int \tilde{\rho}(\mathbf{r}) V_{ext} d\mathbf{r} = E[\tilde{\rho}] \geq E_0[\rho] = \langle \tilde{\Psi}_0 | \hat{H} | \tilde{\Psi}_0 \rangle. \quad (2.52)$$

En conclusión, a partir de un funcional $F_{HK}[\rho]$ sería posible resolver cualquier sistema de forma exacta, pero aún es un desafío conocer su forma explícita.

2.3.2. Ecuaciones de Kohn-Sham

La teoría funcional de la densidad planteada por Hohenberg y Kohn es una herramienta útil, pero sólo a partir de las ecuaciones de Kohn-Sham, es posible calcular las propiedades del estado fundamental de sistemas Coulombianos de muchas partículas con una alta precisión, que permite comparar con resultados experimentales.

Como se mencionó en la sección anterior, la energía del estado fundamental de un sistema está dado de la forma

$$E_0 = \min_{\rho \rightarrow N} \left(F[\rho] + \int \rho(\mathbf{r}) V_{ext} d\mathbf{r} \right), \quad (2.53)$$

y el funcional universal $F[\rho]$ depende de los funcionales para la energía cinética $T[\rho]$ y para la interacción electrón-electrón $E_{ee}[\rho]$, del último término sólo se conoce la contribución clásica $J[\rho]$. Pues, aunque el Thomas-Fermi en su primer intento de proponer un funcional para la energía cinética, la aproximación no es muy buena. Para resolver este problema Kohn y Sham en 1965 [59], proponen como punto de partida un sistema de referencia de partículas no-interactuantes cuyo hamiltoniano puede expresarse como una suma de operadores de un electrón:

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^N \hat{h}_i, \quad (2.54)$$

donde

$$\hat{h}_i = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i), \quad (2.55)$$

en el que no hay términos de repulsión electrón-electrón y la función de onda de cada electrón se representa por un determinante de Slater, constituido por un conjunto de orbitales de espín que minimizan la energía cumpliendo con [54]

$$\left(\frac{1}{2}\nabla^2 + v_s(\mathbf{r})\right) \Psi_i(\mathbf{r}) = \epsilon_i \Psi_i(\mathbf{r}), \quad (2.56)$$

siendo la densidad de un sistema de N partículas

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i^N |\Psi_i(\mathbf{r})|^2, \quad (2.57)$$

con esto, la representación de la energía cinética válida para la función de onda que describe exactamente los N electrones no interactuantes es

$$T_S = -\frac{1}{2} \sum_i^N \langle \Psi_i | \nabla^2 | \Psi_i \rangle. \quad (2.58)$$

Particularmente para este sistema, existe una función de onda exacta en el estado base dada por

$$\chi_s = \frac{1}{\sqrt{N!}} \det[\Psi_1 \Psi_2 \cdots \Psi_N], \quad (2.59)$$

siendo Ψ_i los N estados propios más bajos de $\hat{h}_i$.

Evidentemente la energía cinética T_S para el sistema de partículas interactuantes, es diferente del sistema interactuante. Es por esto que Kohn y Sham proponen reescribir el funcional de H-K ($F[\rho]$) separado por

$$F[\rho] = T_S[\rho] + J[\rho] + E_{XC}[\rho], \quad (2.60)$$

donde E_{XC} es llamado de forma general la *energía de correlación e intercambio* y es un funcional que se define como [54]

$$E_{XC}[\rho] \equiv (T[\rho] - T_S[\rho]) + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]), \quad (2.61)$$

el cual contiene la diferencia entre $T[\rho]$ y $T_S[\rho]$. Ahora, el *potencial efectivo de Kohn-Sham* está definido por

$$v_{eff}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta J[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})}, \quad (2.62)$$

por lo tanto el *potencial de intercambio y correlación* es

$$v_{XC}(\mathbf{r}) = \frac{\delta E_{XC}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})}. \quad (2.63)$$

Entonces el *potencial de intercambio y correlación* que permita definir $v_{eff}(\mathbf{r})$ debe estar dado de tal forma que la densidad electrónica minimice la energía de Kohn-Sham sea igual a la energía del estado base. Además, los orbitales que minimizan la energía deben satisfacer las ecuaciones

$$\left[-\frac{1}{2}\nabla^2 + v_{eff}(\mathbf{r}) \right] \Psi_i = \epsilon_i \Psi_i, \quad (2.64)$$

cuya forma es la misma a las ecuaciones de HF. De hecho, las teorías de Hartree Fock y Kohn-Sham proporcionan ecuaciones de un electrón que permiten describir sistemas de muchos electrones. Aunque, la teoría de Kohn-Sham es exacta en principio, se distingue de la teoría de HF por la capacidad de incorporar completamente el efecto de *intercambio y correlación* de los electrones. Mientras que la teoría de HF es aproximada por definición, pues los efectos de correlación de los electrones no son tomados en cuenta y considerarlos no es una tarea fácil [54].

2.3.3. Funcionales de Intercambio y Correlación

Con el fin de encontrar una expresión para la energía de *correlación e intercambio*, $E_{XC}[\rho]$, se llevaron a cabo algunas aproximaciones. La base de todas las aproximaciones a los funcionales de *correlación e intercambio* es la aproximación de densidad local (LDA por sus siglas en inglés), la cual se fundamenta en la idea de un gas de electrones uniforme, donde los electrones se mueven sobre una distribución de carga positiva tal que el ensamble total es neutro [54, 60]. Con la LDA se asume que la energía de *correlación e intercambio* se puede escribir como

$$E_{XC} \approx E_{XC}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \epsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r}, \quad (2.65)$$

donde $\epsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))$ es la energía de *correlación e intercambio* por partícula del gas de electrones de densidad $\rho(\mathbf{r})$. $\epsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))$ se puede dividir en la contribución de intercambio y la contribución de correlación

$$\epsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r})) = \epsilon_X(\rho(\mathbf{r})) + \epsilon_C(\rho(\mathbf{r})). \quad (2.66)$$

El potencial correspondiente sera

$$V_{XC}^{LDA}(\rho(\mathbf{r})) = \frac{\partial \epsilon_{XC}[\rho]}{\partial \rho}, \quad (2.67)$$

la contribución de intercambio, $\epsilon_X(\rho(\mathbf{r}))$ a (2.66) fue derivada por Bloch y Dirac [61]

$$\epsilon_X = -\frac{3}{4} \left(\frac{3\rho(\mathbf{r})}{\pi} \right)^{1/3}. \quad (2.68)$$

Sin embargo, no se conoce ninguna forma explícita y exacta para la contribución de correlación, $\epsilon_C(\rho(\mathbf{r}))$. Pues esta energía para un gas de electrones uniforme, ya es por sí mismo un problema de muchos cuerpos. Las primeras aproximaciones para $\epsilon_C(\rho(\mathbf{r}))$ se basaron en la aplicación de la teoría de perturbaciones [62, 63]. Luego, en 1980 las simulaciones de Monte Carlo [64] de un gas de electrones homogéneo proporcionaron una alta precisión. Actualmente, las expresiones para $\epsilon_C(\rho(\mathbf{r}))$ son parametrizaciones de los datos de las simulaciones de Monte Carlo, y se implementan en la mayoría de los paquetes de programas DFT estándar y en aplicaciones típicas, dan resultados casi idénticos.

La aproximación LDA ha demostrado tener resultados exitosos, incluso cuando se aplica a sistemas diferentes del gas de electrones homogéneo. La justificación del éxito de este método se fundamenta en que LDA subestima $\epsilon_C(\rho(\mathbf{r}))$, pero sobreestima $\epsilon_X(\rho(\mathbf{r}))$, lo cual genera resultados inesperadamente buenos para $\epsilon_{XC}(\rho(\mathbf{r}))$. Sin embargo, LDA ha sido muy aplicado en cálculos de estructuras de banda y energías totales de física del estado sólido. En química cuántica es menos popular, ya que no proporciona resultados lo suficientemente precisos para permitir una discusión cuantitativa del enlace químico en las moléculas.

Con el fin de mejorar la LDA, en los años 80's se encontró que la información sobre la densidad ρ en un punto particular $\mathbf{r}$, puede ser complementada con información proporcionada del gradiente de la densidad de carga, $\nabla\rho(\mathbf{r})$, sobre la no homogeneidad de la verdadera densidad de electrones [65]. De manera que la energía de *correlación e intercambio* para la denominada aproximación del gradiente generalizada (GGA por sus siglas en inglés) es

$$E_{XC}^{GGA}[\rho] = \int d\mathbf{r} f(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r})). \quad (2.69)$$

Ahora bien, dependiendo del método de construcción empleado para obtener el funcional $f(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r}))$, se pueden encontrar GGAs muy diferentes. Específicamente, los GGAs empleados en química cuántica provienen de parámetros ajustados a conjuntos de moléculas seleccionadas [66]. Los GGAs más populares y confiables son: el funcional propuesto por Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) en 1996 [67] y el funcional que denota la combinación del funcional de intercambio de Becke y el funcional de correlación de Lee, Yang y Parr (BLYP) en 1988 [68, 69].

El funcional híbrido propuesto por Becke se expresa como

$$E_{XC}^{hyb} = \alpha E_X^{KS} + (1 - \alpha) E_{XC}^{GGA}, \quad (2.70)$$

donde E_X^{KS} es la energía de *intercambio* calculada con la función de onda de KS y E_{XC}^{GGA} es un GGA apropiado y α es un parámetro de ajuste.

Funcional Híbrido B3LYP

Los funcionales híbridos aumentan la *energía de intercambio y correlación* de la DFT con un término calculado a partir de la teoría HF, donde la energía electrónica se puede expresar como

$$E_{elec} = 2 \sum_{i=1}^N H_{ii} + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N (2\mathcal{J}_{ij} - \mathcal{K}_{ij}), \quad (2.71)$$

donde se ha reescrito la ecuación (2.18). De esta ecuación, si se elimina la energía del núcleo efectivo (core), esto implica el término para la energía cinética H_{ii} y el término para la energía potencial coulombiana $\mathcal{J}_{ij}$, dejando la energía de intercambio $\mathcal{K}_{ij}$,

$$E_X = - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \mathcal{K}_{ij}, \quad (2.72)$$

sustituyendo ahora en (2.72) los orbitales de KS de forma similar a los orbitales de HF, se obtiene una expresión para la energía de intercambio HF que se fundamenta en los orbitales KS, de forma que

$$E_x^{HF} = - \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \Psi_i^{KS}(\mathbf{r}_1) \Psi_j^{KS}(\mathbf{r}_2) \left| \frac{1}{r_{ij}} \right| \Psi_i^{KS}(\mathbf{r}_2) \Psi_j^{KS}(\mathbf{r}_1) \rangle. \quad (2.73)$$

Debido a que el determinante de Slater de KS es una representación exacta de la función de onda del sistema de electrones que no interaccionan, E_X^{HF} es la energía de intercambio exacta para este sistema, con una densidad de electrones igual a la del sistema que interacciona. Ahora, incluyendo una expresión DFT corregida por la GGA de la LDA para considerar una contribución ponderada de un funcional de intercambio y correlación HF/DFT, tradicionalmente llamado funcional DFT híbrido, el cual es muy famoso y exitoso en la actualidad. De hecho, el funcional de energía de intercambio más popular es el desarrollado por Becke en 1993 [70], y posteriormente modificado por Stevens et al. en 1994, el cual introduce el funcional de energía de correlación LYP, se llama B3LYP o Becke3LYP, que considera tres parámetros de ajuste para la parte del intercambio y ha demostrado ser uno de los funcionales de intercambio más exitosas para aplicaciones químicas [69–71], y se puede escribir como

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - \alpha_0 - \alpha_x) E_X^{LDA} + \alpha_0 E_X^{HF} + \alpha_x E_X^{GGA} + (1 - \alpha_c) E_C^{LDA} + \alpha_c E_C^{LYP}, \quad (2.74)$$

donde E_X^{LDA} es el funcional de intercambio puro DFT de LDA sin corrección del gradiente, E_X^{HF} es el funcional de energía de intercambio HF basado en orbitales de KS, E_X^{GGA} es el funcional de intercambio Becke 88, E_C^{LDA} es la función Vosko, Wilk, Nusair (VWN) que forma parte del funcional de correlación para el gas de electrones homogéneo del LDA, y E_C^{LYP} es el funcional de correlación LYP. E_X^{GGA} , E_C^{LDA} y E_C^{LYP} tienen correcciones debidas al gradiente GGA. Los tres parámetros α_0 , α_x y α_c ajustan la energía calculada a las energías de atomización molecular [72]. La descripción de las funciones base usadas en este trabajo se muestra en el apéndice B.

2.3.4. Teoría del Funcional de la Densidad Dependiente del Tiempo (TD-DFT)

Los métodos presentados hasta aquí se han centrado en el estado base de los electrones no relativistas en potenciales independientes del tiempo. Ahora se mostrará de forma general una extensión de la DFT, la cual considera potenciales dependientes del tiempo y permite estudiar las excitaciones.

En la TD-DFT se demuestra a través del teorema de Runge-Gross [73] que existe una correlación uno a uno entre las densidades dependientes del tiempo $\rho(\mathbf{r}, t)$ y los potenciales de un cuerpo dependientes del tiempo $V_{ext}(\mathbf{r}, t)$ para un estado inicial dado. En el teorema de Runge-Gross se define un sistema ficticio de electrones que no interactúan y se mueven en un potencial de Kohn-Sham, cuya densidad es la del sistema real (electrones que interactúan) [74]. Para este caso, las ecuaciones de Kohn-Sham se pueden expresar como

$$i\dot{\Phi}_j(\mathbf{r}, t) = \left(-\frac{\nabla^2}{2} + V_{KS}[\rho](\mathbf{r}, t) \right) \Phi_j(\mathbf{r}, t), \quad (2.75)$$

siendo la densidad

$$\rho(x) = \sum_{j=1}^N |\Phi_j(x)|^2, \quad (2.76)$$

que como se observa es la del sistema real. El potencial KS se define como

$$V_{KS}(\mathbf{r}, t) = V_{ext}(\mathbf{r}, t) + V_H(\mathbf{r}, t) + V_{XC}(\mathbf{r}, t), \quad (2.77)$$

donde $V_H(\mathbf{r}, t)$ es el potencial de Hartree ($\int d\mathbf{r}' \rho(\mathbf{r}')/r_{12}$) pero dependiente del tiempo, igualmente para el potencial externo $V_{ext}(\mathbf{r}, t)$. $V_{XC}(\mathbf{r}, t)$ es el potencial de correlación e intercambio definido por un funcional $\delta A_{XC}[\rho]/\delta \rho(\mathbf{r}, t)$ que esta directamente relacionado con la evolución temporal de la densidad, de la función de onda inicial del sistema que interactúa, $\Psi(0)$, y de la función de onda inicial de KS, $\Phi(0)$. La función de correlación e intercambio dependiente del tiempo es análoga al caso estático $E_{XC}[\rho]$

$$A_{XC}[\rho] = \int dt E_{XC}[\rho]|_{\rho=\rho(\mathbf{r}, t)}. \quad (2.78)$$

En general, los cálculos TD-DFT usan la aproximación adiabática para V_{XC} por lo tanto

$$V_{XC}[\rho; \Psi(0), \Phi(0)](\mathbf{r}t) = V_{XC}^{adia}[\rho(t)](\mathbf{r}). \quad (2.79)$$

Esto aproxima el funcional de forma local en el tiempo. Esta aproximación es válida cuando el externo cambia muy lentamente en el tiempo, por tanto el sistema se encuentra localmente cerca del equilibrio. En este sentido, se puede aplicar la aproximación de densidad local adiabática (ALDA por sus siglas en inglés)

$$V_{XC}^{ALDA}(\mathbf{r}, t) = V_{XC}^{HEG}(\rho)|_{n=n(\mathbf{r}, t)}. \quad (2.80)$$

La ALDA asume que el potencial de correlación e intercambio en el punto $\mathbf{r}$ y en el tiempo t es igual al potencial de correlación e intercambio de un gas de electrones homogéneo estático (HEG por sus siglas en inglés) de densidad $\rho(\mathbf{r}, t)$.

Aunque la TD-DFT fue un método construido para sistemas con potenciales dependientes del tiempo, también es posible usarlo para calcular estados excitados y sus propiedades estáticas de átomos, moléculas, tales como frecuencias de transición y fuerza de oscilador [74]. Análogo al método CI, sólo que CI utiliza orbitales de la solución HF (basado en la función de onda) para generar todos los estados excitados, mientras que TD-DFT utiliza la solución a las ecuaciones de Kohn-Sham (basadas en la densidad).

2.4. Orbitales Moleculares

Como ya se ha mencionado anteriormente existen diferentes métodos que permiten predecir, a través de algunas aproximaciones, el comportamiento físico-químico de sistemas moleculares, considerados como sistemas de muchos cuerpos. Cada método es aplicado convenientemente según el tamaño y la configuración del sistema que se pretenda estudiar, una de las propiedades principales obtenidas de los cálculos mecánico cuánticos son los orbitales moleculares MO's, los cuales describen el estado electrónico del sistema, proporcionando su configuración electrónica y las energías de llenado de los orbitales.

Uno de los orbitales moleculares más representativos de cada sistema es el orbital molecular ocupado más alto (HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital), ya que es el último orbital ocupado por un par de electrones y, por tanto son los primeros que pierde la molécula. Asimismo, el orbital molecular desocupado más bajo (LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital) es igual de importante, pues es el orbital de menor energía y además vacío, así es el primer orbital al que puede saltar un par de electrones.

2.4.1. Espectroscopía UV-Vis

La TD-DFT se ha convertido en una herramienta muy útil para tratar estados de excitación electrónica, los cuales se fundamentan en la interacción entre luz y materia, así la DFT se extiende al tener en cuenta la dependencia del tiempo (TD) de las ondas electromagnéticas, lo cual permite el estudio de las propiedades ópticas de sistemas moleculares, pues proporciona espectros de absorción e información de su respectiva emisión.

Para los estados excitados la aproximación local en el tiempo parece funcionar correctamente. Entonces, para un sistema inicialmente en reposo, se considera una perturbación introducida por el Hamiltoniano de Kohn-Sham y se aplica un campo $\delta v(t)$

$$\delta v_{eff}(\mathbf{r}, t) = \delta v(t) + \delta v_{SCF}(\mathbf{r}, t), \quad (2.81)$$

donde $\delta v_{SCF}(\mathbf{r}, t)$ es la respuesta lineal del campo autoconsistente que surge de la densidad de carga dado por

$$\delta \rho(\mathbf{r}, \omega) = \sum_{ai} \delta P_{ai}(\omega) \Psi_a(\mathbf{r}) \Psi_i^*(\mathbf{r}) + \sum_{ia} \delta P_{ia}(\omega) \Psi_i(\mathbf{r}) \Psi_a^*(\mathbf{r}), \quad (2.82)$$

aquí, δP_{st} es la respuesta lineal de la matriz de densidad KS/HF en la base de los orbitales moleculares no perturbados. δP se divide por conveniencia en dos partes, para el hueco y la partícula (δP_{ai}), las cuales se relacionan con el complejo conjugado. La etiqueta para los MO ocupados es i, j , para los virtuales es a, b y para orbitales en general s, t, u, v . La respuesta lineal de la matriz densidad KS/HF al campo aplicado son el resultado elemental de la teoría de perturbación dependiente del tiempo y se puede escribir como

$$\delta P_{st} = \frac{\Delta n_{st}}{(\epsilon_s - \epsilon_t) - \omega} \delta v_{st}^{eff}(\omega), \quad (2.83)$$

siendo Δn_{st} es la diferencia de los números de ocupación, para $st = ai$ esta diferencia es 1 y para $st = ia$ esta diferencia es -1 . El potencial δv_{SCF} depende de la respuesta de la matriz densidad

$$\begin{aligned} \delta v_{st}^{SCF} &= \sum_{uv} K_{st,uv}(\omega) \delta P_{uv}(\omega) \\ &= \sum_{bj} K_{st,bj}(\omega) \delta P_{bj}(\omega) + \sum_{jb} K_{st,jb}(\omega) \delta P_{jb}(\omega), \end{aligned} \quad (2.84)$$

$\mathbf{K}$ es la matriz de acoplamiento que se definirá más adelante, por ahora se sustituye las ecuaciones (2.81) y (2.84) en (2.83), obteniendo después de álgebra

$$\left[\begin{pmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{B} \\ \mathbf{B}^* & \mathbf{A}^* \end{pmatrix} - \omega \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} \right] \begin{pmatrix} \delta P \\ \delta P^* \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\delta v \\ -\delta v^* \end{pmatrix}, \quad (2.85)$$

las matrices $\mathbf{A}$ y $\mathbf{B}$ están definidas como

$$A_{ai,bj} = \delta_{ab} \delta_{ij} (\epsilon_a - \epsilon_i) + K_{ai,bj}, \quad (2.86)$$

y

$$B_{ai,bj} = K_{ai,jb}. \quad (2.87)$$

La matriz de acoplamiento se determina utilizando la regla de la cadena y usando las definiciones para $v_{SCF}(\mathbf{r}, t)$, $v_{[\rho]}(\mathbf{r}, t)$ y $\delta\rho(\mathbf{r}, \omega)$

$$\begin{aligned} K_{sr\sigma,uv\tau} &= \frac{\partial v_{st}^{SCF}}{\partial P_{uv}} \\ &= \frac{\partial v_{st}^{coul}}{\partial P_{uv}} + \frac{\partial v_{st}^{XC}}{\partial P_{uv}} \\ &= (\Psi_{s\sigma}^*(\mathbf{r})\Psi_{t\sigma}(\mathbf{r})|\Psi_{v\tau}^*(\mathbf{r}')\Psi_{u\tau}(\mathbf{r}')) + \int d\mathbf{r}d\mathbf{r}' \Psi_{s\sigma}^*(\mathbf{r})\Psi_{t\sigma}(\mathbf{r}) \frac{\delta^2 E_{XC}}{\delta\rho_{\sigma}(\mathbf{r})\delta\rho_{\tau}(\mathbf{r}')} \\ &\quad \times \Psi_{v\tau}^*(\mathbf{r}')\Psi_{u\tau}(\mathbf{r}')). \end{aligned} \quad (2.88)$$

De esta manera, en la aproximación adiabática la matriz de acoplamiento es independiente del tiempo y es real cuando los MO son reales.

De lo anterior, las energías de excitación se determinan como polos de las funciones de respuesta, es decir valores propios igual a cero de (2.85), entonces las energías de excitación se pueden determinar como un problema de valores propios no hermitianos [75].

$$\begin{bmatrix} \mathbf{A} & \mathbf{B} \\ \mathbf{B} & \mathbf{A} \end{bmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{X} \\ \mathbf{Y} \end{pmatrix} = \omega \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & -1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{X} \\ \mathbf{Y} \end{pmatrix} \quad (2.89)$$

2.5. Efectos del disolvente

En un modelo molecular considerar los efectos del disolvente genera un modelo realista de las biomoléculas [76]. Experimentalmente, la solvatación es un proceso en el cual un soluto es disuelto en un disolvente, el soluto es separado en iones o moléculas, las cuales son rodeadas por el disolvente, así aparecen interacciones entre moléculas del soluto y el disolvente.

Uno de los disolventes biológicos más comunes es el agua. Sin embargo, existen de diferentes tipos de disolvente los cuales pueden ser clasificados en polares y no polares. Los disolventes polares se caracterizan por tener carga parcial, el agua es un disolvente polar y su carga parcial se distribuye en positiva para cada hidrógeno H, y negativa para el oxígeno O. De forma que entre un disolvente polar y un soluto polar se propicia con mayor porcentaje las interacciones de Coulomb. Mientras tanto, un disolvente no polar se caracteriza por ser eléctricamente neutro, por lo tanto disuelve mejor solutos no polares.

Teóricamente, el solvente puede ser estudiado usando modelos discretos, continuos o una combinación de ellos.

2.5.1. Modelo explícito

Tradicionalmente el modelo discreto o explícito de solvatación se obtiene introduciendo un número considerable de moléculas de disolvente alrededor del soluto. Este modelo se considera el más realista para la solvatación, pues las interacciones entre moléculas de soluto y disolvente se hacen explícitas. Sin embargo, este modelo tiene un costo computacional elevado, de hecho en algunos casos cuando los sistemas moleculares son grandes, resulta imposible obtener algún cálculo.

2.5.2. Modelo Implícito

Una alternativa al modelo explícito es el modelo implícito, que consiste en sustituir el entorno real del disolvente, formado por moléculas discretas, por un medio continuo infinito con las propiedades dieléctricas del disolvente, esto garantiza un costo computacional más bajo. Sin embargo, algunas propiedades como los enlaces de hidrógeno soluto-disolvente relacionados con las interacciones moleculares ya no pueden ser consideradas para este modelo, en su lugar aparece a nivel de campo medio la contribución de la energía de solvatación global. Por lo tanto, la energía total de una molécula disuelta se puede escribir convenientemente como

$$E_{tot} = E_{vac} + \Delta G_{solv}, \quad (2.90)$$

donde E_{vac} es la energía potencial de la molécula en el vacío o en fase gaseosa y ΔG_{solv} es la energía libre de solvatación, la cual se puede estimar como

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{el} + \Delta G_{no-polar}, \quad (2.91)$$

siendo $\Delta G_{no-polar}$ la energía libre de disolución de una molécula de la que se han eliminado todas las cargas (significa que las cargas parciales de cada átomo se suponen como 0), ΔG_{el} es la energía libre de eliminar primero todas las cargas en el vacío y luego añadirlas en presencia de un disolvente continuo [76].

Uno de los métodos implícitos más usados y que eventualmente se usará para el desarrollo de este trabajo es el modelo continuo polarizable (PCM por sus siglas en inglés) propuesto por Tomasi et al. en 1999, consiste en la integración numérica de la densidad de carga del soluto. Para este método la energía libre molecular en solución es [77]

$$\Delta G_{solv} = \Delta G_{es} + \Delta G_{dr} + \Delta G_{cav}, \quad (2.92)$$

donde ΔG_{es} es la contribución electrostática a la energía libre en solución, ΔG_{dr} es la contribución electrostática y de dispersión-repulsión a la energía libre, y ΔG_{cav} es la energía de la cavidad. Los tres términos son calculados utilizando una cavidad definida mediante esferas de van der Waals centradas en las posiciones de los átomos. El campo de reacción se representa a través de cargas puntuales ubicadas en la superficie de la cavidad molecular [77].

2.6. Principios de la espectroscopía

El fundamento de la espectroscopía determinará la respuesta espectral de la interacción de la luz con la materia. El espectro es un gráfico de la intensidad de esta interacción (absorción, emisión y excitación) como función de la longitud de onda (λ) o frecuencia (ν) de la luz incidente o emitida. Los espectros son medidos por un dispositivo llamado espectrómetro, el cual permite seleccionar con suficiente precisión la longitud de onda de luz incidente y emitida/transmitida, al mismo tiempo que mide la intensidad de la respuesta del material analizado, en el caso de este trabajo una solución [78].

Los principales componentes de un espectrómetro son:

- **Fuente de luz**, la cual proporciona luz policromática al monocromador que difracta la luz. Generalmente, la fuente de luz depende del tipo de técnica espectrofotométrica. En el caso de radiación UV, frecuentemente son usadas lámparas de hidrógeno o deuterio. Para radiación visible, las lámparas más comunes son de filamento de tungsteno y arco de carbono. Finalmente, para radiación IR se usan generalmente lámparas de Nernst y el arco de carbono. Una lámpara de Xenón es muy versátil y puede ser empleada en los tres casos.
- **Monocromador**, su función es dividir la luz policromática en longitudes de onda individuales. En espectrómetros antiguos el medio preferido para dividir la luz eran prismas, actualmente se utilizan redes de difracción de diferente número de líneas por nm.
- **Portamuestras o cubeta**, para soluciones es una cubeta normalmente de cuarzo para aprovechar su amplio rango de transparencia UV-Vis-NIR, su función es contener la muestra permitiendo que la longitud de onda seleccionada pase a través de ella.
- **Detector fotosensible**, su función es detectar el bajo nivel de energía radiante, por lo que debe ser altamente sensible y estable a largo plazo. Actualmente muchos espectrómetros utilizan CCD como detectores. Sin embargo, el uso de fotomultiplicadores sigue vigente, como en este caso, especialmente en sistemas complementados con medidas de vida media de emisión.
- **Dispositivo de lectura**, su función es convertir la señal recibida del detector en información digital. El equipo utilizado, integra las señales analógicas del control de monocromadores y de respuesta del fotomultiplicador, a un sincronizador de señales conocido como lock-in. De ahí pasa a una tarjeta digitalizadora y finalmente a la PC.

La Fig. 2.2 representa de forma general el funcionamiento del espectrofotómetro.

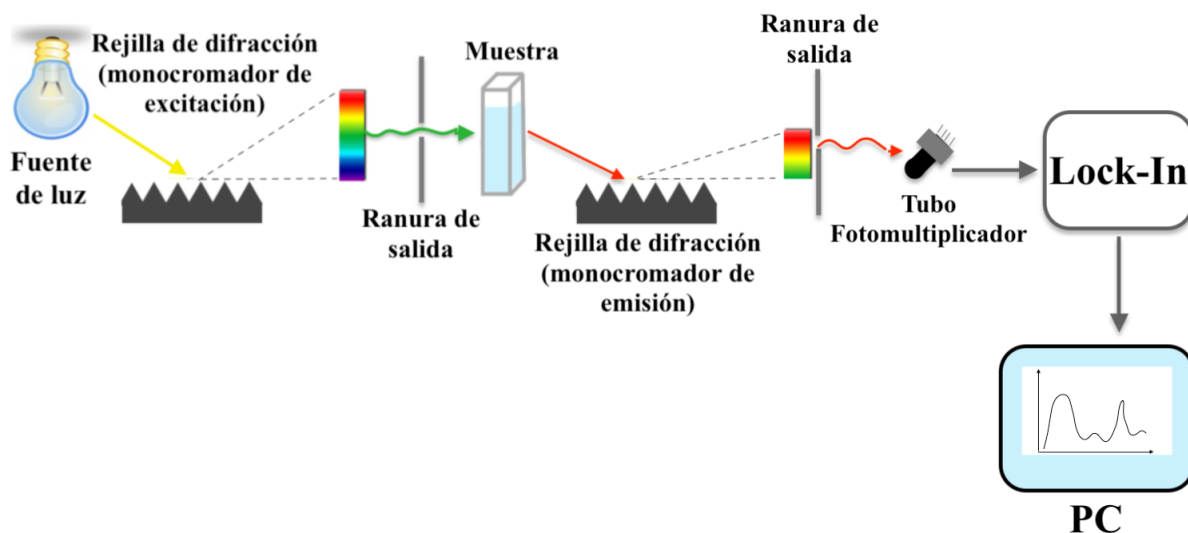


Figura 2.2: Esquema representativo del espectrofotómetro de un solo haz.

2.7. Fluorescencia

Las mediciones de la espectroscopía de fluorescencia permite conocer ampliamente procesos moleculares tales como interacciones entre disolventes y fluoróforos, las distancias entre sitios de las biomoléculas, los cambios conformacionales y las interacciones de enlace.

El fenómeno de luminiscencia se puede definir brevemente como la emisión de luz por la materia, con previa excitación por diferentes formas de energía. Por supuesto, existen diferentes caminos para causar este fenómeno, uno de ellos es la fotoluminiscencia, que significa que la fuente de energía es la luz. A su vez, tomando en cuenta la naturaleza del proceso de desexcitación se puede distinguir la fluorescencia y fosforescencia que se comparan más adelante. Cuando un electrón en el estado fundamental es excitado por la absorción de un fotón de energía suficiente, el electrón se localizará en un estado excitado electrónicamente, la relajación desde ese estado puede darse por dos vías, por relajación fonónica (no radiativa) o fotónica (radiativa), dependiendo de la separación entre diferentes niveles de energía disponibles. Es común encontrar una combinación de ambos procesos en la gran mayoría de materiales fotoluminiscentes.

Dos fenómenos pueden ocurrir en el proceso de emisión, la fluorescencia o la fosforescencia, depende de la naturaleza del estado de excitación y del tiempo que les lleve la relajación. En la fluorescencia los estados excitados singletes, el electrón en el orbital excitado se ubica, de acuerdo con el principio de exclusión de Pauli, con el segundo electrón en el orbital del estado fundamental (por espín opuesto), entonces la caída al estado fundamental está permitida por el espín y se produce una emisión rápida de un fotón, la tasa de la fluorescencia normalmente es 10^8 s^{-1} . En la fosforescencia la emisión de luz ocurre de los estados excitados triplete, el electrón en el orbital del

estado excitado tiene la misma orientación de espín que el electrón en el orbital del estado base. De manera que las transiciones al estado base están prohibidas y la tasa de emisión es lenta de 10^3 a 10^0 s^{-1} . La fosforescencia no suele ocurrir en soluciones líquidas a temperatura ambiente, ya que existen otros procesos de desactivación que compiten con la emisión, como el decaimiento no radiativo y los procesos de apagado (quenching) [3].

La fluorescencia es un fenómeno muy común en moléculas orgánicas aromáticas. Mientras que los átomos no suelen ser fluorescentes en fases condensadas, excepto por el grupo de los lantánidos que se caracterizan por tener transiciones electrónicas entre orbitales $4f$.

Los espectros de emisión pueden variar dependiendo de la estructura química del fluoróforo y del disolvente en el que está disuelto [3].

Los procesos de absorción y emisión de luz suelen representarse utilizando los diagramas de Jablonski que ilustran el estado base S_0 y los dos primeros estados excitados S_1 y S_2 , respectivamente. Como se muestra en la Fig. 2.3. Además en cada estado excitado se observan los niveles vibracionales en los que el fluoróforo se puede encontrar, representados por 0, 1, 2, etc. Las transiciones entre estados se representan con líneas verticales para identificar la naturaleza de la absorción y emisión. Las interacciones con el solvente y las transferencia de energía aún no son tenidas en cuenta en este diagrama.

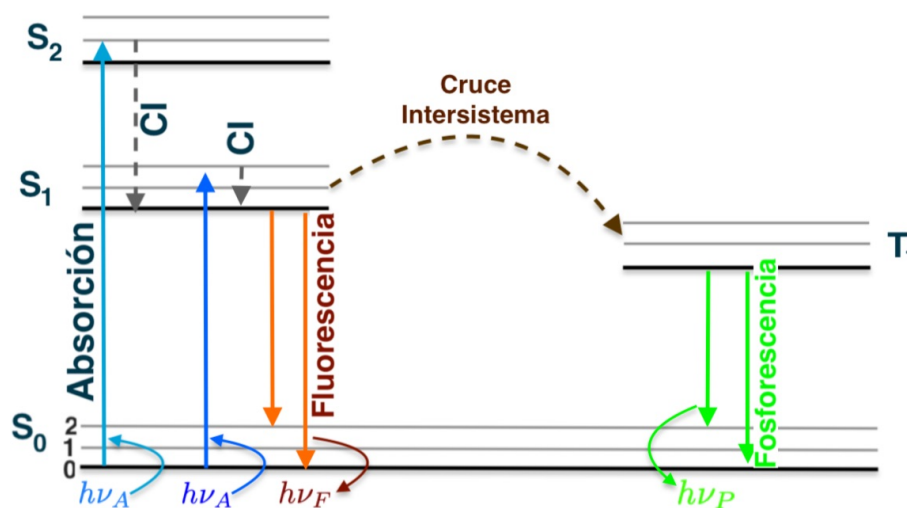


Figura 2.3: Representación de un diagrama de Jablonski.

Después de que un sistema absorbe luz, pueden ocurrir diferentes procesos. El fluoróforo es excitado y dependiendo de la energía puede poblar los niveles S_1 , S_2 o S_n (siendo n un estado excitado superior). Cuando el sistema se relaja hasta llegar al nivel más bajo de S_1 , el proceso se llama conversión interna (CI) y generalmente ocurre en 10^{-12} s o menos, lo que significa que ocurre antes de la emisión (10^{-8} s).

Por lo tanto, la emisión de la fluorescencia suele ser el resultado de un estado excitado en equilibrio térmico, en otras palabras del estado de menor energía S_1 [3].

Un proceso intermedio en un sistema molecular es que, una vez en el estado S_1 ocurra una conversión de espín al primer estado triplete T_1 , y la emisión de este estado da lugar a la fosforescencia. En general, esta emisión se desplaza a longitudes de onda más largas (es decir, de menor energía) comparada con la fluorescencia. El proceso de conversión de espín de S_1 a T_1 se llama cruce intersistema [3].

En general, la fluorescencia se caracteriza por el desplazamiento de Stokes, pues en el diagrama de Jablonski se muestra que usualmente la emisión ocurre con menor energía que la absorción. Este fenómeno fue observado por G.G. Stokes en 1852 [79], quién afirmó que las pérdidas de energía entre la excitación y la emisión se observan universalmente para las moléculas fluorescentes en solución. La causa del desplazamiento Stokes es la rápida caída al nivel vibracional más bajo de S_1 . Adicionalmente, puede ocurrir otros efectos para los fluoróforos que generan más desplazamientos de Stokes, estos efectos están relacionados con el disolvente, las reacciones del estado excitado, la formación de complejos y/o la transferencia de energía [3].

En la mayoría de los fluoróforos el espectro de emisión es una imagen especular del espectro de absorción, sin embargo, existen excepciones; por ejemplo, cuando existe alguna ionización de algún grupo funcional. Asimismo, la concentración de fluoróforos bioquímicos puede afectar el espectro de emisión y generar mayores desplazamientos de Stokes.

Existen dos clases generales de fluoróforos, intrínsecos y extrínsecos. Los primeros aparecen de forma natural, mientras que los segundos se añaden a una muestra y presentan propiedades espectrales particulares. Un fluoróforo intrínseco dominante es el grupo indol del triptófano, absorbe luz de alrededor de 280 nm y emite alrededor de 340 nm. El espectro de emisión del indol suele ser muy sensible a la polaridad del disolvente.

Los desplazamientos de Stokes, es decir la aparición de longitudes de onda más largas en la emisión comparadas con la de la absorción, ocurre frecuentemente para fluoróforos polares en disolventes polares, su desplazamiento se debe a las interacciones entre el fluoróforo y su entorno inmediato.

2.7.1. Transferencia de energía de resonancia

Típicamente la transferencia de energía por resonancia (RET por sus siglas en inglés) es llamada transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o de Förster (FRET por sus siglas en inglés). En este mecanismo se considera que un fluoróforo es excitado y ocurre una transferencia de energía sin radiación desde el estado excitado del fluoróforo (donador) a otro fluoróforo (aceptor) muy cercano, a través de un acoplamiento dipolo-dipolo. Esta transferencia de energía tiene lugar a distancias de 30 a 60 Å [3]. La eficiencia E_{FRET} con la que ocurre esta transferencia de energía es

muy sensible a la distancia de separación de los dos fluoróforos, r , según la expresión

$$E_{FRET} = \left(1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6\right)^{-1}, \quad (2.93)$$

donde R_0 representa el radio de Förster del donador y aceptor, el cual depende del solapamiento del espectro de excitación del aceptor y el espectro de emisión del donante.

Cuando dos fluoróforos se asocian para producir una FRET la intensidad de la emisión del donante disminuye, como se ilustra en la Fig. 2.4

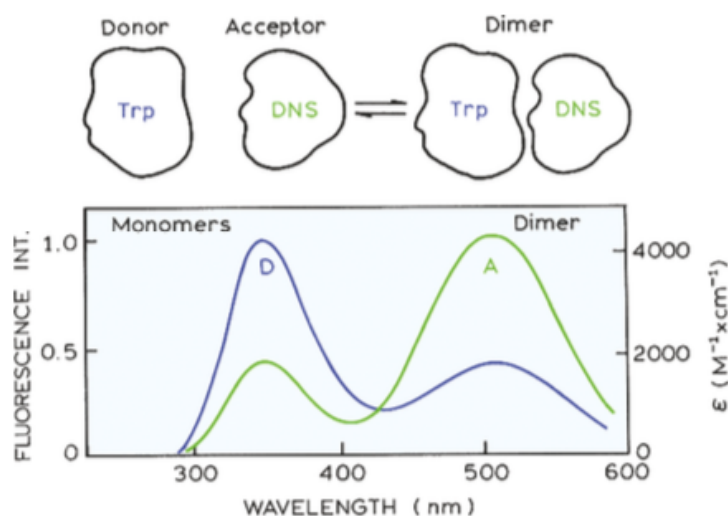


Figura 2.4: Figura tomada de [3]-**Fig. 1.24**. Transferencia de energía entre monómeros etiquetados como donador (D) y aceptor (A) que se asocian para formar un dímero. Este ejemplo representa al donador como el triptófano (Trp) y el aceptor como el dansilo (DNS).

2.8. Propiedades de absorción y emisión del Europio

Dadas las propiedades luminiscentes del *Trp* y el ion Eu^{3+} , la posibilidad de estimular la emisión del Eu^{3+} por la presencia del *Trp*, es factible, pues el ion se puede incorporar en un entorno orgánico, siendo capaz de captar luz. Por lo tanto, la energía se puede transferir desde un entorno excitado al ión, el cual termina emitiendo. Por esta razón, es importante tener como referencia las transiciones de absorción y emisión del ion Eu^{3+} en las Tablas 2.1 y 2.2. Dichas transiciones fueron reportadas por primera vez por Dieke y colaboradores, quienes realizaron mediciones espectrales sistemáticas en matrices de LnCl_3 . Los resultados se presentan en el diagrama de

Dieke [80], que reporta la energía de los estados para los iones Ln^{3+} , algunos de ellos se pueden observar en la Fig. 2.5.

Particularmente el Eu^{3+} tiene una emisión roja muy intensa, debida a las transiciones $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_J$ donde $J = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$ que representan los niveles de la configuración $4f^6$. El nivel $^5\text{D}_0$ no manifiesta desdoblamiento por influencia del campo cristalino ($J = 0$).

Tabla 2.1: Transiciones observadas del espectro de absorción del Eu^{3+} .

Transición	Rango de longitud de onda (nm)
$^7\text{F}_6 \leftarrow ^7\text{F}_0$	1850-2200
$^5\text{D}_0 \leftarrow ^7\text{F}_1$	585-600
$^5\text{D}_0 \leftarrow ^7\text{F}_0$	570-585
$^5\text{D}_1 \leftarrow ^7\text{F}_1$	530-540
$^5\text{D}_1 \leftarrow ^7\text{F}_0$	520-530
$^5\text{D}_2 \leftarrow ^7\text{F}_1$	470-480
$^5\text{D}_2 \leftarrow ^7\text{F}_0$	460-470
$^5\text{D}_3 \leftarrow ^7\text{F}_1$	410-420
$^5\text{L}_6 \leftarrow ^7\text{F}_1$	400-410
$^5\text{L}_6 \leftarrow ^7\text{F}_0$	390-405
$^5\text{D}_4 \leftarrow ^7\text{F}_1$	365-370
$^5\text{D}_4 \leftarrow ^7\text{F}_0$	355-365

Tabla 2.2: Transiciones observadas del espectro de luminiscencia del Eu^{3+} .

Transición	Rango de longitud de onda (nm)
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$	570-585
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$	585-600
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$	610-630
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$	640-660
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$	680-710
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_5$	740-770
$^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_5$	810-840



Capítulo 3

Metodología

En este capítulo se especifican los métodos computacionales y experimentales usados en este trabajo de tesis. Debido a la observación experimental que hizo evidente un corrimiento al rojo en la longitud de onda de excitación en función de la concentración para soluciones de *Trp* en agua, se presenta en primera instancia una descripción cualitativa del modelo usado teóricamente para estudiar el efecto de la concentración de *Trp* en agua en los espectros de absorción y emisión. Por supuesto, el modelo de solvatación usado también es justificado más adelante. En segunda instancia, con el fin de estudiar la influencia de la polaridad en la fluorescencia del *Trp*, se describe el modelo empleado para simular el sistema de *Trp* en acetona que proporciona resultados comparables con los experimentales. Posteriormente, se describe de forma análoga el modelo de *Trp* en ciclohexano. Por último, se explica de forma cualitativa el método empleado para modelar y obtener resultados comparables con los datos experimentales obtenidos solo para el Eu^{3+} en agua y descritos en la literatura del Eu^{3+} en agua sensibilizado con *Trp*.

3.1. Modelado de los clusters

A continuación se justifican los clusters empleados para modelar el *Trp* en solventes tales como agua, acetona y ciclohexano. Por último, se presenta el cluster del complejo *Trp*- Eu^{3+} en agua.

3.1.1. *Trp* en agua

Existen diferentes confórmeros de *Trp* en los que puede ser más estable este aminoácido, dependiendo del entorno local. Además de esto, su estructura también puede cambiar de una forma neutra, para solventes no polares o propiamente en su estado gaseoso, a una forma zwitteriónica para solventes polares (ver Fig. 1.5) [24,26,81]. Teniendo en cuenta lo anterior, para la construcción de clusters es necesario considerar el confórmero más conveniente.

Debuze et al. [82] y Eriksen et al. [83] realizaron un análisis conformacional del *Trp* en solución acuosa utilizando dinámica molecular a 300 K y simulaciones de mecánica molecular. Observaron a través de NMR (Nuclear Magnetic Resonance) que la conformación predominante se produce cuando los anillos del grupo indol tienen una orientación perpendicular *p* ($\chi_2 = -90^\circ$) y un enlace en la configuración $-g$ ($\chi_1 = -60^\circ$), ver Fig. 1.4. Sin embargo, las interacciones entre soluto-disolvente que se generan a través de enlaces de hidrógeno son importantes y pueden afectar considerablemente el espectro de absorción y emisión.

Generalmente, los enlaces de hidrógeno se forman por la interacción entre átomos de hidrógeno y moléculas polares, debido a la carga parcial positiva que adquiere el hidrógeno (H) y la carga negativa que adquiere el nitrógeno (N) o el oxígeno (O), como es el caso de estudio de este trabajo con las moléculas de agua y el *Trp*. También, como ya se ha mencionado anteriormente el *Trp* en disolventes polares, como el agua ($\epsilon \approx 80$), es más estable en su forma zwitteriónica. Sin embargo, solo es posible mantener su estabilidad a través de los enlaces de hidrógeno que se forman con moléculas de agua a su alrededor. Por estas razones, es imprescindible considerar para el modelo de solvatación discreto.

Ahora bien, al modelar con el método discreto de disolvente, es decir *Trp* con moléculas de agua explícitas, el conformero más estable ahora es diferente. Hurtado et al. [24] confirmaron con este método de solvatación, usando ocho moléculas de agua, que el conformero más estable se describe por un enlace de tipo *t* ($\chi_1 = 60^\circ$) y una orientación perpendicular *p* ($\chi_2 = -90^\circ$), es decir *Zpt* (ver Fig. 3.1). Por supuesto, experimentalmente es posible tener una combinación de diferentes conformeros que contribuyen individualmente a la fluorescencia total. Es por ello que se consideró adicionalmente el conformero *Zag*⁺ (ver Fig. 3.1), que es el conformero de la estructura neutra *Nag*⁺, la cual según diferentes investigadores es la más estable en fase gaseosa [18–20, 22].

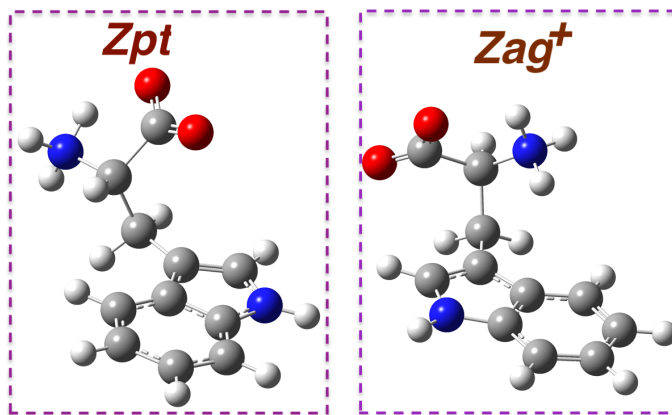


Figura 3.1: Geometrías optimizadas de los conformeros *Zpt* y *Zag*⁺ en agua, usando el modelo PCM.

Tomando como geometrías iniciales los conformeros *Zpt* y *Zag*⁺, ahora el proble-

ma es encontrar las posiciones nucleares del estado fundamental de todos los átomos que conformarán el cluster, aceptando el hecho de que nueve moléculas de agua son necesarias para estabilizar el zwitterión como lo muestra Liu et al. [21]. Es importante precisar que introducir moléculas de agua explícitas aleatoriamente e ir aumentando la cantidad de las mismas alrededor del *Trp* es poco práctico, pues aunque las moléculas de agua más cercanas al *Trp* interaccionan fuertemente entre sí y con el *Trp*, las moléculas de agua situadas más lejos del *Trp* dejan de interaccionar con él, pero siguen interaccionando entre ellas, y debido a la zona de vacío estándar impuesta es difícil establecer un límite donde las moléculas de agua no interaccionen, porque siempre lo hacen. Así es complicado encontrar una correcta optimización geométrica del cluster.

Para solucionar el problema de las posiciones nucleares de los átomos se lleva a cabo un cálculo de mecánica molecular (MM) [84, 86] que considera cientos de moléculas de agua, lo que permite un modelado más realista a través de las condiciones de frontera periódicas. En el procedimiento, los átomos se consideran como partículas puntuales, entonces se toman en cuenta doscientas moléculas de agua que rodean una molécula de *Trp* (*Zpt* o *Zag*⁺) dentro de una celda. Posteriormente, se aplican los parámetros del campo de fuerza de Dreiding [85] en el cálculo, y luego de un paso de dinámica NVT a T=300 K, se obtiene un sistema que incluye la media de todas las posibles posiciones atómicas internas en función de su energía. De este último paso del cálculo, se extraen las coordenadas correspondientes al cluster $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ del cual se espera contenga información de un entorno preciso, aunque esté inmerso en el vacío. Este proceso genera una geometría inicial para realizar el cálculo de optimización al nivel de química cuántica, y posteriormente sus transiciones verticales.

A partir de la unidad base $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, como se observa en la Fig. 3.2 se construyeron cuatro clusters aumentando a la misma razón 1:9, las moléculas de *Trp* y de agua en dos, tres y cuatro unidades a distancias reducidas entre las unidades, para modelar la concentración en función de las posibles interacciones. Vale la pena mencionar que existen diferentes geometrías en las que puede ubicar la segunda, tercera y cuarta molécula de *Trp* con sus respectivas moléculas de agua circundantes, es por ello que en el apéndice C se presentan algunas geometrías diferentes con sus respectivas energías.

Con respecto a la concentración es importante aclarar que para los cálculos cuánticos no se cuenta con un parámetro de volumen establecido, de hecho cualquier cluster modelado se considera rodeado de un vacío infinito. Entonces, partiendo del hecho que la concentración de masa es proporcional a la relación entre masa del soluto y el volumen de la solución:

$$\text{Concentración de masa} = \frac{\text{Masa de soluto}(g)}{\text{Volumen de solución}(L)}. \quad (3.1)$$

En este sentido, la Fig. 3.3 representa cualitativamente el aumento de la concentración de soluto en un disolvente, como se observa la distancia de separación entre moléculas

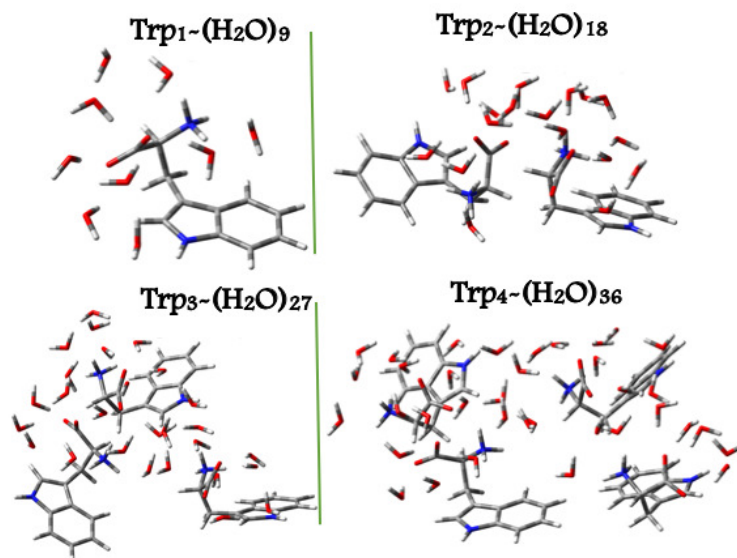


Figura 3.2: Geometrías optimizadas de los clusters de *Trp* en agua, usando nueve moléculas de agua alrededor de cada *Trp*.

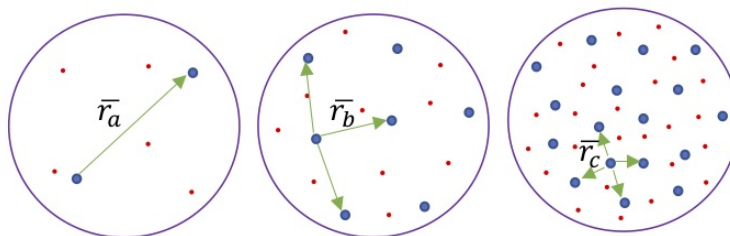


Figura 3.3: Ilustración cualitativa de la masa de un soluto en un volumen determinado que aumenta con la concentración. A bajas concentraciones de soluto, la distancia media de separación entre las moléculas de soluto es grande, pero disminuye al aumentar la concentración, de forma que $\bar{r}_a < \bar{r}_b < \bar{r}_c$.

de soluto a bajas concentraciones es grande, pero cuando la concentración incrementa, la distancia media de separación disminuye, permitiendo así más interacciones entre moléculas de soluto.

Debido a la ausencia del parámetro de volumen, en este trabajo se considera el parámetro de la distancia de separación entre moléculas de soluto para modelar cualitativamente la concentración, como un análogo al comportamiento observado experimentalmente. Bajo este argumento se construyeron los clusters propuestos en la Fig. 3.2, los cuales garantizan primero, que cada molécula de *Trp* adquiriera la forma zwitteriónica correcta con las nueve moléculas de agua rodeando el *Trp*; y segundo, que las interacciones que genera el aumento de la concentración sean consideradas en los clusters construidos al disminuir la distancia entre moléculas de *Trp* cercanos.

Se podría pensar que la forma más sencilla de modelar la concentración es a partir

de un número de moléculas fijo, por ejemplo 36, e incrementar las moléculas de *Trp* de la siguiente manera: $(Trp)_1 - (H_2O)_{36}$, $(Trp)_2 - (H_2O)_{36}$, $(Trp)_3 - (H_2O)_{36}$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$. Pero es apropiado reiterar que en los cálculos cuánticos no se tiene control sobre el parámetro de volumen, y las moléculas de agua restantes a las nueve necesarias para el zwitterión, pueden ubicarse entre las moléculas de soluto generando mayor separación entre ellas, causando que sus interacciones no sean las esperadas.

3.1.2. *Trp* en acetona

La estabilidad de la estructura zwitteriónica del *Trp* en solventes polares ya ha sido ampliamente estudiada en la literatura. Sin embargo, en solventes con menor polaridad, como lo es la acetona ($\epsilon \approx 21$), la forma más estable del *Trp* aún es una cuestión abierta. Por lo tanto, antes de construir los clusters que permitan obtener resultados teóricos comparables con los experimentales, es necesario hacer un estudio particular del *Trp* en acetona para encontrar la estructura más estable (zwitteriónica o neutra) en este disolvente, el número de moléculas de acetona necesarias alrededor del *Trp*, y finalmente el conformero más estable en este ambiente.

Con el fin de encontrar un conformero y una estructura de *Trp* en acetona como punto de partida es conveniente citar el trabajo de Hurtado et al. [24], quienes reportaron las energías electrónicas absolutas de conformeros de *Trp* zwitteriónicos y neutros en diferentes disolventes con el modelo PCM. A continuación, en la Tabla 3.1 se describen las energías reportadas por los autores para el disolvente de acetona usando dos métodos.

Conformero	Método	
	B3LYP/6-31+G(d,p)	MP2/aug-cc-pvdz//B3LYP/6-31+G(d,p)
<i>Zpg</i> ⁺	-686,43422	-684,542402
<i>Zpg</i> ⁻	-686,4336676	-684,5400316
<i>Zpt</i>	-686,4303064	-684,5359494
<i>Zag</i> ⁺	-686,4341004	-684,5418542
<i>Zag</i> ⁻	-686,435533	-684,541394
<i>Zat</i>	-686,428921	-684,534681
<i>Nag</i> ⁻	-686,4381768	-684,5442434
<i>Npg</i> ⁺	-686,4368945	-684,544409
<i>Nag</i> ⁺	-686,4369747	-684,5443263

Tabla 3.1: Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de los conformeros de *Trp* zwitteriónicos y neutros más estables en acetona simulados con el modelo PCM con los métodos indicados. Los datos fueron reportados por Hurtado et al. [24].

En primer lugar, los métodos usados para calcular la energía muestran que usando un modelo de solvatación implícito es más estable la estructura neutra del *Trp*. Sin embargo, hay que manejar esta información cuidadosamente, ya que con agua sucede

el mismo comportamiento, pero se sabe que en agua es más estable la forma zwitteriónica y por eso surge la necesidad de considerar moléculas de agua explícitas. En segundo lugar, la información proporcionada por la Tabla 3.1 permite dar una idea de los conformeros más estables en acetona, aunque estén en su forma neutra, estos son Nag^- , Npg^+ y Nag^+ con las energías más bajas. A pesar de esto, es necesario hacer un estudio particular, considerando moléculas de acetona explícitas similar al caso del disolvente agua. Teniendo en cuenta que el hecho de usar un modelo de solvatación discreto con moléculas de acetona alrededor del *Trp*, genera interacciones a través de enlaces de hidrógeno que cambian la geometría del *Trp*, y consecuentemente el conformero más estable, que aún es desconocido.

Para comenzar la construcción de los clusters que permitan comparar resultados espectroscópicos teóricos y experimentales de *Trp* en acetona, se toma en cuenta el valor experimental máximo de la longitud de onda del espectro de excitación del *Trp* en acetona ($\lambda = 344$ nm), que será discutido en el próximo capítulo. En este sentido, se emplea inicialmente el conformero Nag^+ y Zag^+ para los cálculos, debido a que es uno de los más estables en acetona, como también en agua y el más estable en fase gaseosa. Los espectros de absorción óptica (AO) calculados para este conformero en su forma neutra y zwitteriónica usando PCM se muestran en la Fig. 3.4. Se puede observar que las bandas de absorción están lejos de lo observado experimentalmente. Así que en la Fig. 3.5 se muestran las bandas de AO considerando una, dos, tres, cuatro, cinco y nueve moléculas de acetona y en algunos casos incluyendo el modelo PCM.

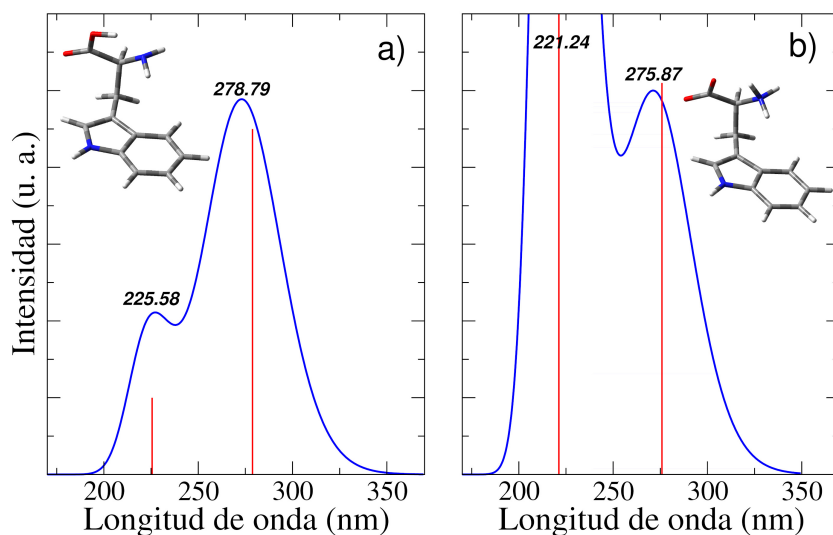


Figura 3.4: Espectros de absorción óptica calculados para los conformeros a) Nag^+ -PCM y b) Zag^+ -PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados con mayor fuerza de oscilador.

En el panel a) de la Fig. 3.5 se encontró que al incorporar una molécula de acetona al conformero Nag^+ aún no es suficiente para obtener un espectro de absorción con un

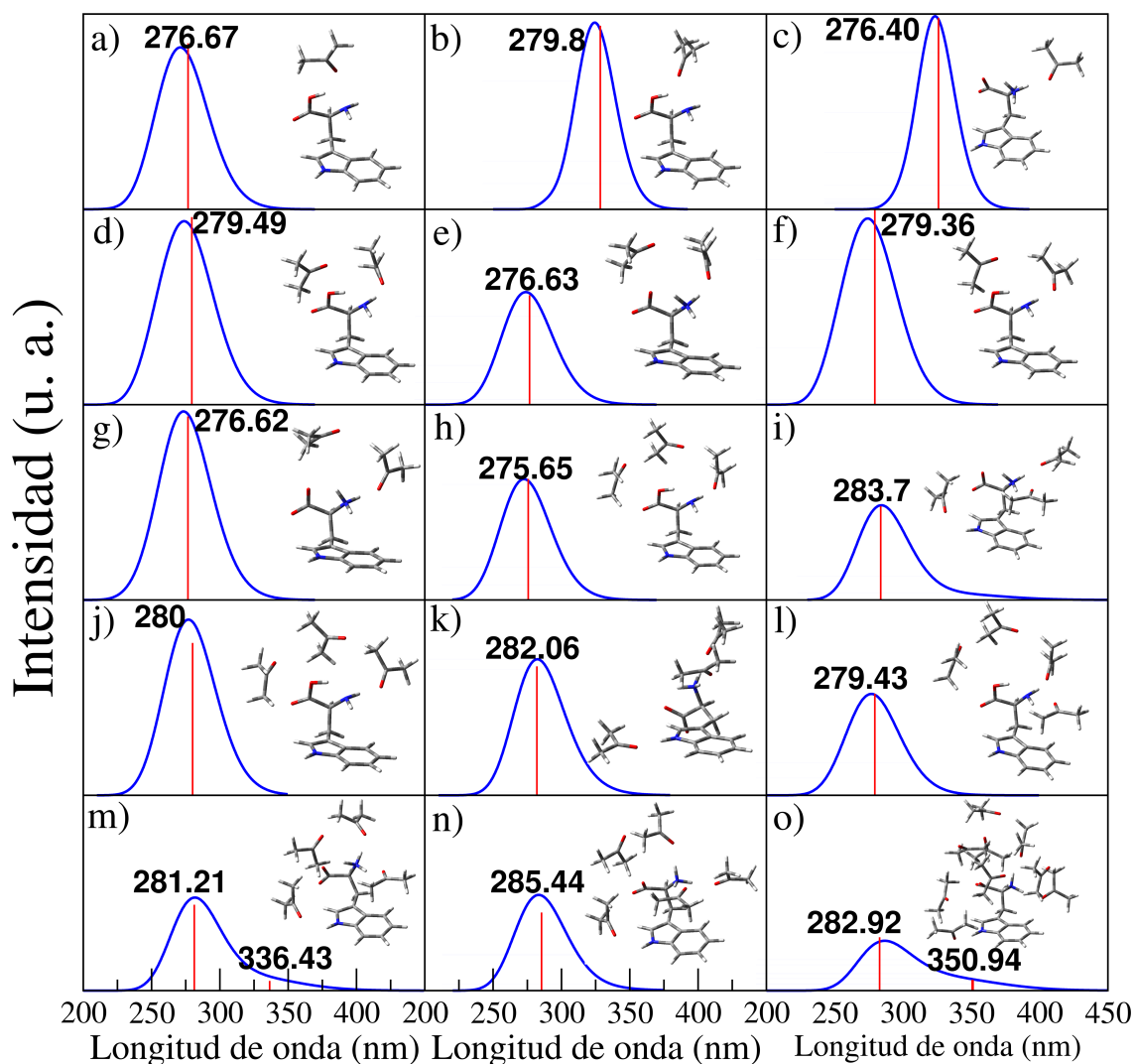


Figura 3.5: Espectros de absorción UV-Vis para diferentes clusters de *Trp* en acetona (C_3H_6O) usando un modelo de solvatación discreto y en algunos casos PCM: a) $Nag^+-(C_3H_6O)_1$, b) $Nag^+-(C_3H_6O)_1$ -PCM, c) $Zag^+-(C_3H_6O)_1$ -PCM, d) $Nag^+-(C_3H_6O)_2$, e) $Zag^+-(C_3H_6O)_2$, f) $Nag^+-(C_3H_6O)_2$ -PCM, g) $Zag^+-(C_3H_6O)_2$ -PCM, h) $Nag^+-(C_3H_6O)_3$, i) $Zag^+-(C_3H_6O)_3$, j) $Nag^+-(C_3H_6O)_3$ -PCM, k) $Zag^+-(C_3H_6O)_3$ -PCM, l) $Nag^+-(C_3H_6O)_4$, m) $Zag^+-(C_3H_6O)_4$, n) $Zag^+-(C_3H_6O)_5$ y o) $Zag^+-(C_3H_6O)_9$.

valor cercano al obtenido experimentalmente, en contraparte la forma zwitteriónica del mismo conformero Zag^+ no es estable sólo con una molécula de acetona. Ahora, en los paneles b) y c) se consideró Nag^+ y Zag^+ cada uno con una molécula de acetona y además con PCM, respectivamente; para el primer caso con Nag^+ se observa que el PCM genera un leve corrimiento a $\lambda = 279.8$ nm, lo cual no ocurre en el segundo caso con Zag^+ , para esta solvatación combinando modelo discreto (con una molécula de acetona) y modelo continuo, la estructura zwitteriónica es más estable, como se puede

Solvatación	Estructura	
	Nag^+	Zag^+
$(C_3H_6O)_1$	-879.627928	-
$(C_3H_6O)_1$ -PCM	-879.647404	-879.660592
$(C_3H_6O)_2$	-1072.7873757	-1072.7787528
$(C_3H_6O)_2$ -PCM	-1072.805132	-1072.8085829
$(C_3H_6O)_3$	-1266.082793	-1266.111516
$(C_3H_6O)_3$ -PCM	-1265.987693	-1265.998757
$(C_3H_6O)_4$	-1459.146892	-1459.472138
$(C_3H_6O)_5$	-	-1652.335359

Tabla 3.2: Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de Nag^+ y Zag^+ simulados con el modelo de solvatación discreto y en algunos casos también con el PCM. El método de cálculo para todos los casos fué B3LYP/6-31+G(d,p)//TD-B3LYP/6-311+G(d,p).

notar en la Tabla 3.2. Incrementando las moléculas de acetona a dos, para los paneles d) y e) con Nag^+ y Zag^+ respectivamente, es evidente que los espectros de absorción no presentan cambios significativos respecto de los casos anteriores, sólo que con dos moléculas de acetona es más estable la estructura neutra. Un comportamiento similar ocurre en los paneles f) y g) los cuales consideran el PCM, para los casos anteriores y no afecta en gran medida los espectros de absorción, pero genera que sea más estable la forma zwitteriónica. En los paneles h) e i) el espectro de absorción empieza a desplazarse al longitudes de onda más largas, especialmente para el caso con Zag^+ , que de hecho ahora es más estable sólo con tres moléculas de acetona. De aquí en adelante, las energías del estado fundamental de los demás casos mostraron más estabilidad de la forma zwitteriónica, con acetona modelada de forma explícita y combinada con la forma implícita. Considerando hasta tres moléculas de acetona, se observó que los espectros de absorción no tienen diferencias significativas cuando se incluye el PCM. De manera que, a partir de cuatro moléculas de acetona, ya no se tomó en cuenta el PCM, además de que el método de solvatación mezclado toma cada vez más tiempo de cálculo, cuando van aumentando el número de átomos.

Después de incrementar las moléculas de acetona hasta cuatro, se logra visualizar la tendencia del zwitterión a ser más estable que la estructura neutra, lo que arroja un primer resultado y es que el *Trp* en acetona, al igual que en agua, es más estable en su forma zwitteriónica. Sin embargo, es necesario seguir aumentando la cantidad de moléculas de acetona para tener un espectro comparable con el experimental. Con cinco moléculas de acetona ya es más clara la tendencia del espectro a desplazarse al rojo, así que se estimó que, al igual que en el caso del agua, nueve moléculas de acetona podrían ser suficientes. Como se muestra en el panel o) con nueve moléculas de acetona, donde aparece el primer estado excitado en $\lambda = 350.94$ nm, valor cercano al experimental, sin embargo tiene una intensidad muy baja, es decir una probabilidad de ocurrir muy pequeña.

Es importante mencionar que un cluster con nueve moléculas de acetona y una molécula de *Trp* contiene una cantidad de átomos significativa, lo cual requiere para optimizar la geometría del estado fundamental, bajar el nivel de cálculo a uno semi-empírico, que para este trabajo fue conveniente usar PM6, ya que el tamaño del sistema ya es muy grande para un nivel DFT. Pero como aún no fue suficiente con nueve moléculas de acetona obtener un espectro de AO comparable con el experimental, es necesario considerar más moléculas de acetona, pero agregar más moléculas de acetona es cada vez más difícil, pues no se sabe con certeza las interacciones importantes entre el soluto y el disolvente. Por lo tanto, se realizó un estudio de dinámica molecular (MD por sus siglas en inglés) [87] con una molécula de *Trp* y doscientas moléculas de acetona circundantes, expuestas a variaciones de temperatura entre 273 y 1000 K a través de un baño térmico. Luego de un proceso de enfriamiento de nuevo a 273 K, es posible tener un primer acercamiento a la estructura más estable de *Trp* y la posición más precisa de las moléculas de acetona, adicionalmente se optimiza el sistema utilizando MM [84, 86]. Por supuesto, para los cálculos de espectroscopía es necesario optimizar al nivel cuántico, para ello se debe reducir el número de átomos, de manera que sólo se toman en cuenta las moléculas de acetona más próximas que rodeen bien al *Trp*, las cuales por conveniencia fueron seleccionadas diecisiete moléculas. Ahora, se eligieron los conformeros más estables en su forma zwitteriónica (Zag^+ , Zag^- , Zpg^+ y Zpt) y se optimizaron al nivel de PM6 con las posiciones de las moléculas de acetona obtenidas con MD y MM, las energías calculadas para cada conformero se muestran en la Tabla 3.3. En color verde se indica la energía más baja, así que para este estudio el conformero más estable en acetona es Zpt , aunque el conformero Zag^+ tiene una energía cercana. Sin despreciar las posibles interacciones que tenga las moléculas de agua que pueden aparecer como impurezas, en el apéndice D se hace un análisis de las consecuencias que tiene considerar algunas moléculas de agua en un cluster con acetona y *Trp*.

Conformero	Energía
Zag^+	-3971.079411
Zag^-	-3969.831683
Zpg^+	-3969.949363
Zpt	-3971.093859

Tabla 3.3: Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees, calculadas al nivel PM6//B3LYP/6-311+G(d,p), para los clusters con *Trp* más estables con 17 moléculas de acetona explícitas.

Una vez se ha encontrado el cluster de *Trp* en acetona ($(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$) que reproduce en buena medida el espectro de excitación experimental, se extiende el modelo a la razón 1:17 ($(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$), como se observa en la Fig. 3.6 para simular de forma análoga la concentración, como en el caso del agua. Sin embargo, construir clusters más grandes es más difícil, pues la unidad base ($(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$)

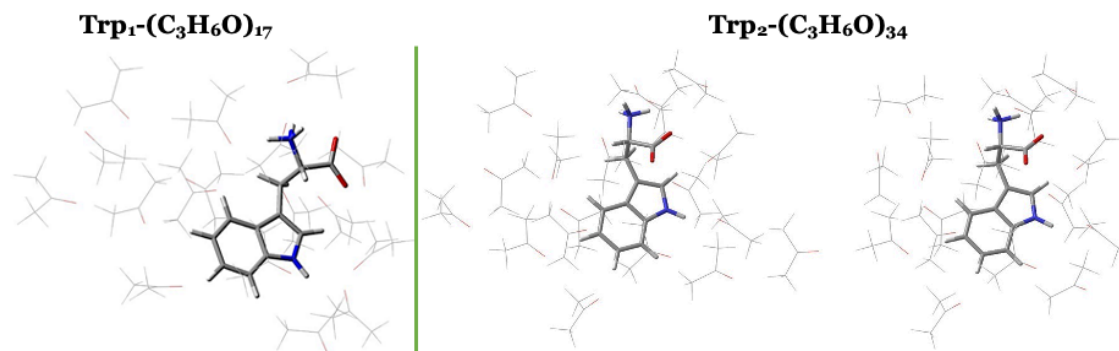


Figura 3.6: Geometrías optimizadas de los clusters de *Trp* en acetona, usando diecisiete moléculas de acetona alrededor de cada *Trp*.

ya tiene una cantidad de átomos suficientemente elevado, entonces apenas es posible construir máximo otro cluster con dos unidades base.

3.1.3. *Trp* en ciclohexano

El ciclohexano es un disolvente con una polaridad muy baja ($\epsilon \approx 2$), por lo tanto el *Trp* es estable en su forma neutra como lo han demostrado otros investigadores [18,19,22,24–26]. De hecho, Hurtado et al. [24] reportaron las energías electrónicas absolutas de los conformeros de *Trp* zwitteriónicos y neutros más estables en ciclohexano con el modelo PCM. A continuación, en la Tabla 3.4 se describen las energías reportadas por los autores y se hace evidente la estabilidad de la estructura neutra por encima de la zwitteriónica. Además, con el método MP2/aug-cc-pvdz//B3LYP/6-31+G(d,p) el conformero más estable es *Nag*⁺, el cuál han mostrado otros autores que también es el más estable en estado gaseoso.

Como se mostró para el caso del disolvente agua y acetona los enlaces de hidrógeno son importantes en el momento de modelar el disolvente. Debido a la baja polaridad del ciclohexano, se espera que los enlaces de hidrógeno sean considerablemente menores, de hecho visiblemente ausentes. Sin embargo, para asegurarse de esto, se modeló la solvatación de una molécula de *Trp*, en su estructura *Nag*⁺, en ciclohexano con tres métodos, con el modelo explícito usando dos moléculas de ciclohexano, con el modelo implícito PCM y mezclando ambos métodos como se observa en la Fig. 3.7.

En la Fig. 3.8 se calcularon los espectros de absorción para los tres sistemas mostrados en la Fig. 3.7 para identificar el mejor método para modelar el disolvente ciclohexano. Como se puede observar la envolvente de las tres curvas de absorción son muy similares, prácticamente difieren en la intensidad. En el apéndice E se pueden observar los orbitales moleculares involucrados en las transiciones que generan las curvas de absorción para el caso b) y c) de la Fig. 3.8. El lector puede verificar que en las transiciones principales no participan las moléculas de ciclohexano, lo que

Confórmero	Método	
	B3LYP/6-31+G(d,p)	MP2/aug-cc-pvdz//B3LYP/6-31+G(d,p)
Zpg^+	-686,425647	-684,533844
Zpg^-	-686,4259837	-684,5333132
Zpt	-686,4227181	-684,5293883
Zag^+	-686,4270736	-684,5352619
Zag^-	-686,427314	-684,534267
Zat	-686,418463	-684,523596
Nag^-	-686,4273144	-684,5342678
Npg^+	-686,4256466	-684,533846
Nag^+	-686,4270736	-684,535263

Tabla 3.4: Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de los conformeros de *Trp* zwitteriónicos y neutros más estables en ciclohexano simulados con el modelo PCM con los métodos indicados. Los datos fueron reportados por Hurtado et al. [24].

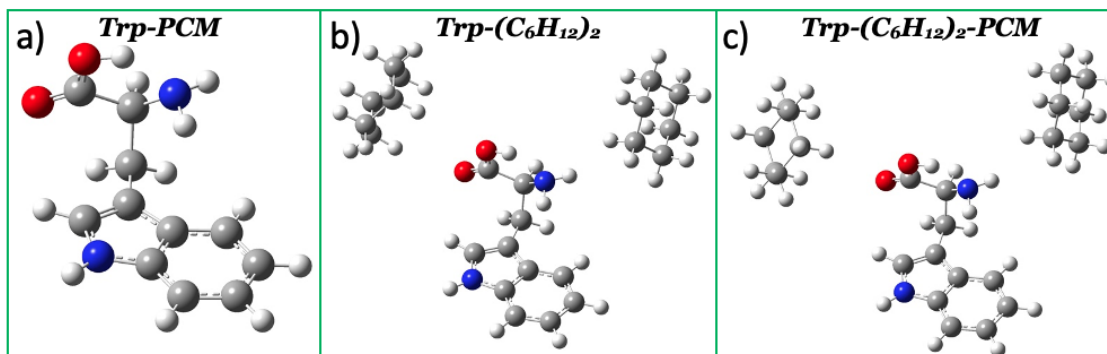


Figura 3.7: Geometrías optimizadas de los clusters de *Trp* en ciclohexano, con el confórmero Nag^+ usando el método de solvatación a) implícito con el PCM, b) explícito con dos moléculas de ciclohexano y c) una mezcla de los dos anteriores.

permite afirmar que para este trabajo el PCM es suficiente para modelar el disolvente ciclohexano.

Con el fin de modelar la concentración de soluciones de *Trp* más concentradas, se construyeron cuatro clusters $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$, manteniendo el concepto de concentración en función de la distancia de separación entre moléculas de *Trp*, la cual disminuye cuando la concentración aumenta, en la Fig. 3.9 se muestran los clusters propuestos para el estudio teórico. Ya que existen diferentes posibilidades de ubicar la segunda, tercera y cuarta molécula de *Trp*, en el apéndice F se describen en detalle dos geometrías posibles de cada cluster con su respectiva energía, sin embargo los cálculos espectroscópicos se realizaron con las geometrías de menor energía.

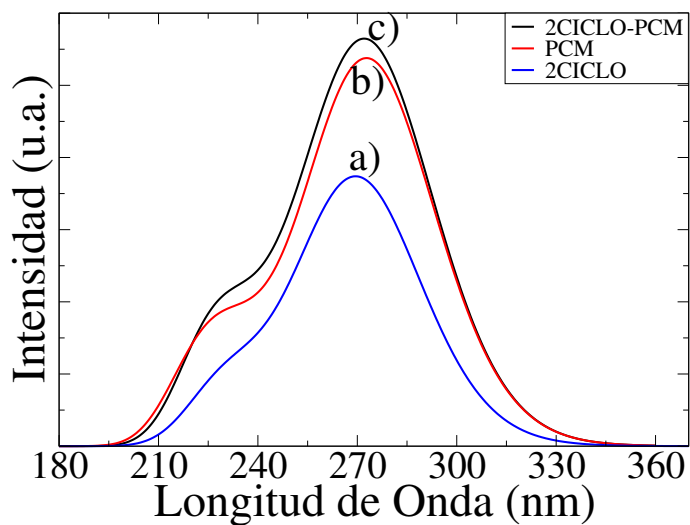


Figura 3.8: Espectros de absorción óptica calculados para las geometrías optimizadas de los clusters de *Trp* en ciclohexano, con el conformero Nag^+ usando el método de solvatación a) implícito con el PCM, b) explícito con 2 moléculas de ciclohexano y c) una mezcla de los dos anteriores.

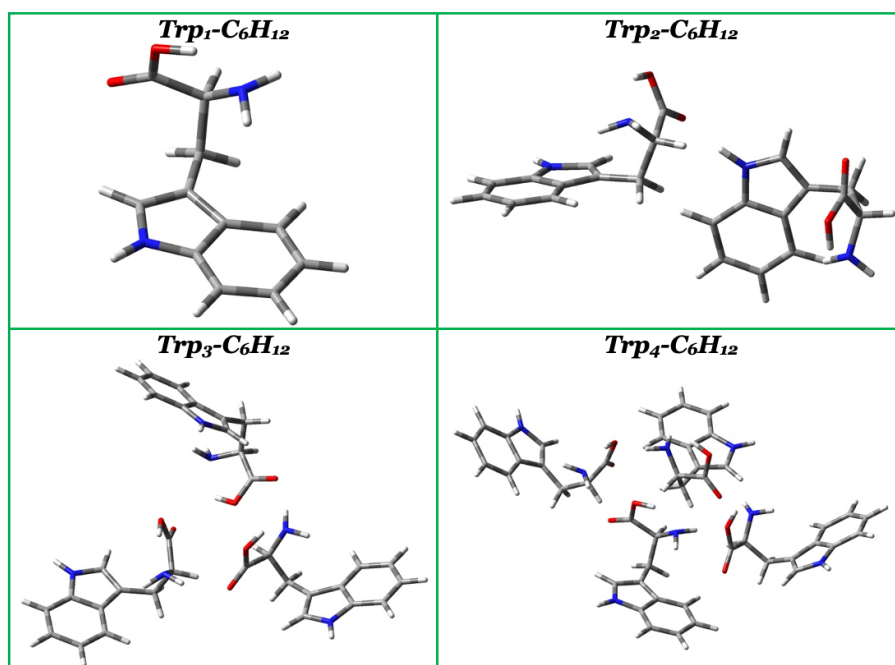


Figura 3.9: Geometrías optimizadas de los clusters de *Trp* en ciclohexano propuestos para modelar la concentración, con el conformero Nag^+ usando el método de solvatación PCM.

3.1.4. Eu^{3+} sensibilizado con *Trp* en agua

Para todos los casos anteriores, donde se modeló el *Trp* en diferentes solventes se usaron las herramientas TD-DFT para el análisis espectroscópico, estas herramientas emplean la regla de oro de Fermi para obtener la probabilidad de transición de los estados electrónicos excitados. Sin embargo, al considerar dos complejos como *Trp* y Eu^{3+} cada uno hidratado con agua el sistema presenta dificultades, primero porque el tamaño del sistema requiere de un nivel computacional muy elevado; y segundo, porque la mayoría de las transiciones del ion Eu^{3+} invierten su espín en la absorción, y este fenómeno no es considerado en el cálculo cuántico usado por Gaussian. A pesar de esto, los cálculos TD-DFT pueden ser un complemento con ayuda de la teoría de Judd-Offelt [88] empleada por el software LUMPAC, que permite conectar resultados teóricos de absorción con mediciones experimentales de emisión del ion Eu^{3+} , los detalles teóricos se muestran en el apéndice G. LUMPAC arroja los coeficientes de Judd-Offelt que permiten determinar algunas propiedades, tales como la transferencia de electrones involucrada en los diferentes niveles de excitación y Gaussian muestra las contribuciones moleculares involucradas en las transiciones.

Para modelar el cluster con los complejos de *Trp* y Eu^{3+} , primero se optimizaron en agua (de forma discreta) ambos complejos por separado al nivel cuántico con Gaussian, ver Fig. 3.10, teniendo en cuenta que el ion de europio experimentalmente fue obtenido del Cloruro de Europio Hexahidratado, $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

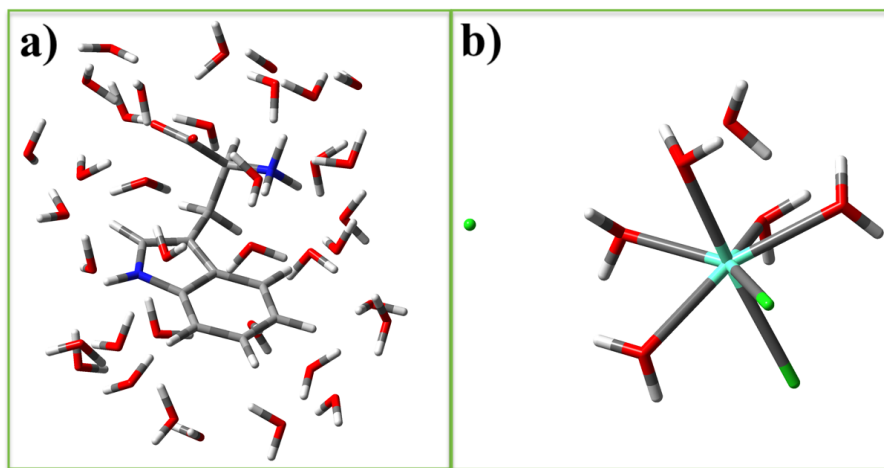


Figura 3.10: Geometrías optimizadas de los clusters de a) *Trp* en agua y b) $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Luego, se construyó un cluster con las estructuras obtenidas anteriormente para formar los complejos de *Trp* y Eu^{3+} , se optimizó la geometría (ver Fig. 3.11) usando un cálculo semiempírico RM1 [89], con una aproximación de Sparkle [90–92] usada por LUMPAC. La aproximación consiste en modelar la presencia del ion de lantánido con una carga +3 en el sistema, parametrizando convenientemente los orbitales s, p

y d para que con un criterio de energía de formación mínima de ese elemento, más la energía total molecular de todo el complejo, se optimice consigo la información de la posición más esperada de todos los átomos inclusive la del lantánido, aunque no estén involucrados los orbitales f (en el cálculo cuántico, pero sí en la teoría de Judd-Ofelt). La geometría optimizada del sistema es aceptable, a pesar de la ausencia del lantánido (sustituido por una carga +3), aunque es necesario resolver este problema de alguna forma para el estudio de las propiedades ópticas. Para ello, el primer paso es usar el método de LUMPAC, que luego de optimizar, arroja las transiciones de absorción del sistema debidas a los átomos del complejo que rodean al lantánido, usando el método de tipo CIS, llamado ZINDO [93]. Entonces, las bandas de absorción obtenidas son debidas a las moléculas de agua, *Trp* y átomos de cloro que acompañan al ion Eu^{3+} . Posteriormente, LUMPAC requiere como información de entrada la curva de emisión experimental para aplicar la teoría de Judd-Ofelt que provee como resultado los coeficientes de Judd-Ofelt Ω_2 y Ω_4 , los cuales se usan para obtener la probabilidad de transición de energía entre los estados del medio ambiente y el lantánido.

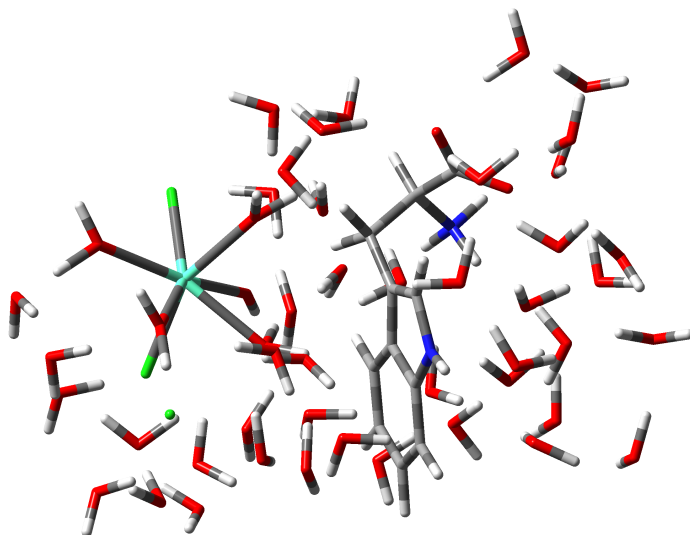


Figura 3.11: Geometría optimizada del complejo *Trp*- EuCl_3 en agua.

Un camino complementario, es obtener la absorción óptica del complejo con la presencia del lantánido real (no como carga) en el cluster, con el código Gaussian 16 [94] a través de cálculos TD-DFT con una base atómica y pseudopotencial CEP-4G [95] que maneja información del lantánido. Obteniendo información de los orbitales involucrados en las transiciones.

3.2. Método de cálculo

Todos los cálculos cuánticos realizados para el análisis de los disolventes, se llevaron a cabo con el programa Gaussian 16 [94].

Luego de obtener una geometría inicial después de un proceso de MD y MM, como se mencionó en la sección anterior, las geometrías del estado fundamental (EF) de cada cluster fueron obtenidas usando el método semi-empírico PM6, verificando con un cálculo de frecuencias que la estructura de cada cluster representa un mínimo local. Posteriormente, los espectros de absorción óptica se calcularon con la metodología TD-DFT al nivel 6-311+g(d,p), que a su vez permite conocer las contribuciones de los orbitales moleculares involucrados en cada transición electrónica.

Los clusters conformados por una cantidad de átomos considerablemente pequeña, fueron re-optimizados en el EF al nivel B3LYP/6-31+g(d,p) para obtener sus excitaciones electrónicas y el EE optimizado al mismo nivel, que proporciona la emisión de cada sistema.

3.3. Método experimental

Las sustancias empleadas para las mediciones experimentales de este trabajo se describen a continuación con sus respectivas especificaciones:

- **L-Tryptophan** (Sigma Aldrich) $C_{11}H_{12}N_2O_2$; peso molecular: 204.23 g/mol; pureza $\geq 99.5\%$; estado sólido.
- **Agua desionizada** H_2O ; peso molecular: 18.02 g/mol; ultrapura obtenida de un proceso libre de endotoxinas, nucleasas, metales pesados, hongos y bacterias; una resistividad de 18.2 ($M\Omega \cdot cm$); estado líquido
- **Acetona** (Sigma Aldrich) CH_3OCH_3 ; peso molecular: 58.08 g/mol; pureza $\geq 99.8\%$; estado líquido.
- **Ciclohexano** (Sigma Aldrich) C_6H_{12} ; peso molecular: 84.16 g/mol; pureza $\geq 99.8\%$; estado líquido.
- **Metanol** (Sigma Aldrich) CH_3OH ; peso molecular: 32.04 g/mol; pureza $\geq 99.8\%$; estado líquido.
- **Etanol** (Sigma Aldrich) CH_3CH_2OH ; peso molecular: 46.07 g/mol; pureza $\geq 96\%$; estado líquido.
- **Cloroformo** (Sigma Aldrich) $CHCl_3$; peso molecular: 119.38 g/mol; pureza $\geq 99.8\%$; estado líquido.

- **Tolueno** (Sigma Aldrich) $C_6H_5CH_3$; peso molecular: 92.14 g/mol; pureza $\geq 99.8\%$; estado líquido.
- **Cloruro de Europio (III) hidratado** (Alfa Aesar) $EuCl_3 \cdot xH_2O$; peso molecular: 258.32 g/mol; pureza $\geq 99.99\%$; estado sólido.

Las muestras fueron obtenidas al disolver *Trp* o $EuCl_3$ con los respectivos disolventes en las proporciones adecuadas para obtener las concentraciones deseadas. Sabiendo que

$$\text{Molaridad (M)} = \frac{\# \text{ moles de soluto (n)}}{\text{litros de solución (l)}}, \quad (3.2)$$

donde

$$n = \frac{\text{masa de soluto (m)}}{\text{peso de soluto (w)}}. \quad (3.3)$$

Las muestras de cloruro de Europio (III) y *Trp* en agua fueron obtenidas al disolver primero cloruro de Europio en agua desionizada, y a partir de esta disolución se prepararon otras disoluciones agregando *Trp* en diferentes proporciones.

Los espectros de absorción se midieron con el espectrofotómetro UV-Vis-NIR modelo Agilent Cary 5000, a temperatura ambiente en celdas de cuarzo de 3.5 ml, recorriendo longitudes de onda (λ) en el rango de 200 - 400 nm. Los espectros de excitación y emisión se midieron con el espectrofluorómetro Horiba Jobin-Yvon modelo Nanolog, utilizando como fuente de luz una lámpara de Xenón monocromada. En la detección se utilizó un fotomultiplicador de Silicio acoplado a un monocromador de emisión, las soluciones a medir se colocaron en las mismas celdas de cuarzo. Los dos equipos mencionados se encuentran en Laboratorio Central del IFUAP.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

4.1. Confórmeros de Triptófano

Teniendo en cuenta que existen diferentes confórmeros de *Trp*, para los cuales su estabilidad depende del entorno local en el que se encuentre, en este trabajo, se tomaron como referencia seis confórmeros en su estado neutro, reportados como los más estables por Huang et al. y Hurtado et al. [24, 26]. De forma análoga, se consideraron las seis estructuras zwitteriónicas esperadas, reportadas por Hurtado et al. [24]. Las Figs. 4.1 y 4.2 muestran las geometrías optimizadas al nivel B3LYP/6-31+G(d,p) de los confórmeros de *Trp* en agua, modelada de forma implícita (PCM) en su forma neutra y zwitteriónica, respectivamente.

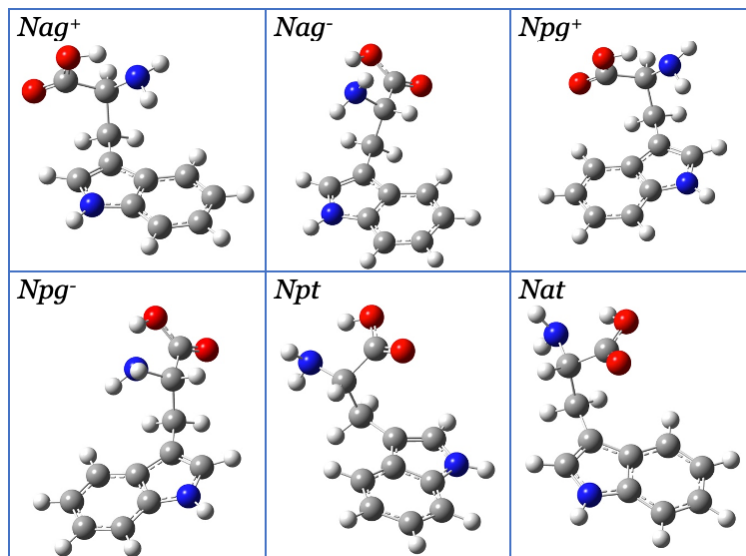


Figura 4.1: Geometrías optimizadas de las estructuras neutras de *Trp* en solución de agua (PCM).

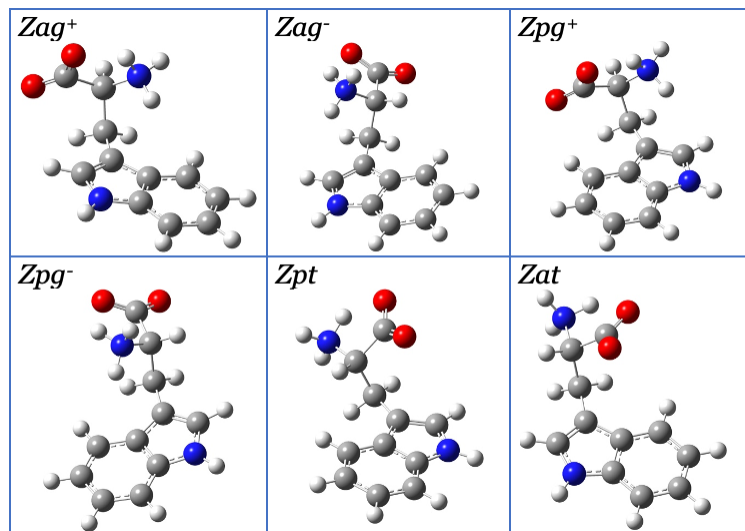


Figura 4.2: Geometrías optimizadas de las estructuras zwitteriónicas de *Trp* en solución de agua (PCM).

La energía absoluta de las estructuras mostradas en las Figs. 4.1 y 4.2 obtenidas al nivel B3LYP/6-31+G(d,p) se describen en la Tabla 4.1, la cual incluye también la energía absoluta de un cálculo de punto fijo al nivel MP2/aug//B3LYP/6-31+G(d,p) para tener una idea más precisa de las estructuras neutras y zwitteriónicas de *Trp* más estables en agua. Como se aprecia en la Tabla 4.1, son más estables las estructuras de *Trp* neutras en agua modelada con PCM. Al nivel B3LYP la estructura más estable es *Nag*⁻, mientras que al nivel MP2 es *Npg*⁺.

Para tener un estudio más completo de las estructuras de *Trp* mostradas anteriormente, la Tabla 4.2 describe las energías absolutas en estado gaseoso, sin considerar ningún solvente. En este caso, también son más estables las estructuras neutras, de hecho algunas estructuras zwitteriónicas como *Zag*⁺, *Zpg*⁻ y *Zat* no son estables, pues al ser optimizadas regresan a su forma neutra. Entonces, la estructura más estable en estado gaseoso al nivel B3LYP y MP2 es *Nag*⁺.

Recordando que en agua la estructura más estable es la zwitteriónica, debido a su polaridad, y que para el modelado son necesarias mínimo nueve moléculas de agua para estabilizar el zwitterión [21], es importante tener en cuenta que la estructura de *Trp* más estable para este sistema puede ser diferente a los casos anteriormente mencionados. En este sentido, es apropiado tomar como punto de partida los clusters de *Trp*-agua propuestos por Hurtado et al. [24], los cuales consideran ocho moléculas de agua circundantes a cada estructura zwitteriónica de *Trp*. La Tabla 4.3 muestra las energías absolutas de los clusters calculadas para las cinco estructuras más estables. Se puede observar que al nivel B3LYP y MP2 la estructura más estable es *Zpt*, de forma que este conformero es un buen punto de partida para la construcción de los clusters que modelan la concentración de *Trp* en agua.

Estructura	Energía (B3LYP)	Energía (MP2)
Nag^+	-686.4382089	-684.545481
Nag^-	-686.4395251	-684.5454635
Npg^+	-686.4384174	-684.5458573
Npg^-	-686.437652	-684.542487
Npt	-686.436600	-684.542399
Nat	-686.435386	-684.541481
Zag^+	-686.4369373	-684.5445567
Zag^-	-686.438607	-684.5444061
Zpg^+	-686.4375343	-684.545599
Zpg^-	-686.436656	-684.5428483
Zpt	-686.433954	-684.5396231
Zat	-686.432838	-684.538804

Tabla 4.1: Energías electrónicas absolutas de las estructuras neutras y zwitteriónicas de *Trp* en solución de agua (PCM), medidas en Hartrees y calculadas al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).

Estructura	Energía (B3LYP)	Energía (MP2)
Nag^+	-686.4205405	-684.5293973
Nag^-	-686.4199168	-684.5274954
Npg^+	-686.4187124	-684.527419
Npg^-	-686.418037	-684.524390
Npt	-686.415076	-684.522318
Nat	-686.412497	-684.520524
Zag^+	—	—
Zag^-	-686.418607	-684.5274961
Zpg^+	-686.3918381	-684.5017231
Zpg^-	—	—
Zpt	-686.3829922	-684.4901862
Zat	—	—

Tabla 4.2: Energías electrónicas absolutas de las estructuras neutras y zwitteriónicas de *Trp* en estado gaseoso, medidas en Hartrees y calculadas al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).

Es preciso mencionar que las energías calculadas en este trabajo, presentadas en las Tablas 4.1, 4.2 y 4.3 son muy cercanas a las reportadas por Hurtado et al. [24] con una diferencia de 0.01 Hartrees en promedio.

Estructura	Energía (B3LYP)	Energía (MP2)
$Zag^+ - 8(H_2O)$	-1298.0282755	-1294.7602547
$Zag^- - 8(H_2O)$	-1298.031838	-1294.7671209
$Zpg^+ - 8(H_2O)$	-1298.0182948	-1294.7519446
$Zpg^- - 8(H_2O)$	-1298.022099	-1294.7580352
$Zpt - 8(H_2O)$	-1298.03229	-1294.7708921

Tabla 4.3: Energías electrónicas absolutas medidas en Hartrees de las estructuras zwitteriónicas de *Trp* más estables, cada una con 8 moléculas de agua circundantes. Los cálculos se realizaron al nivel B3LYP/6-311+G(d,p) y MP2/aug-cc-pVDZ//B3LYP/6-311+G(d,p).

4.2. Absorción y emisión del *Trp* en estado gaseoso

Dado que el conformero más estable en estado gaseoso es Nag^+ , a continuación en la Fig. 4.3 se presentan los espectros de AO calculados para las geometrías optimizadas del estado fundamental al nivel PM6 y B3LYP/6-31+G(d,p), usando el método TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p).

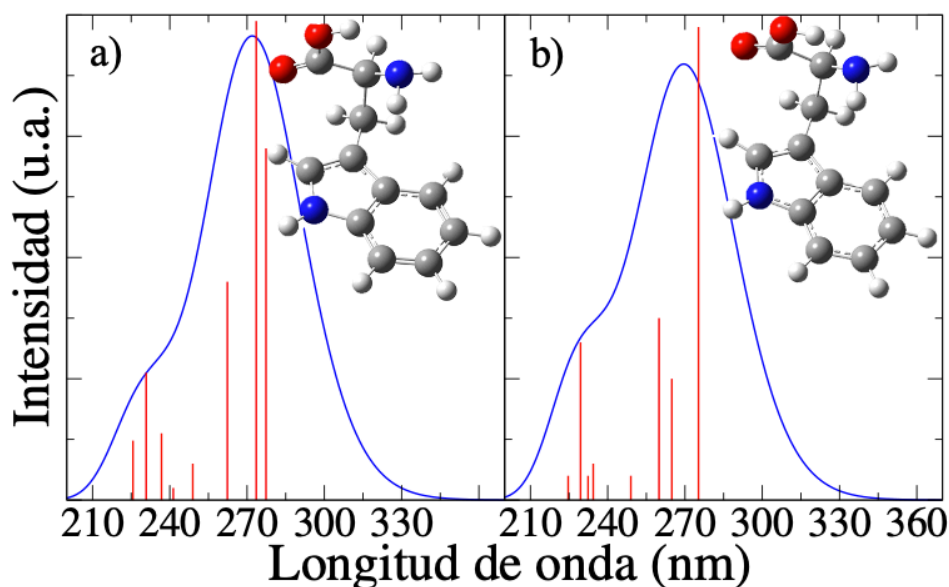


Figura 4.3: Espectro de absorción óptica del conformero Nag^+ optimizado al nivel a) PM6 y b) B3LYP/6-31+G(d,p). Las líneas rojas representan los estados excitados calculados, su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador. Usando PM6 el estado más fuerte se localiza a $\lambda = 273.56$ nm y con B3LYP/6-31+G(d,p) el estado más fuerte se localiza a $\lambda = 275.22$ nm.

La comparación de los espectros presentados en la Fig. 4.3 muestran un comportamiento muy similar en la curva envolvente de la absorción del conformero Nag^+ optimizado a dos niveles diferentes. De manera que la optimización al nivel PM6 permite obtener resultados espectroscópicos confiables. La Tabla 4.4 muestra los valores de las primeras frecuencias de vibración de ambas geometrías, las cuales garantizan que la estructura representa un mínimo local y no un punto de transición.

Frecuencias (PM6)	Frecuencias (B3LYP)
201.07	223.76
254.44	300.10
280.80	317.91
306.80	331.74
332.84	364.29

Tabla 4.4: Frecuencias de vibración de las geometrías Nag^+ optimizadas al nivel PM6 y B3LYP/6-31+G(d,p).

La Fig. 4.4 presenta los orbitales involucrados en las principales transiciones de los estados excitados S_1 , S_2 y S_3 . Los orbitales ocupados son de tipo π , mientras que el primer orbital ocupado es de tipo π^* y el segundo desocupado es de tipo σ^* . Comparando cada orbital de a) y b) se puede observar que tienen contribuciones equivalentes y las energías de excitación para los tres estados mostrados son muy cercanas. Aunque, la fuerza de oscilador de cada estado excitado, la cual es proporcional a la intensidad de las líneas rojas de la Fig. 4.3, presenta notables diferencias.

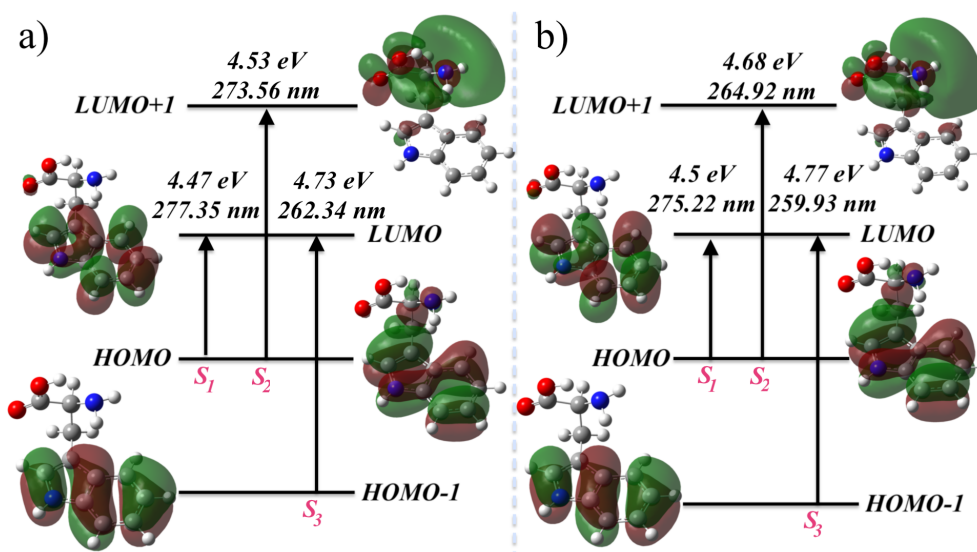


Figura 4.4: Orbitales moleculares involucrados en las primeras tres transiciones electrónicas para el conformero Nag^+ optimizado al nivel a) PM6 y b) B3LYP/6-31+G(d,p).

Vale la pena resaltar en esta sección, que la principal transición en la absorción del *Trp* en estado gaseoso ocurre en $\lambda = 273.56$ nm y $\lambda = 275.22$ nm para la estructura *Nag*⁺ optimizada al nivel PM6 y B3LYP/6-31+G(d,p), respectivamente. Ahora bien, para calcular el estado excitado emisor es necesario optimizar la geometría del estado fundamental (EF) y del estado excitado (EE) al mismo nivel de cálculo, que para este trabajo es B3LYP/6-31+G(d,p). Por lo tanto, en estado gaseoso la fluorescencia ocurre mediante el proceso que se representa en la Fig. 4.5, donde se observa que la emisión ocurre a $\lambda = 329.46$ nm.

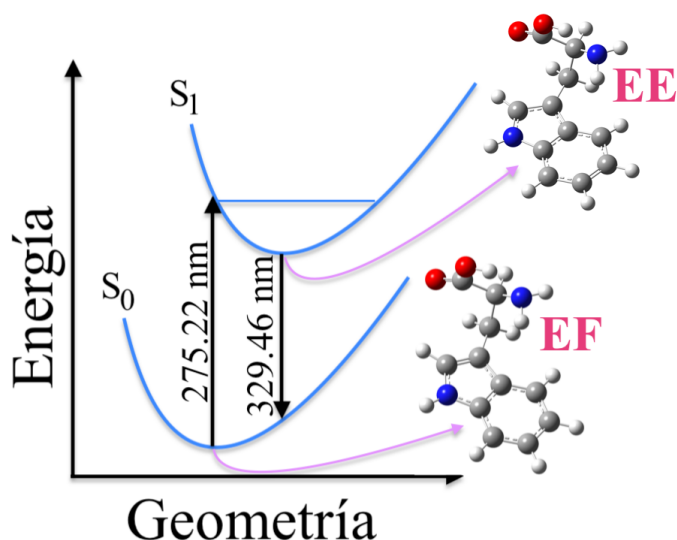


Figura 4.5: Diagrama representativo del proceso de fluorescencia del *Trp* en estado gaseoso con el conformero *Nag*⁺. Se incluyen las estructuras geométricas optimizadas del estado fundamental (EF) y del estado excitado (EE).

4.3. Transferencia de protones del *Trp* mediada por el agua y su efecto a la absorción óptica

La transferencia de protones es un proceso químico que ocurre generalmente en aminoácidos, los cuales pueden cambiar su estado de protonación dependiendo del entorno en el que se encuentren. Normalmente, la estructura neutra prevalece en fase gaseosa y la estructura zwitteriónica sobresale en soluciones polares y estructuras cristalinas.

Debido a que el agua es un disolvente polar al igual que el aminoácido *Trp*, al diluir estos compuestos se genera un mecanismo de reacción de transferencia de protones

entre el grupo carboxilo y amino del *Trp*, la cual puede ocurrir de forma directa o mediada por la presencia de una molécula de agua.

Como se mencionó en la sección 4.1 el conformero más estable en agua usando PCM es Npg^+ al nivel MP2. Por lo tanto, se empleó este conformero para estudiar las reacciones intramoleculares causadas por el agua, usando modelos de solvatación continuo y discreto.

4.3.1. Reacción de transferencia de protones con PCM

Al construir el sistema de un *Trp* en agua, usando un modelo continuo (PCM), la transferencia de protones ocurre de forma directa entre dos grupos funcionales, en el caso del *Trp* sucede desde el grupo carboxilo al grupo amino, dando lugar a su estructura neutra o zwitteriónica. Ahora bien, en este caso el parámetro de la coordenada de reacción por el cual ocurre la transferencia de un protón es la longitud de enlace entre el átomo de hidrógeno (H) y el átomo de oxígeno (O) del grupo carboxilo, o entre el átomo de H y el átomo de nitrógeno (N) del grupo amino, como se muestra en la Fig. 4.6. Para este caso, se puede notar que la energía relativa de la estructura de *Trp* en su forma neutra es menor (0 KCal/Mol) comparada con la del zwitterión (0.55 KCal/Mol). Además, el punto donde ocurre la transición tiene una energía relativa máxima de 3.41 KCal/Mol.

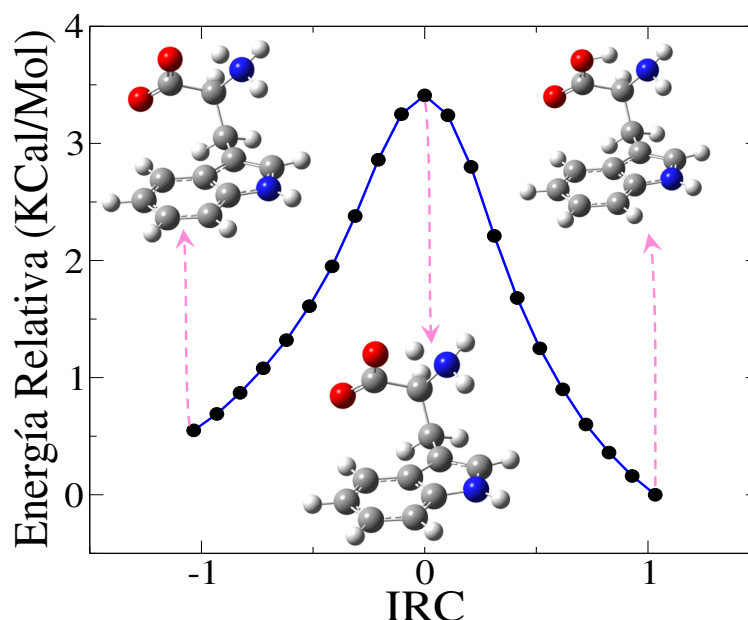


Figura 4.6: Energía relativa en función de la coordenada de reacción intrínseca (IRC) para *Trp* en agua modelada con PCM.

Debido a que el propósito de este trabajo es estudiar las propiedades espectroscópicas del *Trp* en diferentes solventes, es conveniente estudiar el espectro de absorción

en diversas situaciones para entender mejor su comportamiento. En este sentido, se presenta el espectro calculado de AO en la Fig. 4.7 de las estructuras neutra y zwitteriónica, respectivamente. La transición electrónica más fuerte (por fuerza de oscilador) para ambas estructuras se localiza en $\lambda = 267.88$ nm y $\lambda = 267.94$ nm para Npg^+ y Zpg^+ , respectivamente. Aunque, la estructura zwitteriónica propicia la aparición de estados excitados alrededor de $\lambda = 300$ nm, mientras que la estructura neutra propicia transiciones electrónicas con menor energía.

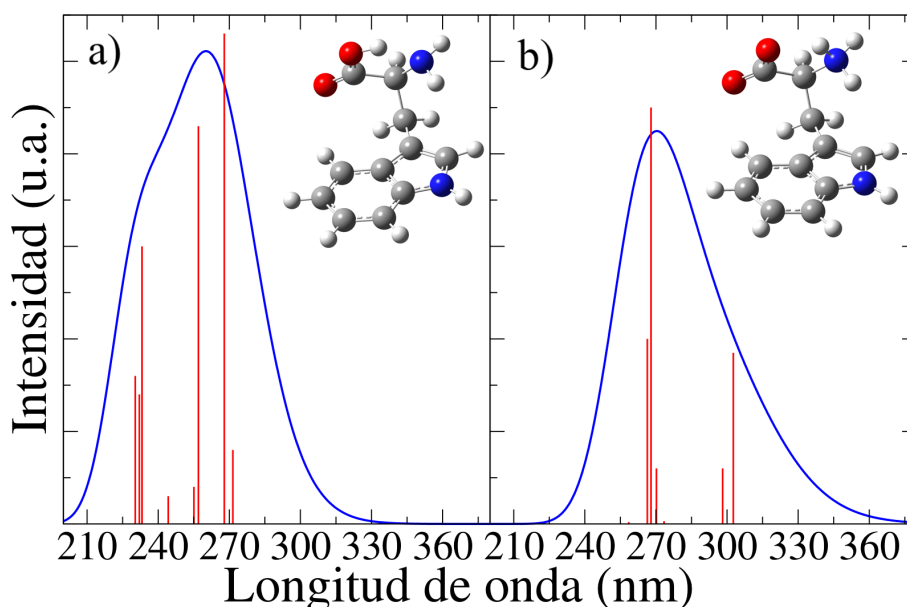


Figura 4.7: Espectro de absorción óptica del conformero a) Npg^+ y b) Zpg^+ en agua con PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados y su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador de cada estado.

Los orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas de menor energía de las estructuras Npg^+ y Zpg^+ se muestran en las Figs. 4.8 y 4.9, respectivamente. Para la estructura neutra, la transición más fuerte muestra que la participación de los orbitales es muy similar a los orbitales en estado gaseoso (ver Fig. 4.4), y son de tipo $\pi \rightarrow \sigma^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. Por otro lado, en los orbitales moleculares de la estructura zwitteriónica participa, además del grupo indol, la cadena lateral. En general, las transiciones son de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Otro aspecto a resaltar de este sistema es que la estructura zwitteriónica genera transiciones electrónicas de menor energía o mayor longitud de onda, tales como $\lambda = 302.65$ nm (HOMO $\rightarrow$ LUMO), $\lambda = 298.13$ nm (HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO) y $\lambda = 278.41$ nm (HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+1).

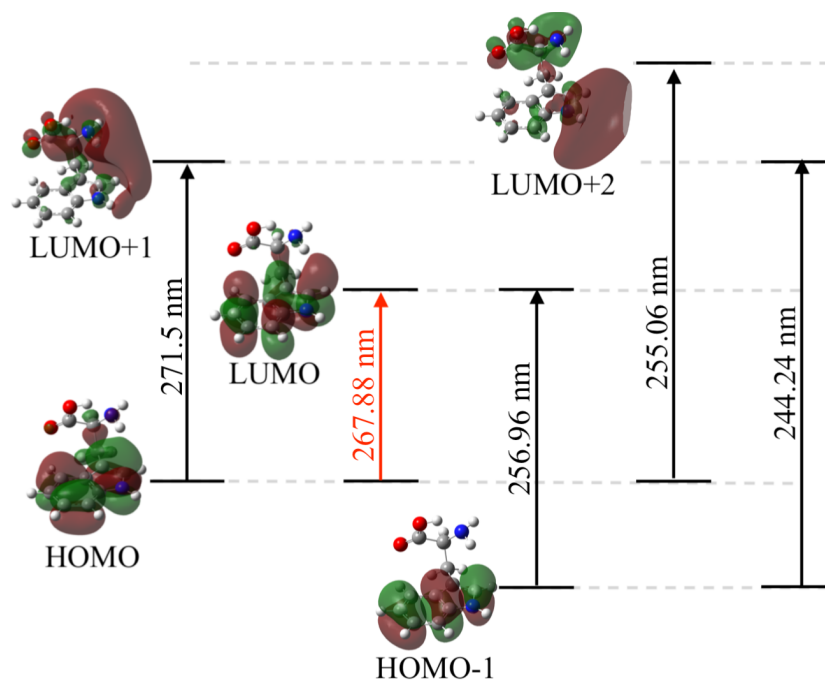


Figura 4.8: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Npg^+ . La transición en rojo es la que tiene mayor fuerza de oscilador del sistema.

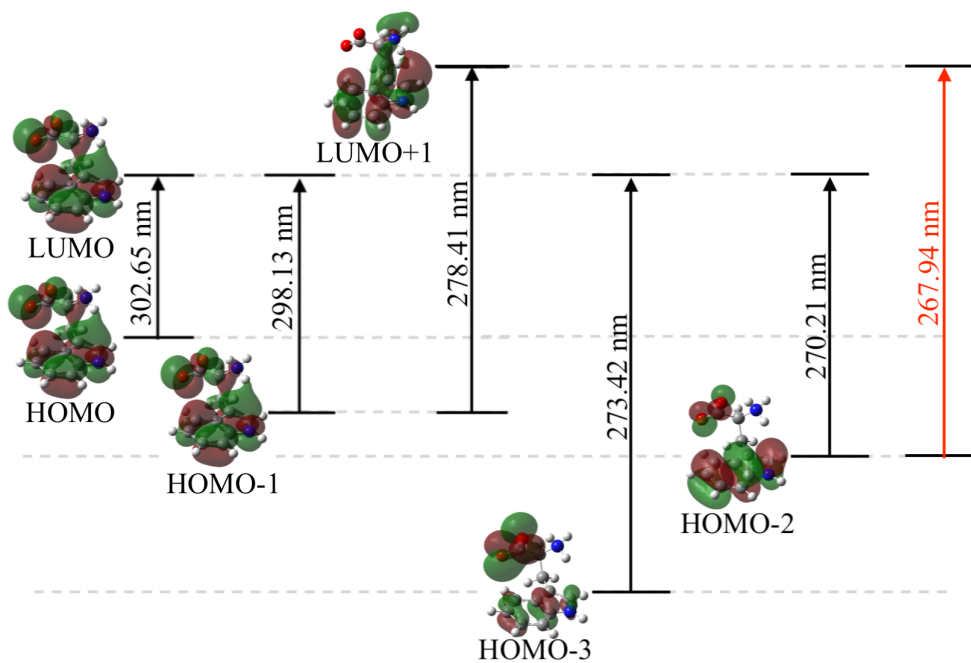


Figura 4.9: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura zwitteriónica, Zpg^+ . La transición en rojo es la que tiene mayor fuerza de oscilador del sistema.

4.3.2. Reacción de transferencia de protones con una molécula de agua

Cuando la molécula de *Trp* tiene la posibilidad de interaccionar con moléculas de agua explícitas, la transferencia de protones es mediada por los átomos de hidrógeno de la molécula de agua, así un protón del grupo carboxilo del *Trp* se transfiere a la molécula de agua y un protón del agua se transfiere al grupo amino del *Trp*. Igual al caso anterior, la coordenada de reacción que permite la transferencia de un protón es la longitud de enlace entre el átomo de H del grupo carboxilo y el átomo de O del agua, paralelamente a la longitud de enlace entre un átomo de H del agua y el átomo de N del grupo amino, como se muestra en la Fig. 4.10. Aquí, de nuevo la energía relativa para la estructura neutra de *Trp* es menor (0 KCal/Mol) que la estructura zwitteriónica (5.99 KCal/Mol), y el estado de transición ocurre con una energía relativa máxima de 7.65 KCal/Mol.

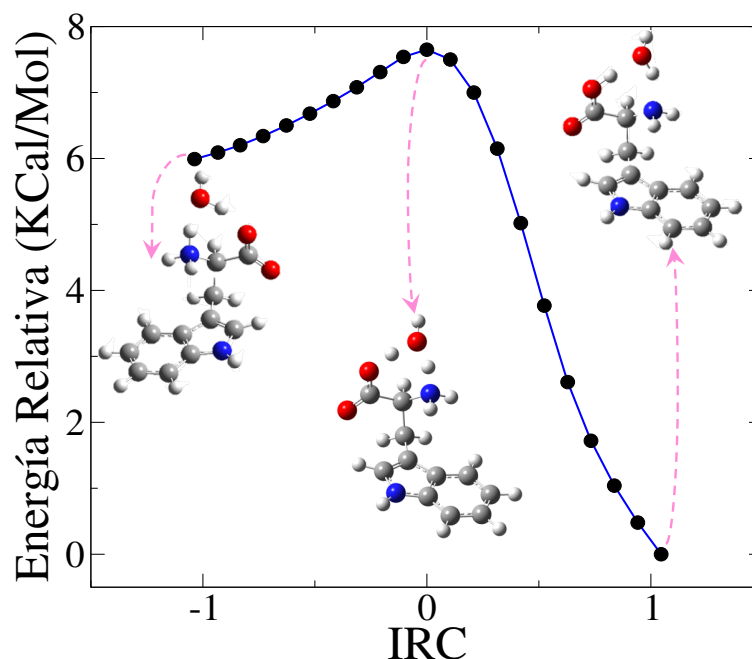


Figura 4.10: Energía relativa en función de la coordenada de reacción intrínseca (IRC) para *Trp* con una molécula de agua explícita.

Los espectros de AO de las estructuras en su forma neutra y zwitteriónica con una molécula de agua, se presentan en la Fig 4.11. La transición electrónica con la fuerza de oscilador mayor se localiza en $\lambda = 267.14$ nm y $\lambda = 266.18$ nm para Npg^+ y Zpg^+ , respectivamente. Sin embargo, el primer estado excitado presenta un leve corrimiento al rojo, de $\lambda = 281.16$ a $\lambda = 290.91$ nm, de la estructura neutra a la zwitteriónica.

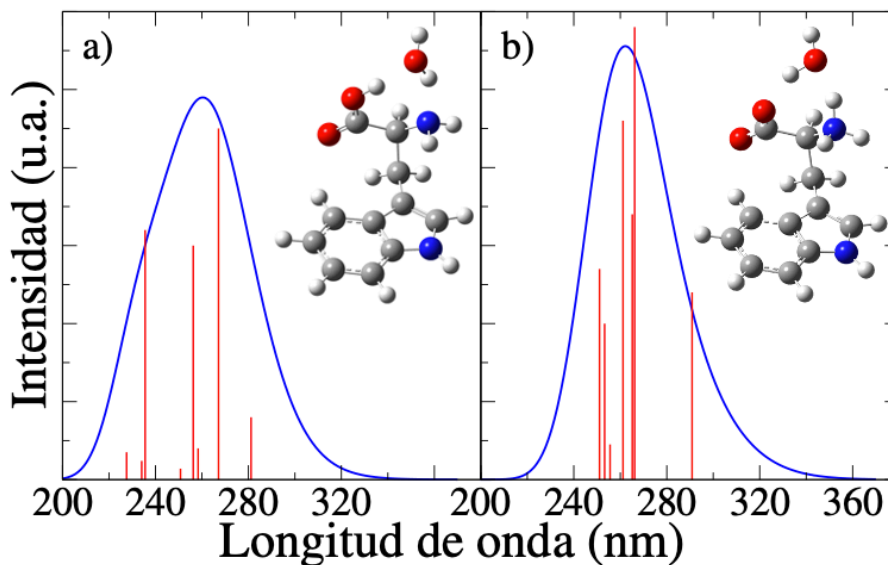


Figura 4.11: Espectro de AO del conformero a) Npg^+ y b) Zpg^+ con una molécula de agua. Las líneas rojas representan los estados excitados y su intensidad es proporcional a la fuerza de oscilador de cada estado.

En las Figs. 4.12 y 4.13 se presentan los orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas de menor energía de las estructuras Npg^+ y Zpg^+ con una molécula de agua, respectivamente. Comparando el estado excitado de mayor fuerza de oscilador de ambas estructuras con una molécula de agua y el caso anterior, se sigue localizando alrededor de $\lambda = 267$ nm, cuya contribución es principalmente del grupo indol y los orbitales son de tipo $\pi\pi^*$. Sin embargo, la inclusión de la molécula de agua genera que los orbitales desocupados sean de tipo σ^* .

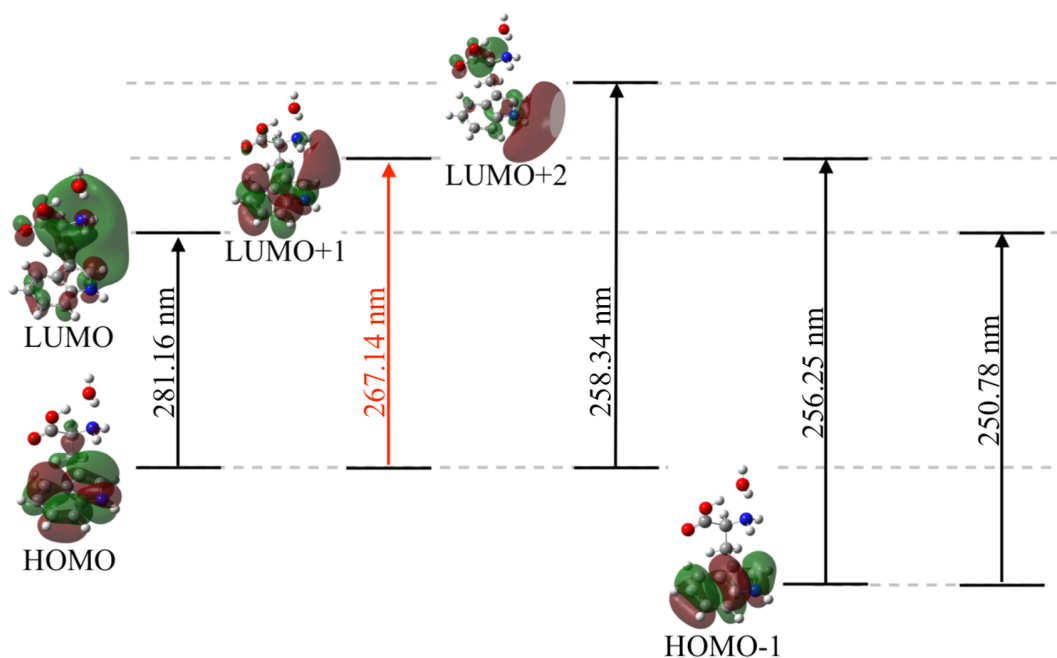


Figura 4.12: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Npg^+ , y una molécula de agua. La transición en rojo es la más fuerte del sistema.

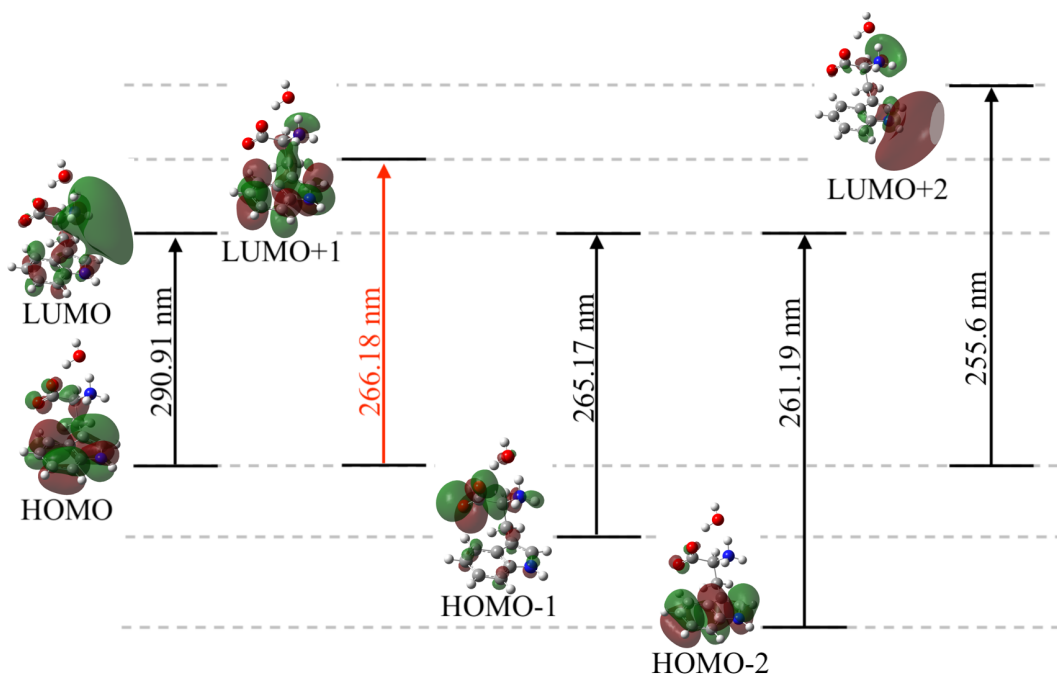


Figura 4.13: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura neutra, Zpg^+ , y una molécula de agua. La transición en rojo es la más fuerte del sistema.

4.4. Propiedades luminiscentes del Triptófano en agua

4.4.1. Análisis experimental

Experimentalmente, se midieron los espectros de absorción y excitación para 10 soluciones de *Trp* en agua concentradas a 0.01, 0.05, 0.07, 0.09, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mM. Ambos espectros se comparan en cada solución y se muestran en la Fig. 4.14. Para las soluciones concentradas en el rango de 0.01 a 0.09 mM se observa un máximo en la banda de excitación que se localiza en $\lambda = 278$ nm, y además este espectro coincide muy bien con el espectro de absorción. Sin embargo, para soluciones más concentradas en el rango de 0.5 a 10 mM, el espectro de absorción difiere del espectro de excitación, pues este último sufre un corrimiento al rojo debido al aumento de la concentración, el cual ocurre desde $\lambda = 278$ nm a $\lambda = 305$ nm, para la concentración más alta. Vale la pena mencionar que las bandas de los espectros de excitación tienen valores de longitudes de onda (λ_{ex}) contenidas en los espectros de absorción, aun así excitar las respectivas soluciones a estas longitudes de onda genera su máxima emisión, respectivamente.

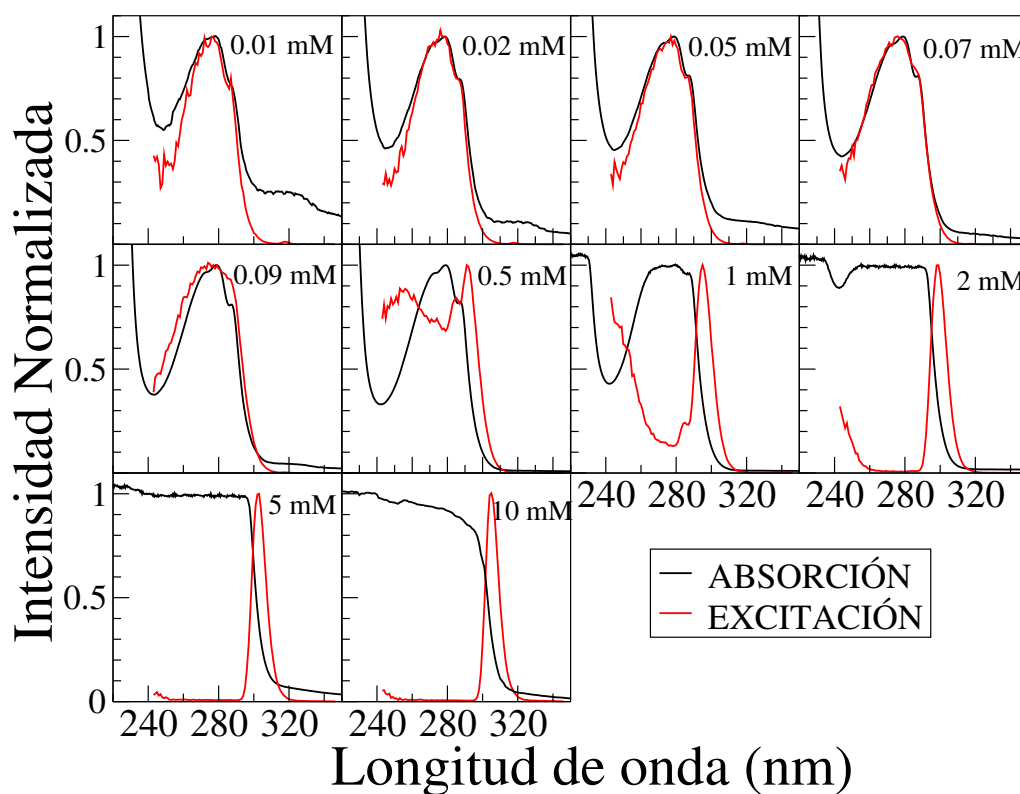


Figura 4.14: Comparación entre los espectros de absorción (color negro) y excitación (color rojo) para diferentes concentraciones de *Trp* en agua. Para cada espectro de excitación, $\lambda_{em}=357$ nm.

El espectro de emisión de las diez soluciones de *Trp* en agua preparadas se muestra en la Fig. 4.15. La longitud de onda de excitación fué $\lambda_{ex}=278$ nm para las concentraciones más bajas, desde 0.01 hasta 0.09 mM, ya que el máximo del espectro de excitación se localizaba a esta longitud de onda (ver Fig. 4.14). A partir de 0.5 mM hasta 10 mM, los espectros de excitación sufren un corrimiento al rojo, por lo tanto las longitudes de onda de excitación ahora son $\lambda_{ex}=292$ nm para 0.5 mM, $\lambda_{ex}=295$ nm para 1 mM, $\lambda_{ex}=299$ nm para 2 mM, $\lambda_{ex}=303$ nm para 5 mM y $\lambda_{ex}=305$ nm para 10 mM. Como se observa, la banda de emisión de todas las soluciones se localiza en $\lambda = 357$ nm y su intensidad aumenta con la concentración de *Trp* en agua, aunque la curva de emisión para los casos de 5 y 10 mM se superpone.

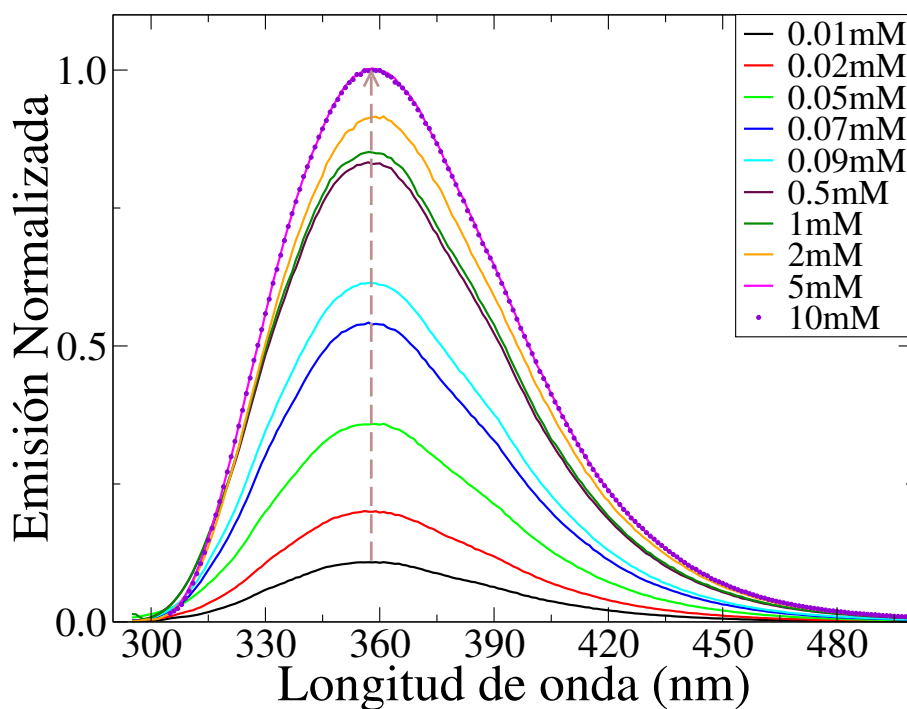


Figura 4.15: Espectro de emisión normalizado a partir del espectro de máxima excitación, para diez soluciones de *Trp* en agua a diferentes concentraciones, el máximo de la banda de emisión de todas las soluciones coincide en $\lambda_{em}=357$ nm.

La fluorescencia del *Trp* a $\lambda = 357$ nm fue analizada en función del incremento de la concentración en la Fig. 4.16. La saturación de la intensidad de emisión en función de la concentración observada, se puede describir a través del ajuste:

$$F = \frac{-1,0176}{1 + 17,2077Q} + 0,963726, \quad (4.1)$$

donde Q es la concentración de *Trp*, y el coeficiente de correlación (R^2) es de 0.992030. Estos resultados serán comparados más adelante cuando se considera también Eu^{3+} en las soluciones.

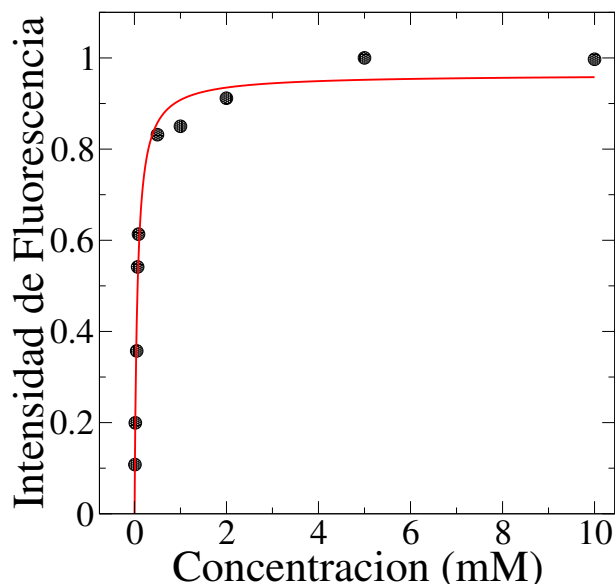


Figura 4.16: Intensidad de emisión en $\lambda_{em} = 357$ nm en función de la concentración de *Trp* en agua.

4.4.2. Análisis teórico

Recordando que la estructura zwitteriónica del *Trp* es la más estable en agua, debido a la polaridad del solvente, y la forma de garantizar su estabilidad es a través de nueve moléculas de agua circundantes. Además, el conformero con menor energía es *Zpt* con ocho moléculas de agua según Hurtado et al. [24], como se observa en la Tabla 4.3. Es razonable pensar que experimentalmente las soluciones de *Trp* están compuestas por una combinación de diferentes conformeros que individualmente contribuyen a la fluorescencia. Por lo tanto, se consideró también el conformero *Zag*⁺ que representa la estructura zwitteriónica con un mínimo local en energía, en fase gaseosa.

Partiendo de los clusters propuestos en la sección con los conformeros *Zpt* y *Zag*⁺, se empleó el método TD-DFT para calcular los espectros de AO y sus respectivos estados excitados electrónicos. Las Figs. 4.17 y 4.18 muestran dichos espectros, se puede notar que la envolvente de la absorción de los clusters con *Zpt* y *Zag*⁺ se encuentra en la vecindad de $\lambda = 278$ nm, y además que la intensidad aumenta a medida que son incluidas más moléculas de *Trp* que pueden interaccionar. Comparando las transiciones electrónicas generadas para el cluster más pequeño y el más grande, se puede notar un corrimiento al rojo de dichas transiciones, propiciado por las interacciones entre moléculas de *Trp* cercanas. Este comportamiento es análogo al ocurrido en los espectros de excitación cuando aumenta la concentración de *Trp* (ver Fig. 4.14). En particular, para el cluster más pequeño (Fig. 4.17a), con el conformero más estable *Zpt*, la transición más fuerte ocurre aproximadamente a $\lambda = 280$ nm, luego en el tercer cluster (Fig. 4.17c) se obtienen transiciones alrededor de $\lambda = 288$ nm; y en el

cluster más grande (Fig. 4.17d) el primer estado excitado aparece en alrededor de $\lambda = 301$ nm.

Para el conformero Zag^+ el desplazamiento al rojo de las líneas de transición es menor, pero aún evidente. Desde aproximadamente $\lambda = 278$ nm para el cluster más pequeño (Fig. 4.18a) hasta aproximadamente $\lambda = 295$ nm (Fig. 4.18d) para el cluster más grande.

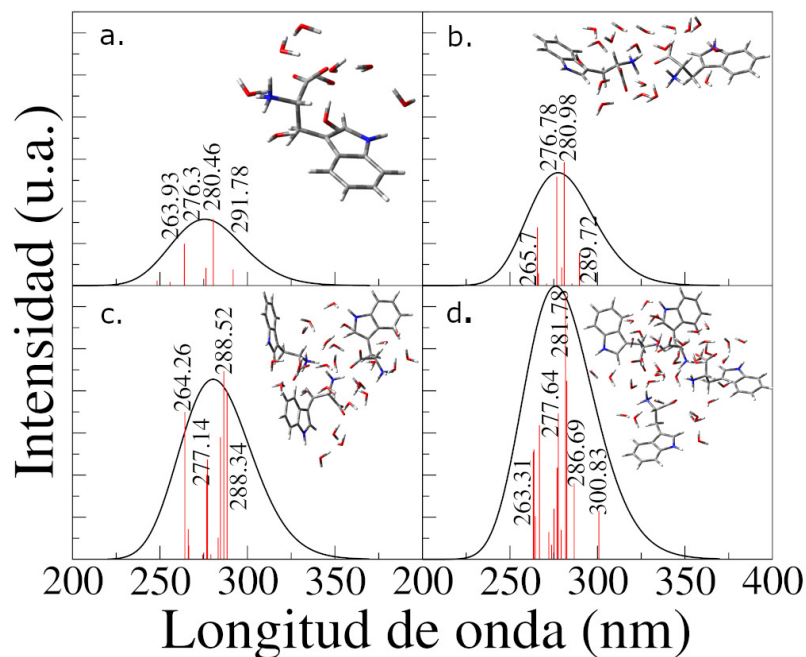


Figura 4.17: Espectro de AO calculado para el conformero Zpt en los clusters modelados. (a.) $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, (b.) $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, (c.) $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y (d.) $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$.

Es conveniente mencionar que los espectros de excitación se relacionan directamente con los espectros de emisión, de manera que los espectros de excitación muestran las bandas de absorción necesarias para emitir fotones de una energía específica, mientras que los espectros de AO indican las longitudes de onda donde el sistema absorbe luz, independiente de la emisión, pues solo es una relación entre la intensidad de la luz incidente y transmitida. En algunos casos, los espectros de excitación coinciden con los de absorción, tal como se observa en la Fig. 4.14 para concentraciones menores e iguales a 0.07 mM, en otros casos no coinciden como ocurre para concentraciones superiores a 0.09 mM. Así que, en este trabajo es pertinente comparar los espectros de excitación con las transiciones electrónicas inmersas en los espectros de AO teóricos, entendiendo que los primeros son el subconjunto más representativo para el presente estudio, que los segundos. En este sentido, la Fig. 4.19 muestra dicha comparación de los espectros de excitación de la concentración más baja y la de 2 mM con los estados excitados S_2 y S_1 del cluster más pequeño y más grande con Zpt , respectivamente. Las longitudes de onda de los estados S_2 y S_1 se aproximan muy bien a las bandas

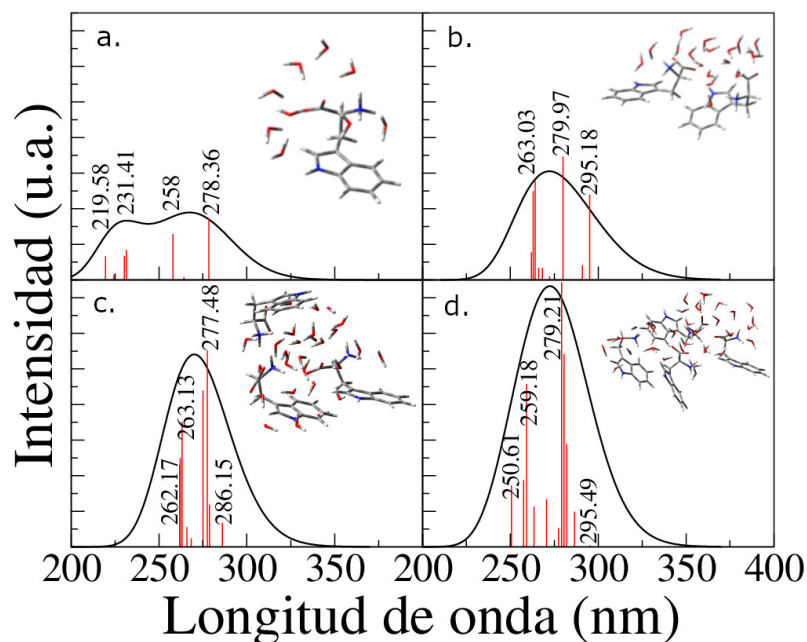


Figura 4.18: Espectro de AO calculado para el conformero Zag^+ en los clusters modelados. (a.) $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, (b.) $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, (c.) $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y (d.) $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$.

de los espectros de excitación de las concentraciones 0.01 y 2 mM, respectivamente. Específicamente, para la concentración más baja la banda se localiza a $\lambda = 278$ nm y la excitación S_2 del cluster más pequeño se encuentra cerca de 280 nm. Para la concentración de 2 mM, la banda de excitación se localiza a $\lambda = 299$ nm y para el cluster más grande el estado excitado S_1 se encuentra a 301 nm. Esta comparación, permite afirmar que los modelos teóricos propuestos en este trabajo, proporcionan resultados acertados.

En la Tabla 4.5 se presentan detalles de los estados excitados más representativos, obtenidos con TD-DFT para los cuatro clusters modelados con el conformero Zpt . Dado que las interacciones intramoleculares aumentan a medida que aumentan las moléculas de cada cluster, es necesario calcular cada vez más estados excitados, los cuales muestran contribuciones significativas a la absorción, las cuales se reflejan a través de sus valores de fuerza de oscilador, f . Además, algunos orbitales moleculares que contribuyen a las transiciones de los estados excitados se muestran en las Figs. 4.20 y 4.21.

Para el cluster más pequeño, el estado excitado S_2 tiene la mayor fuerza de oscilador, su transición se señala en color rojo en la Fig. 4.20 y es de tipo $\pi \rightarrow \sigma^*$, donde la carga se transfiere del grupo indol a la cadena lateral del *Trp* y todas las moléculas de agua circundantes. En contraste con las transiciones L_a y L_b características del *Trp*, cuyas contribuciones en estado gaseoso son HOMO $\rightarrow$ LUMO y HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO+1 para L_a ; y para L_b HOMO $\rightarrow$ LUMO+1 con HOMO-1 $\rightarrow$ LUMO,

Tabla 4.5: Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los cuatro clusters con el conformero Z_{pt} , respectivamente.

Cluster	Estado	Excitación de un electrón	Composición	E (eV) (λ (nm))	f
$(Trp)_1 - (H_2O)_9$	S_1	76.57 %	H $\rightarrow$ L	4.25 (291.78)	0.0098
		15.92 %	H $\rightarrow$ L+2		
	S_2	49.36 %	H $\rightarrow$ L+1	4.42 (280.46)	0.0401
		28.17 %	H $\rightarrow$ L+2		
	S_3	50.79 %	H $\rightarrow$ L+2	4.49 (276.30)	0.0108
		42.40 %	H $\rightarrow$ L+1		
$(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$	S_1	57.89 %	H-1 $\rightarrow$ L	4.70 (263.93)	0.0254
		27.24 %	H $\rightarrow$ L+6		
	S_3	82.11 %	H-1 $\rightarrow$ L+1	4.28 (289.72)	0.0129
		13.55 %	H-1 $\rightarrow$ L+2		
	S_5	89.81 %	H $\rightarrow$ L+2	4.41 (280.98)	0.0491
		3.43 %	H-2 $\rightarrow$ L+11		
$(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$	S_1	78.07 %	H-1 $\rightarrow$ L+1	4.48 (276.78)	0.0429
		11.68 %	H-1 $\rightarrow$ L		
	S_8	49.41 %	H-3 $\rightarrow$ L	4.67 (265.70)	0.0231
		20.70 %	H-1 $\rightarrow$ L+9		
	S_2	81.87 %	H-2 $\rightarrow$ L	4.30 (288.34)	0.0449
		4.53 %	H-2 $\rightarrow$ L+4		
$(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	S_2	70.52 %	H-1 $\rightarrow$ L+1	4.33 (286.52)	0.0500
		19.78 %	H-1 $\rightarrow$ L		
	S_3	55.93 %	H $\rightarrow$ L+3	4.36 (284.55)	0.0323
		19.37 %	H $\rightarrow$ L		
	S_6	62.71 %	H $\rightarrow$ L+6	4.47 (277.14)	0.0263
		14.43 %	H $\rightarrow$ L+3		
$(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	S_7	52.06 %	H-2 $\rightarrow$ L+2	4.48 (276.70)	0.0239
		27.18 %	H-2 $\rightarrow$ L+5		
	S_{15}	40.72 %	H-4 $\rightarrow$ L	4.69 (264.26)	0.0391
		18.65 %	H-2 $\rightarrow$ L+13		
	S_1	64.34 %	H $\rightarrow$ L+3	4.12 (300.83)	0.0133
		24.66 %	H $\rightarrow$ L+2		
$(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	S_3	34.85 %	H-1 $\rightarrow$ L+4	4.32 (286.69)	0.0203
		24.59 %	H-1 $\rightarrow$ L		
	S_5	89.95 %	H-3 $\rightarrow$ L	4.39 (282.47)	0.0480
		82.94 %	H-2 $\rightarrow$ L+1		
	S_6	6.08 %	H-2 $\rightarrow$ L+2	4.40 (281.78)	0.0711
		86.19 %	H $\rightarrow$ L+5		
$(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	S_9	15.00 %	H $\rightarrow$ L+1	4.47 (277.64)	0.0391
		29.67 %	H-1 $\rightarrow$ L+1		
	S_{10}	18.70 %	H-1 $\rightarrow$ L+8	4.48 (276.97)	0.0249
		46.39 %	H-4 $\rightarrow$ L+3		
	S_{16}	19.56 %	H-4 $\rightarrow$ L+2	4.65 (266.86)	0.0360
		47.40 %	H-6 $\rightarrow$ L+1		
$(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$	S_{20}	10.77 %	H-6 $\rightarrow$ L+2	4.70 (263.73)	0.0296

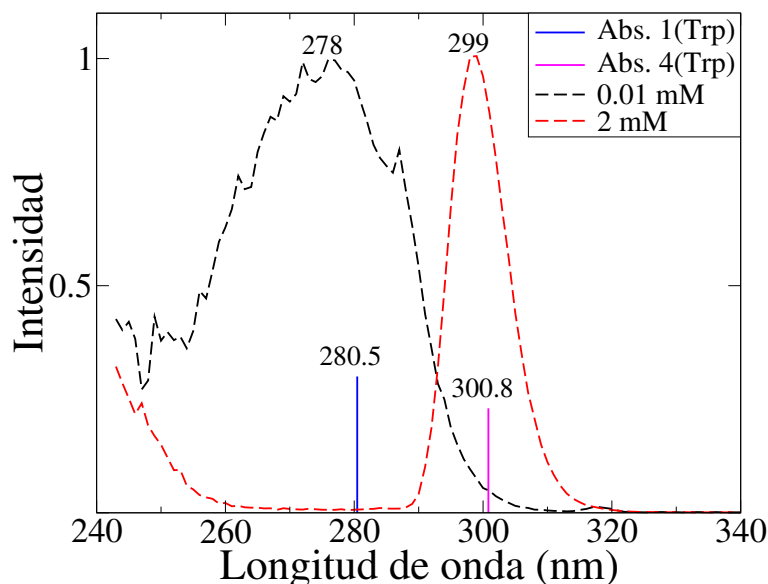


Figura 4.19: Espectros de excitación de *Trp* en agua para las concentraciones 0.01 y 2 mM, representadas por las líneas discontinuas negra y roja, respectivamente. Los estados excitados calculados para $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ son representados por las líneas azul y rosa, respectivamente.

se modifican por efecto del solvente, el cual muestra su participación principalmente en los orbitales desocupados. En este sentido, se pueden relacionar los estados S_1 y S_3 con L_a y L_b , respectivamente. Aunque, como se observa en la Tabla 4.5 son estados mezclados debido a la naturaleza del método TD-DFT/B3LYP/6-3-11G+(d,p).

En el caso del cluster $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ es el estado excitado S_3 el que tiene mayor fuerza de oscilador y se muestra en color rojo en la Fig. 4.20, su transición es de tipo $\pi_1 \rightarrow \pi_1^*$, la etiqueta 1 se refiere la primer molécula de *Trp* del cluster. La forma de los orbitales involucrados en su transición HOMO→LUMO+2 es comparable con la transición L_b en estado gaseoso, pero en este trabajo es conveniente etiquetarla como L_{b1} para referirse al primer *Trp*. De forma análoga, se identifica la transición del estado S_1 de tipo $\pi_2 \rightarrow \pi_2^*$ como L_{b2} , a pesar de la participación de las moléculas de agua en el orbital LUMO+1, pues aún es posible notar la contribución del grupo indol. Ahora bien, la transición del estado S_8 que ocurre de HOMO-3→LUMO es de tipo $\pi_1 \rightarrow \pi_2^*$, la cual hace evidente la transferencia de carga entre las dos moléculas de *Trp* del cluster.

Respecto al cluster $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$, el estado excitado con mayor fuerza de oscilador S_2 ocurre a $\lambda = 286$ nm, aproximadamente en 5 nm más del estado excitado más fuerte del segundo cluster, y 6 nm más estado excitado más fuerte del cluster más pequeño. Este caso se hace evidente el corrimiento al rojo observado experimentalmente en los espectros de excitación debido a la concentración. Los orbitales moleculares para el tercer cluster, también se muestran en la Fig. 4.20 que son de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. Sin embargo, algunos orbitales muestran contribuciones no sólo de moléculas de *Trp*

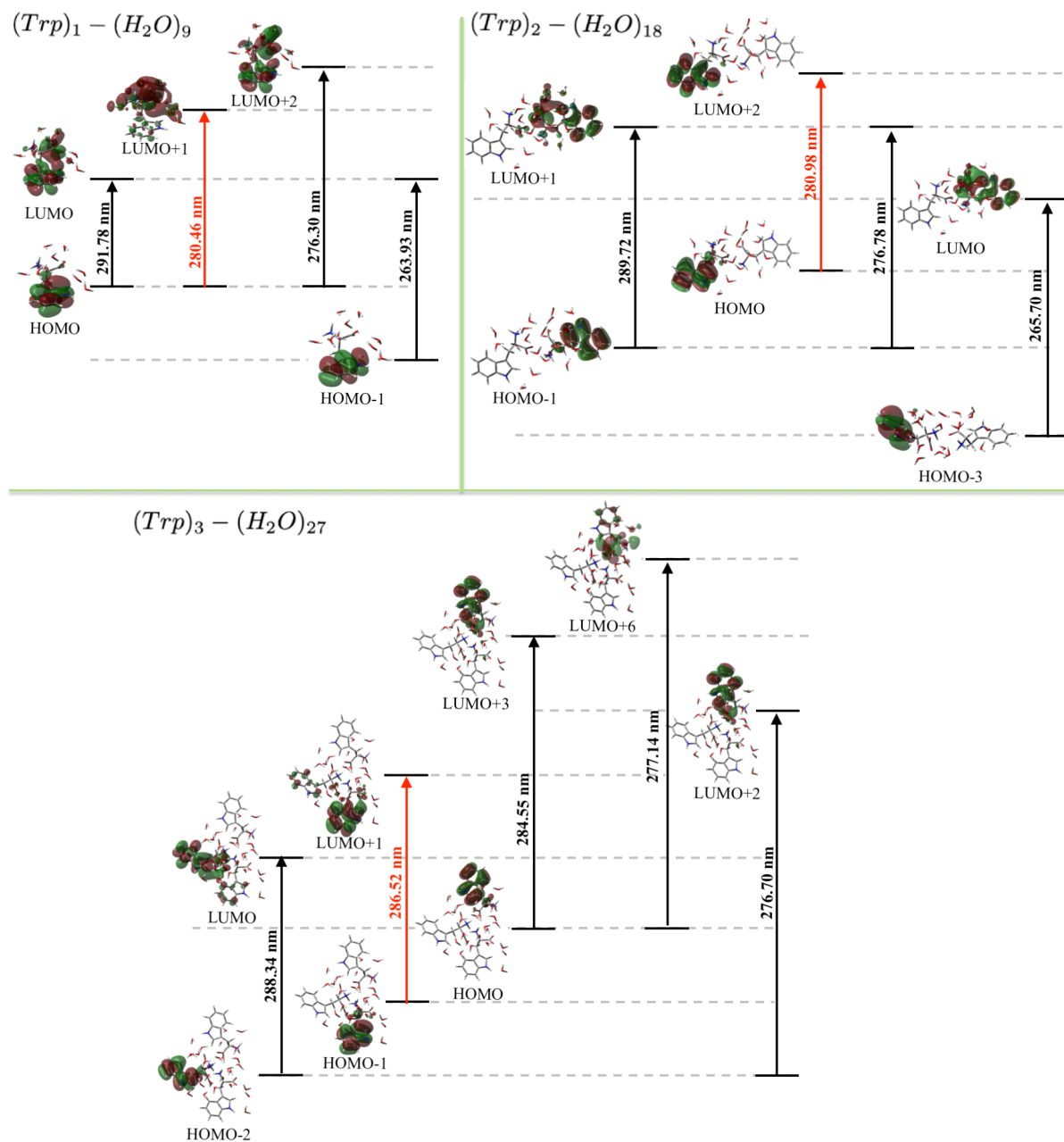


Figura 4.20: Orbitales moleculares involucrados en las líneas de absorción representativas de los clusters $(Trp)_1 - (H_2O)_9$, $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ y $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ obtenidos mediante el cálculo TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p)//PM6.

de forma individual, por ejemplo los orbitales LUMO y LUMO+1 permiten identificar cómo la carga se distribuye principalmente en el grupo indol de dos moléculas de *Trp* cercanas. Esto es una evidencia de que al aumentar la cantidad de moléculas de *Trp*, aumentan las interacciones entre ellas, las cuales influyen en el proceso de absorción.

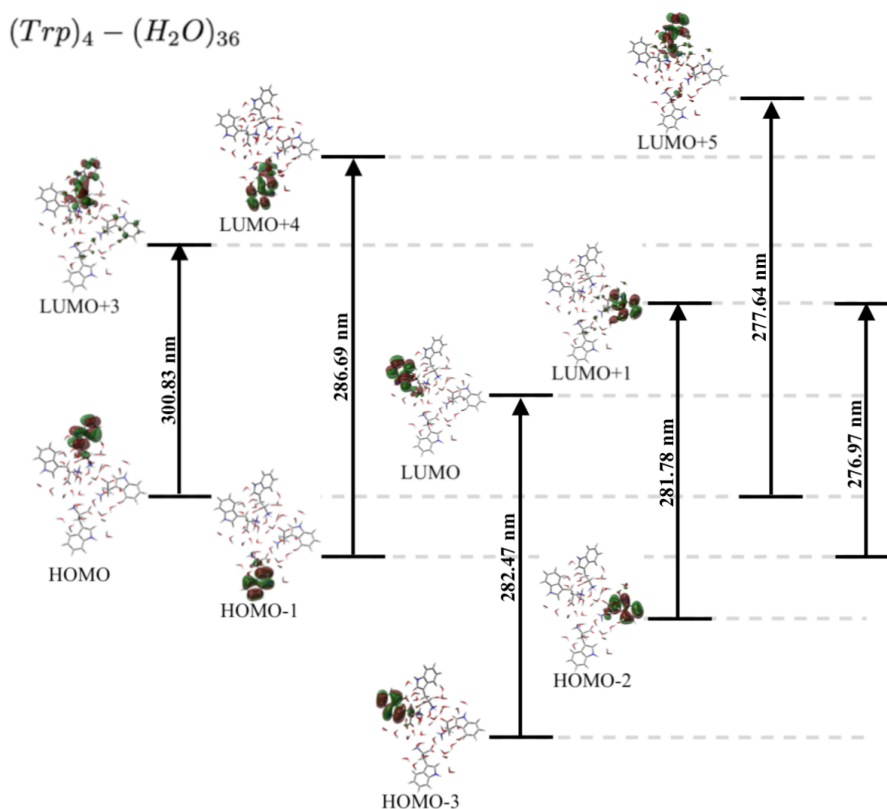


Figura 4.21: Orbitales moleculares involucrados en las líneas de absorción representativas del cluster $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ obtenidos mediante el cálculo TD-DFT/B3LYP/6-311+G(d,p)//PM6.

Ahora, los estados excitados S_1 , S_3 y S_5 muestran en la Fig. 4.20 transiciones principalmente del primer, segundo y tercer *Trp*, las cuales se pueden etiquetar como L_{b1} , L_{b2} y L_{b3} . Similar al caso anterior, se obtienen estados excitados como por ejemplo el S_7 , donde la carga se transfiere de un *Trp* a otro cercano.

El comportamiento del cluster más grande $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ es semejante al anterior, por ejemplo los orbitales LUMO+1, LUMO+3 y LUMO+5 de la Fig. 4.21 muestran cómo la carga se distribuye entre las moléculas de *Trp* vecinas. La contribución principal de las transiciones de los estados S_1 , S_3 , S_5 y S_6 se pueden etiquetar como L_{b1} , L_{b2} , L_{b3} y L_{b4} . También se encuentran estados como el S_{10} que muestran la transferencia de carga de una molécula de *Trp* a otra cercana. Apesar que para este caso el estado excitado con mayor fuerza de oscilador ocurre a $\lambda = 281.78$ nm, es preciso resaltar que aparece por primera vez un estado excitado por encima de $\lambda = 300$ nm, como el estado S_1 (ver Tabla 4.5).

Por otro lado, usando el método TD-DFT se obtuvo la geometría optimizada del estado excitado que permite la emisión. Ya se ha mencionado anteriormente que para calcular el estado fluorescente, es necesario optimizar el estado fundamental (EF) y el estado excitado (EE) de interés al mismo nivel B3LYP/6-31+G(d,p). En

este sentido, sólo fue posible optimizar a este nivel el cluster más pequeño, pues la exigencia computacional es considerablemente alta para los demás clusters, debido a la cantidad de átomos que los conforman. En la Fig. 4.22 se representa el proceso de emisión del primer cluster usando el conformero *Zpt*. Se puede observar que las geometrías optimizadas del EF y EE son similares, sin embargo algunos enlaces de hidrógeno se hacen más fuertes, reduciendo su distancia, por ejemplo la longitud de enlace entre el átomo hidrógeno (H) unido al átomo de nitrógeno (N) del anillo aromático y el átomo de oxígeno (O) de la molécula de agua más cercana, disminuye su distancia de 1.904 a 1.796 Å, también lo hacen dos enlaces del zwitterión de 1.842 a 1.766 Å y 1.739 a 1.723 Å. Así que los enlaces de hidrógeno que se hacen más fuertes alrededor de los átomos N del anillo pirrol y del grupo amino son importantes en el proceso de emisión. Ahora, el estado excitado con mayor fuerza de oscilador S_2 absorbe a $\lambda = 279$ nm. Una vez se ha excitado el estado S_2 , se acopla con el estado

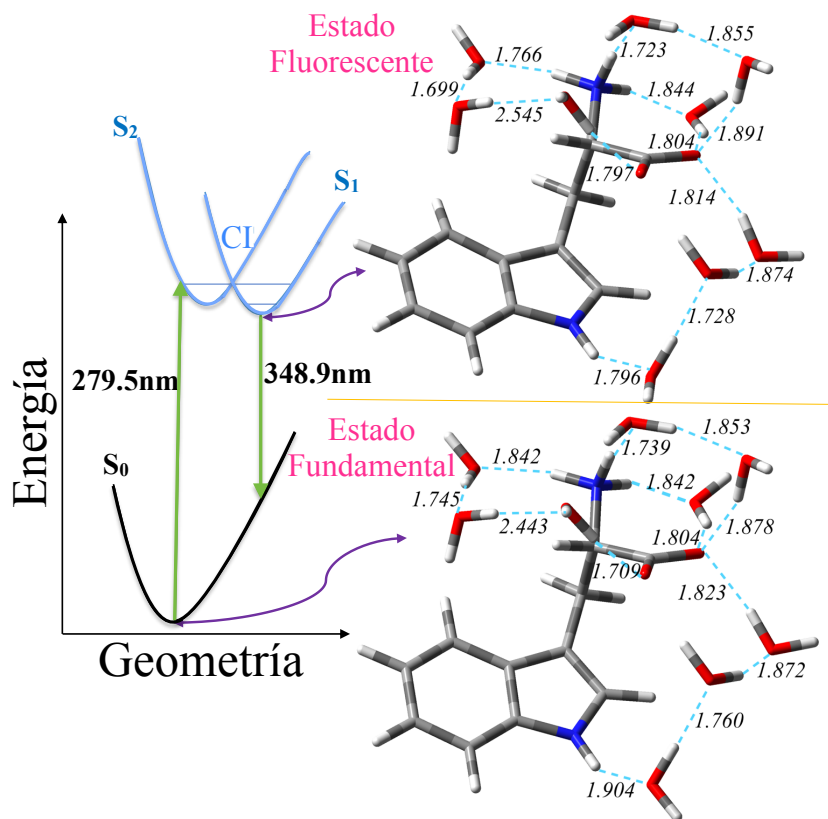


Figura 4.22: Diagrama representativo del proceso de luminiscencia del cluster $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ con el conformero *Zpt*. Se ilustran las geometrías optimizadas del estado fundamental y del estado excitado fluorescente. Las líneas discontinuas azules muestran las longitudes de los enlaces de hidrógeno medidas en Angstroms (Å).

S_1 a través de sus vibraciones, y ocurre una conversión interna (CI). Finalmente, el sistema se relaja y emite a $\lambda = 349$ nm.

En la Fig. 4.23 se compara el estado fluorescente del cluster más pequeño de los conformeros Zpt y Zag^+ con el espectro de emisión experimental de Trp en agua. Se puede observar que los resultados teóricos y experimentales tienen buena concordancia, el cluster con Zpt se aleja al valor experimental de $\lambda = 357$ nm por 8 nm y Zag^+ se aleja por 13 nm. Es evidente que el conformero Zpt se acerca más por ser el más estable en este solvente.

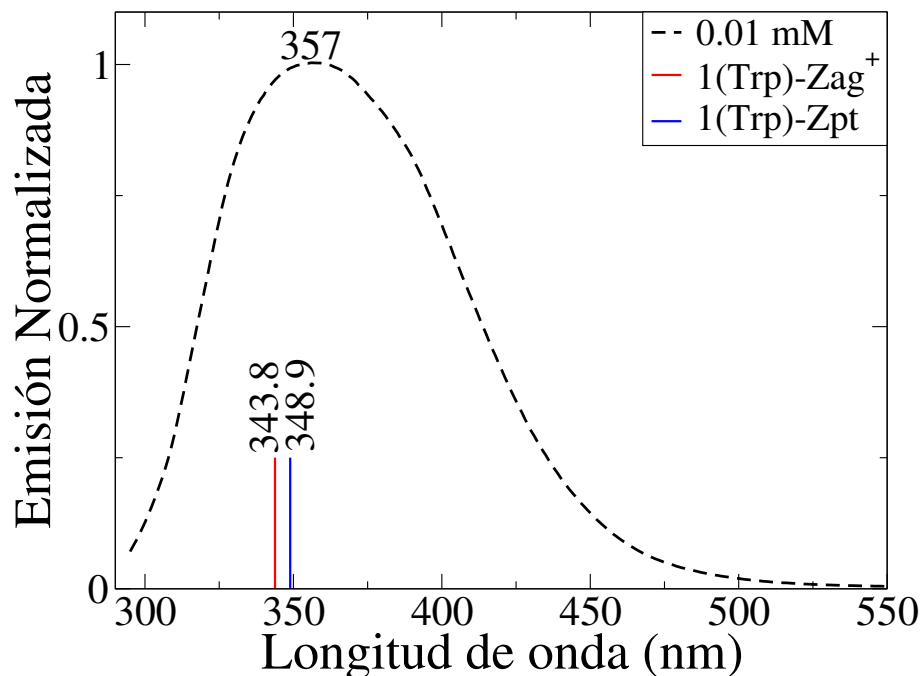


Figura 4.23: Espectro de emisión experimental de Trp en agua, representado por la línea discontinua negra. Los estados fluorescentes del cluster $(Trp)_1 - (H_2O)_9$ con los conformeros Zag^+ y Zpt .

4.5. Elección de solventes menos polares al agua para el estudio de Trp

Hasta el momento se ha mencionado el estudio de Trp en solventes menos polares que el agua como acetona y ciclohexano, pero esta elección no fue aleatoria, se justifica desde un estudio experimental, en el que se midieron los espectros de excitación y emisión de diferentes solventes tales como metanol, etanol, acetona, cloroformo, tolueno y agua. El objetivo principal de esto, fue evaluar los solventes que absorben y emiten con menor intensidad en la región que lo hace el Trp y garantizar que la señal del Trp prevalezca ante la señal del solvente.

La Fig. 4.24 muestra los espectros de excitación de los diferentes solventes, naturalmente los solventes emiten a diferentes longitudes de onda, las cuales se han

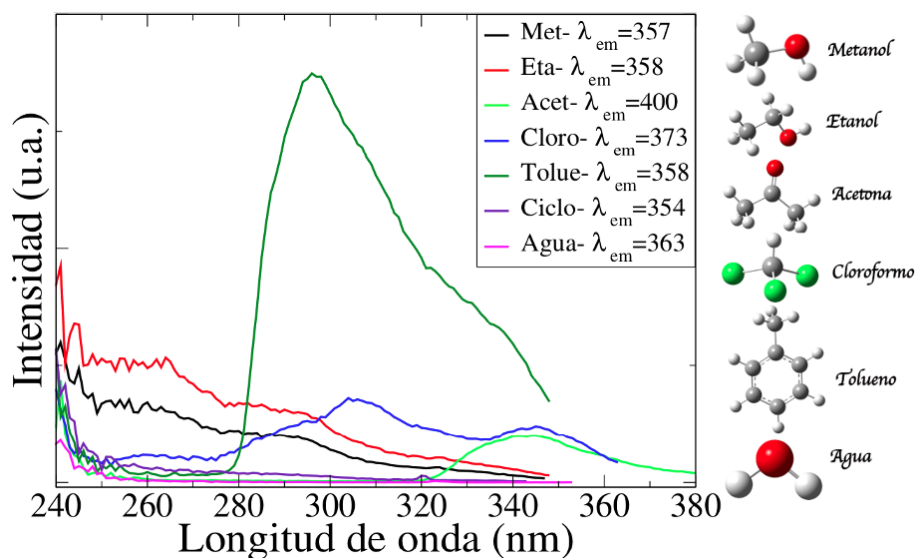


Figura 4.24: Espectro de excitación de diferentes solventes. La longitud de onda de emisión se especifica para cada solvente.

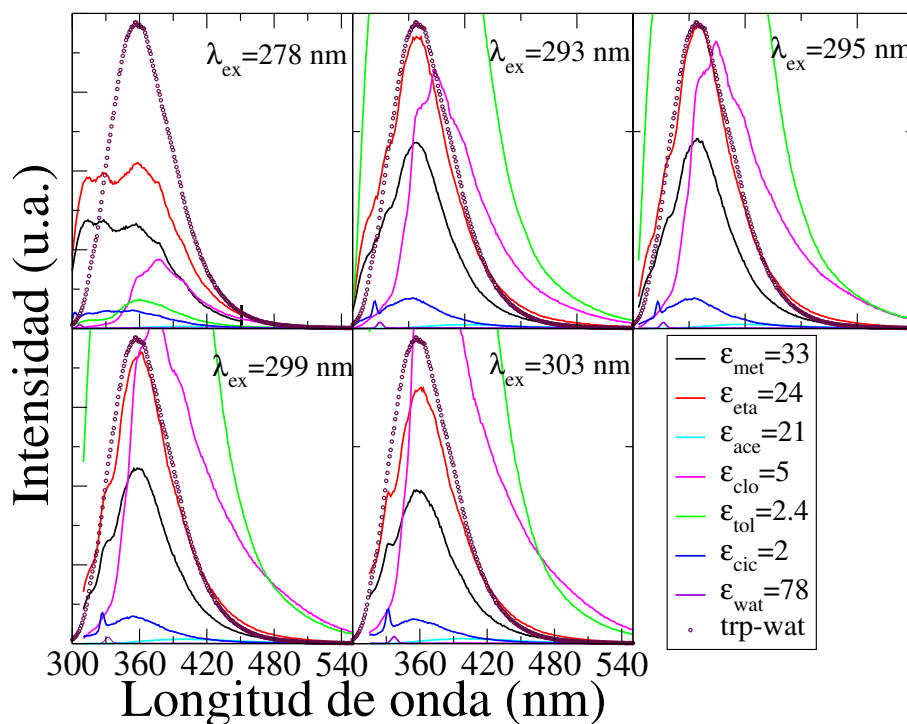


Figura 4.25: Espectro de emisión de diferentes solventes. La longitud de onda de excitación se especifica en cada panel. Se ha incluido la emisión de *Trp* en agua para comparar con la intensidad y región de emisión de los disolventes, y así favorecer el estudio con disolventes que no inhiban la señal del *Trp*.

indicado en el panel superior. Recordando que los espectros de excitación de *Trp* en agua muestran su absorción en el rango de $\lambda = 278$ nm a $\lambda = 305$ nm, y como se aprecia en la Fig. 4.24, en esta región, el agua (color rosa) es el solvente que menos absorbe. Luego, el ciclohexano (color violeta) también tiene una absorción casi nula en la región de interés. Por último, se encuentra la acetona, la cual comienza a absorber a partir de $\lambda = 320$ nm, pero con una intensidad menor comparada con los demás solventes. De igual manera, se midieron los espectros de emisión de los diferentes solventes excitando a las longitudes de onda empleadas en el caso del agua, debido al corrimiento al rojo observado, los resultados se presentan en la Fig 4.25 considerando como referencia la emisión del *Trp* en agua (círculos naranjas) medida previamente. Puede notarse, que al igual que en la Fig. 4.24 los solventes acetona y ciclohexano tienen una señal muy baja de emisión en la región de interés, lo que permite emplear estos solventes para el estudio de las propiedades luminiscentes del *Trp* en solventes menos polares que el agua.

4.6. Transferencia de protones del *Trp* mediada por acetona y su efecto a la absorción óptica

Como análogo a la sección 4.3 se estudió la reacción de transferencia de protones pero ahora en acetona, pues como se mostró en el Capítulo 3 cuando se emplea el método de solvatación continuo, es posible encontrar la estructura neutra y zwitteriónica de *Trp*. Sin embargo, el caso de transferencia de protones mediado por una molécula de acetona no fue encontrado, ya que con acetona los enlaces de hidrógeno no surgen naturalmente como con agua, debido a que la acetona sólo “acepta” átomos de hidrógeno, pero no “dona”, como sí ocurre con el agua.

4.6.1. Reacción de transferencia de protones con PCM

Al igual que en el caso del agua, a través del solvente continuo (PCM) de acetona, la transferencia de protones ocurre de forma directa entre el grupo carboxilo y el grupo amino. También, la coordenada de reacción es la longitud de enlace H-O del grupo carboxilo o N-H del grupo amino, como se muestra en la Fig. 4.26. El conformero empleado Na_g^+ , fue uno de los más estables en acetona en su forma neutra con una energía relativa de 0 KCal/Mol, menor que la energía relativa en su forma zwitteriónica Za_g^+ de 1.24 KCal/Mol. En el punto de transición el sistema alcanza una máxima energía relativa de 3.64 KCal/Mol.

Un aspecto que se debe resaltar en este punto es cómo se comparan las curvas de energía en la transición de protones para el caso del agua y acetona. De esta manera, se presenta en la Fig. 4.27 las curvas de energía en el proceso de transición para el

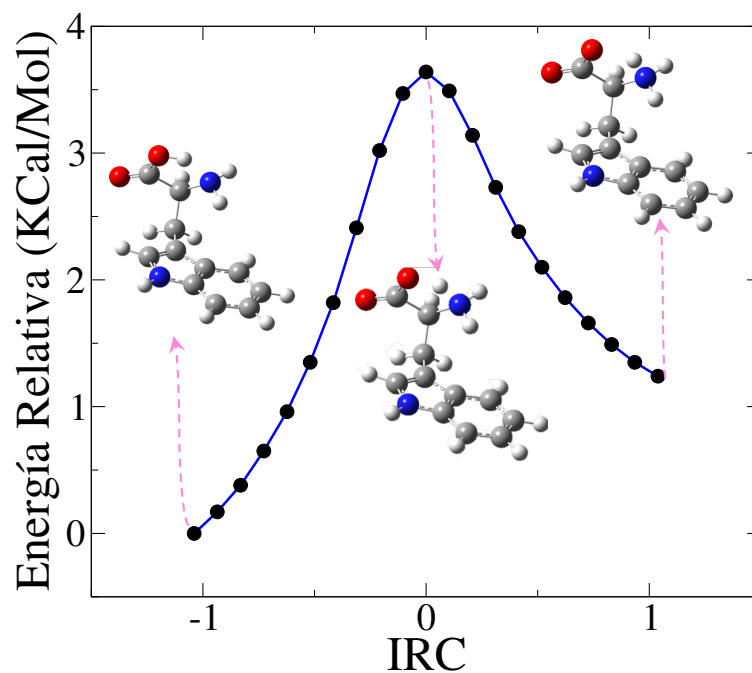


Figura 4.26: Energía relativa en función de la coordenada de reacción (IRC) para *Trp* en acetona modelada con PCM.

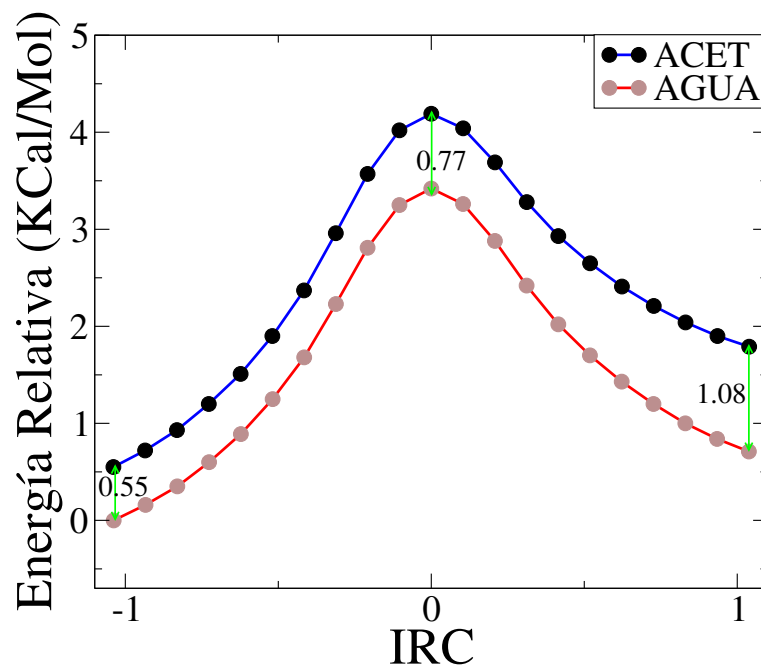


Figura 4.27: Comparación entre la energía relativa en función de la coordenada de reacción (IRC) para *Trp* en agua y acetona modeladas con PCM.

mismo conformero en su estado neutro y zwitterión, Nag^+ y Zag^+ respectivamente. Como se observa, la curva de energía en la que ocurre la transferencia de protones con agua es menor que en acetona, además la diferencia de energía en la forma neutra es aproximadamente la mitad (0.55 KCal/Mol) de la diferencia de energía en la forma zwitteriónica (1.08 KCal/Mol).

El espectro de absorción de *Trp* en acetona con PCM de las estructuras neutra y zwitteriónica se presenta en la Fig. 4.28, la banda de absorción de ambos casos se localiza alrededor de $\lambda = 275$ nm, la línea de transición más fuerte en esta zona para la estructura neutra se encuentra a $\lambda = 279$ nm y para la estructura zwitteriónica a $\lambda = 276$ nm. Mientras que alrededor de $\lambda = 220$ nm las transiciones se ven afectadas por el medio que rodea al *Trp* y se puede notar en las Figs. 4.29 y 4.30, que muestran los orbitales involucrados en las transiciones.

Las transiciones HOMO→LUMO y HOMO-1→LUMO de ambas estructuras, neutra (H→L:278.79 nm, H-1→L:259.6 nm) y zwitteriónica (H→L:275.87 nm, H-1→L:260.26 nm) son casi iguales de tipo $\pi\pi^*$ y comparables con el caso en estado gaseoso mostrado en la Fig. 4.4.

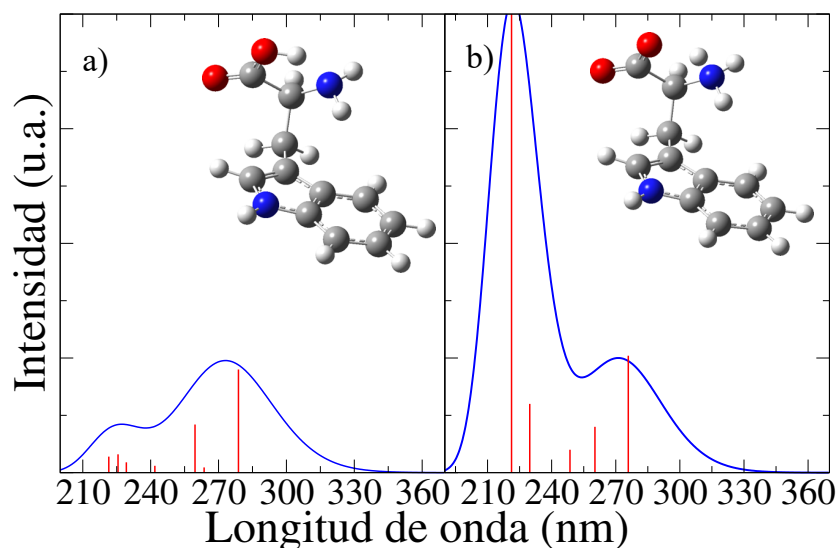


Figura 4.28: Espectro de AO del conformero a) Nag^+ y b) Zag^+ en acetona con PCM. Las líneas rojas representan los estados excitados calculados con una intensidad proporcional a la fuerza de oscilador. Nótese que el estado con mayor fuerza de oscilador relacionado a una transición directa de *Trp* se localiza en $\lambda = 278.79$ nm para Nag^+ y $\lambda = 275.87$ nm para Zag^+ .

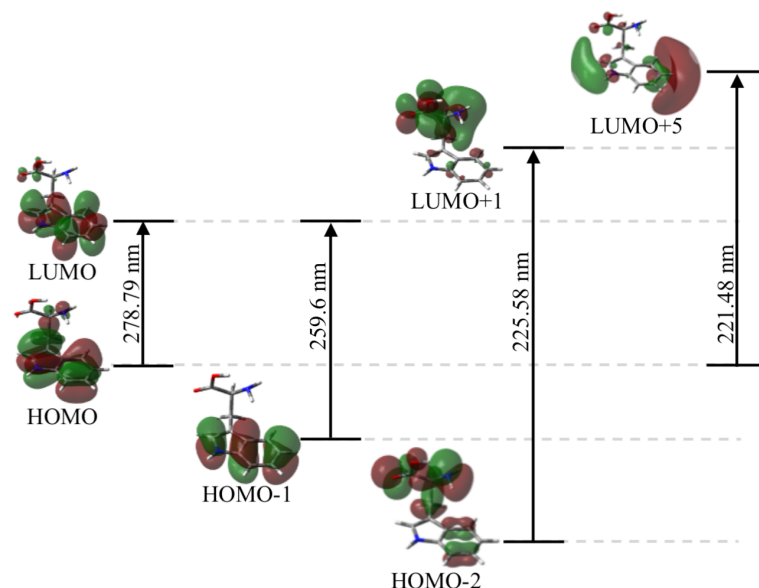


Figura 4.29: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura Nag^+ en acetona. Las transiciones a $\lambda = 278.79$ nm y $\lambda = 259.6$ nm se relacionan con las transiciones ya conocidas del Trp 1L_a y 1L_b , respectivamente. Los demás orbitales muestran contribución del entorno local.

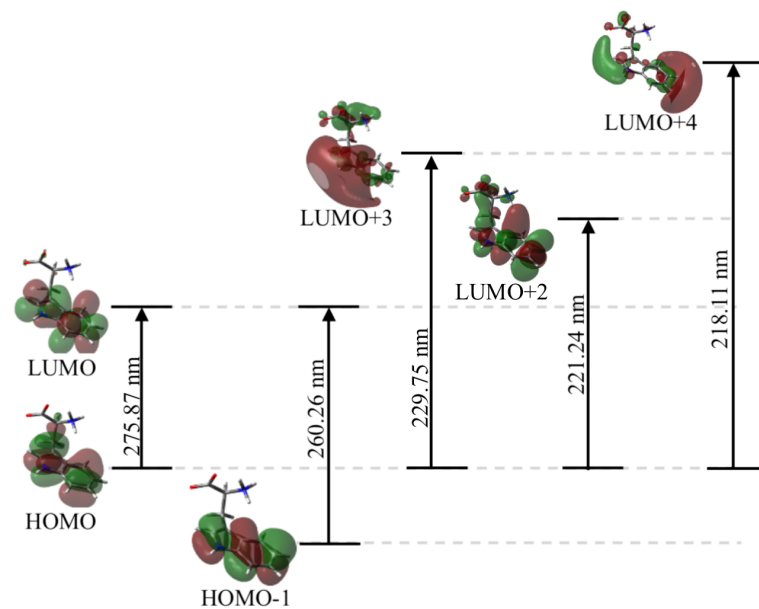


Figura 4.30: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas para la estructura Zag^+ en acetona. Las transiciones a $\lambda = 275.87$ nm y $\lambda = 260.26$ nm se relacionan con las transiciones ya conocidas del Trp 1L_a y 1L_b , respectivamente. Los demás orbitales muestran contribución del entorno local.

4.7. Propiedades luminiscentes del Triptófano en acetona

4.7.1. Análisis experimental

Se prepararon cuatro soluciones de *Trp* en acetona concentradas a 0.01, 0.05, 0.1 y 5 mM, las soluciones más concentradas se saturan debido a la polaridad del solvente. En este caso, los espectros de absorción no fueron medidos, debido a la dificultad para medir una línea base de un solvente como acetona. Sin embargo, los espectros de excitación que se muestran en la Fig. 4.31 no presentan corrimientos al rojo en función de la concentración como se observó en el agua. Aunque, el máximo de la banda de tales espectros ocurre en $\lambda = 344$ nm, mismo lugar donde se encuentra el máximo de excitación del solvente de acetona pura. En este caso, el *Trp* intensifica la señal donde se excita la acetona. La longitud de onda de emisión de los espectros de excitación para las soluciones con *Trp* es $\lambda_{em}=381$ nm, mientras que para acetona pura es $\lambda_{em}=400$ nm.

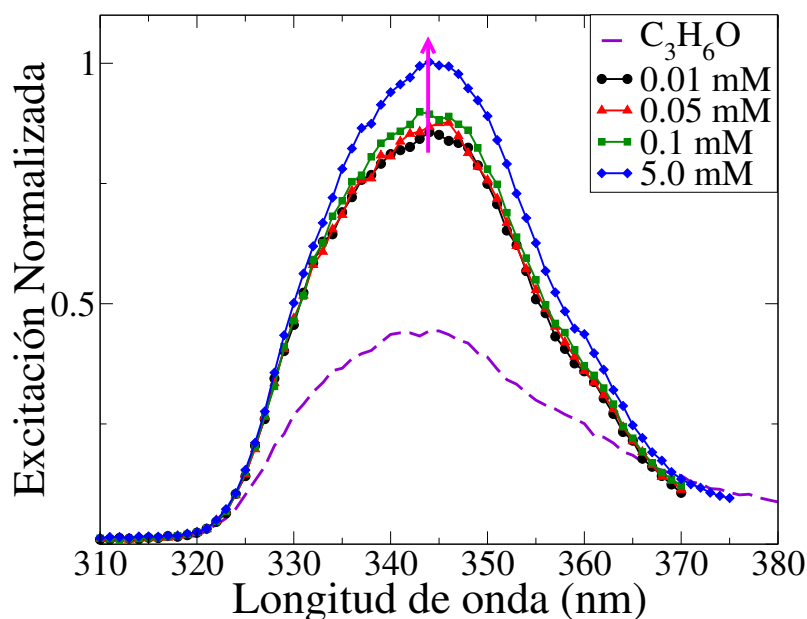


Figura 4.31: Espectro de excitación experimental de *Trp* en acetona a cuatro concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta con líneas discontinuas el espectro de excitación de acetona pura. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.

El espectro de emisión de las cuatro soluciones de *Trp* en acetona y de acetona pura se muestran en la Fig. 4.32. La longitud de onda de excitación en todos los casos fue $\lambda_{ex}=344$ nm. El máximo de la banda de emisión para acetona pura se localiza en 400 nm y para las soluciones con *Trp* se localiza en 381 nm. De manera que en la

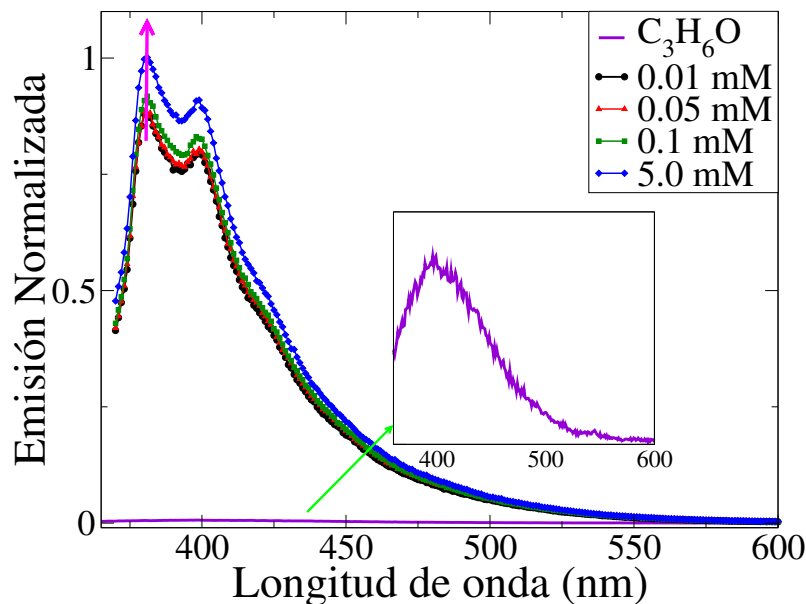


Figura 4.32: Espectro de emisión experimental de *Trp* en acetona a cuatro concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta y en un recuadro un acercamiento del espectro de excitación de acetona pura. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.

emisión, la presencia de *Trp* genera un corrimiento al azul respecto de la emisión de la acetona.

Vale la pena mencionar que excitar las soluciones a la longitud de onda de máxima intensidad, genera que los espectros de emisión sean los más intensos. No obstante, es conveniente explorar los espectros de emisión y excitación en regiones donde prevalezcan los procesos exclusivos del *Trp*, ya que para $\lambda_{ex}=344$ nm y $\lambda_{em}=381$ nm ocurre una transferencia de carga del *Trp* a acetona, como se demuestra en el análisis teórico. La Fig. 4.33 compara los espectros de excitación obtenidos a $\lambda_{em}=350$ nm y $\lambda_{em}=381$ nm, y los espectros de emisión obtenidos a $\lambda_{ex}=291$ nm y $\lambda_{em}=344$ nm, respectivamente.

En la Fig. 4.33 se puede observar que el sistema *Trp*-acetona genera una emisión máxima en 381 nm excitando a $\lambda_{ex} = 344$ nm, pero estas curvas son debidas a la transferencia de carga de *Trp* a acetona, lo cual se demuestra teóricamente más adelante. Por otro lado, se midió otra emisión en $\lambda = 350$ nm con una intensidad menor, excitando a $\lambda = 291$ nm debidas a transferencias de *Trp*-*Trp*, las cuales también son discutidas en la siguiente sección. Estas longitudes de onda de excitación y emisión son comparables con las obtenidas en agua a $\lambda_{ex}=305$ nm y $\lambda_{em}=357$ nm, para una concentración de 5 mM. Tomando como referencia estos valores de *Trp* agua, se observa que el *Trp* en un solvente menos polar como acetona, la excitación y la emisión presentan un corrimiento al azul de 14 nm y 7 nm, respectivamente.

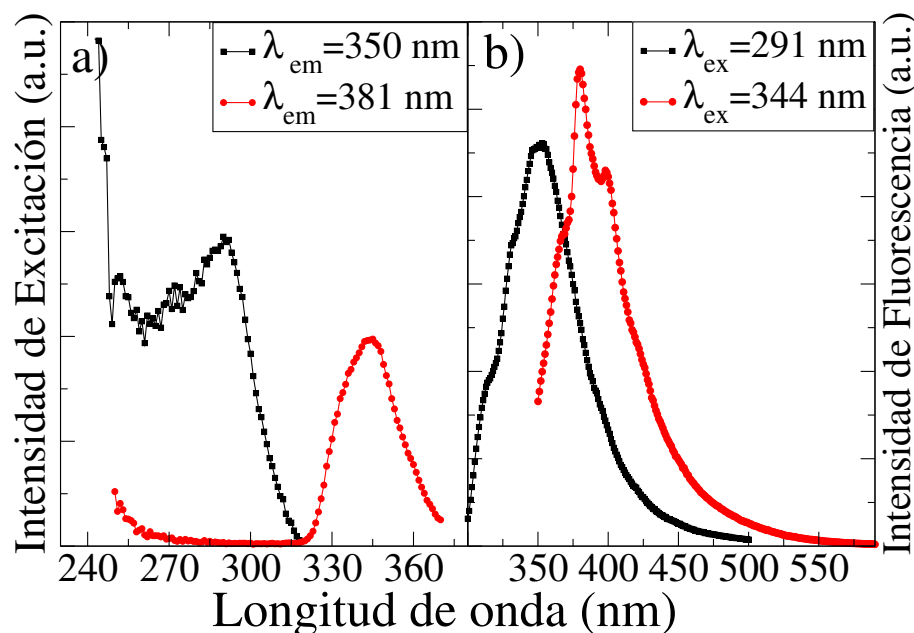


Figura 4.33: (a) Espectro de excitación de *Trp* en acetona a $\lambda_{em}=350$ nm y $\lambda_{em}=381$ nm. (b) Espectro de emisión de *Trp* en acetona a $\lambda_{em}=291$ nm y $\lambda_{em}=344$ nm. La concentración estudiada fue de 5 mM.

4.7.2. Análisis teórico

Luego de establecer el cluster que arroja un espectro de absorción cercano al obtenido experimentalmente, como se mostró en la sección 3.1.2 con $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y extendido a $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$. Un punto importante a destacar en el análisis teórico, es que después de un extenso estudio con una solvatación discreta de acetona, aumentando de una en una molécula de acetona, se encontró que al igual que en agua, la estructura zwitteriónica es la más estable. En este caso, el zwitterión empieza a ser más estable con cinco moléculas de acetona. Sin embargo, sólo con diecisiete moléculas de acetona se obtienen resultados cercanos a los experimentales. Además, el conformero con menor energía es *Zpt*, igual que sucede en agua.

En la Fig. 4.15 se mostró una representación de los enlaces de hidrógeno formados entre el *Trp* y las moléculas de agua, sin embargo las moléculas de acetona son “aceptoras”, es decir que sólo pueden formar enlaces de hidrógeno con moléculas que puedan donar un átomo de hidrógeno. En este sentido, sólo se formarán enlaces de hidrógeno con los átomos del *Trp* que sean donadores como se muestra en la Fig. 4.34, como se observa los posibles donadores que pueden formar enlaces de hidrógeno se encuentran en el N-H del grupo amino y N-H del anillo aromático.

Los espectros de AO calculados para los dos clusters modelados se presentan en la Fig. 4.35. Inicialmente, se puede observar que la intensidad de las curvas aumenta al considerar un cluster más grande, al igual que ocurre experimentalmente al aumentar

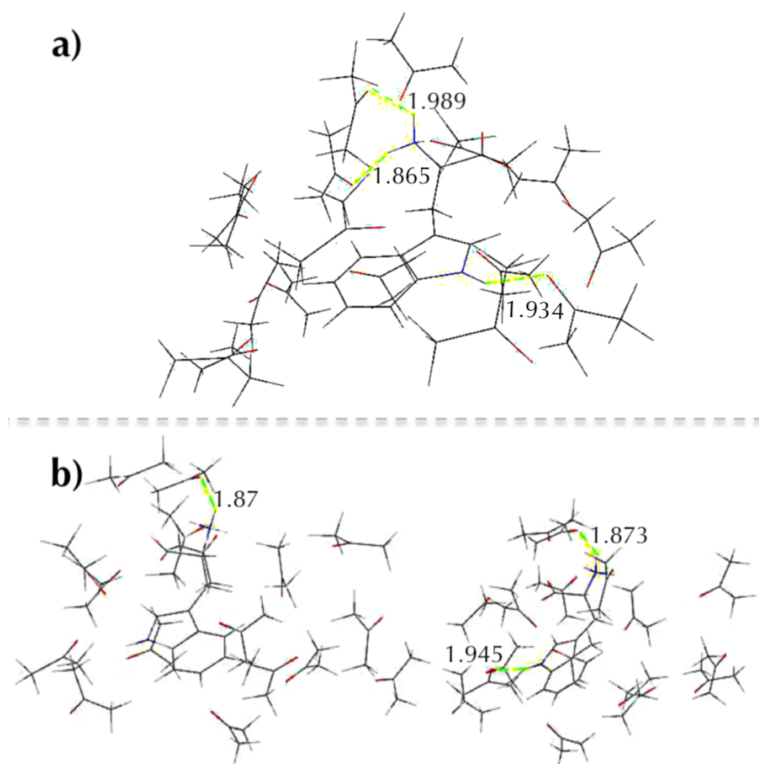


Figura 4.34: Enlaces de hidrógeno en el estado fundamental de los clusters **(a)** $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y **(b)** $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$.

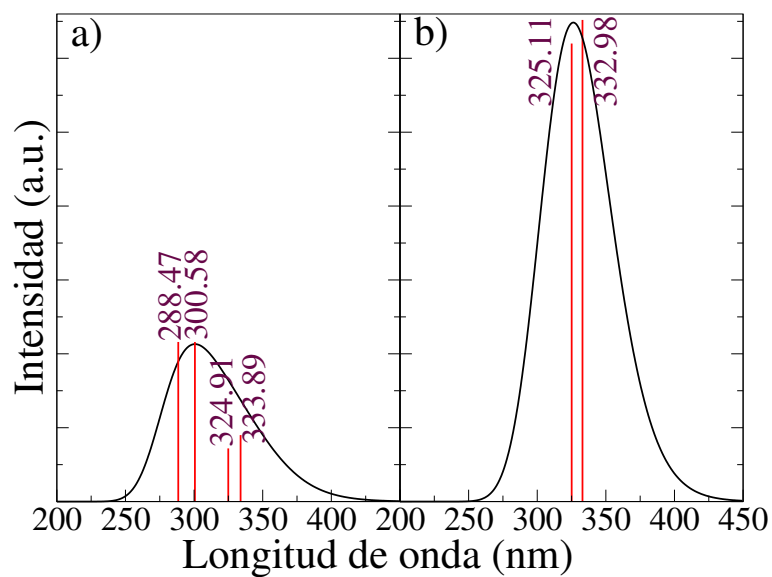


Figura 4.35: Espectros de AO para los clusters construidos **(a)** $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ y **(b)** $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$.

la concentración. Ahora, para el cluster más pequeño las líneas de transición con mayor fuerza de oscilador se encuentran en $\lambda = 288$ nm y $\lambda = 300$ nm las cuales pueden explicar la excitación experimental a $\lambda = 291$ nm, sin embargo el primer estado excitado calculado se encuentra aproximadamente a $\lambda = 334$ nm con una fuerza de oscilador menor, pero no despreciable, y esta cerca del máximo de la banda de excitación experimental por 10 nm. Adicionalmente, los espectros de absorción de ambos clusters presentan dos líneas de transición en común, muy cercanas a $\lambda = 325$ nm y $\lambda = 333$ nm. La Fig. 4.36 muestra la comparación de los datos teóricos y experimentales.

En la Tabla 4.6 se muestran los estados excitados representativos en detalle para los dos clusters propuestos, es necesario mencionar que para ambos clusters se calcularon cuarenta estados excitados, debido a su tamaño.

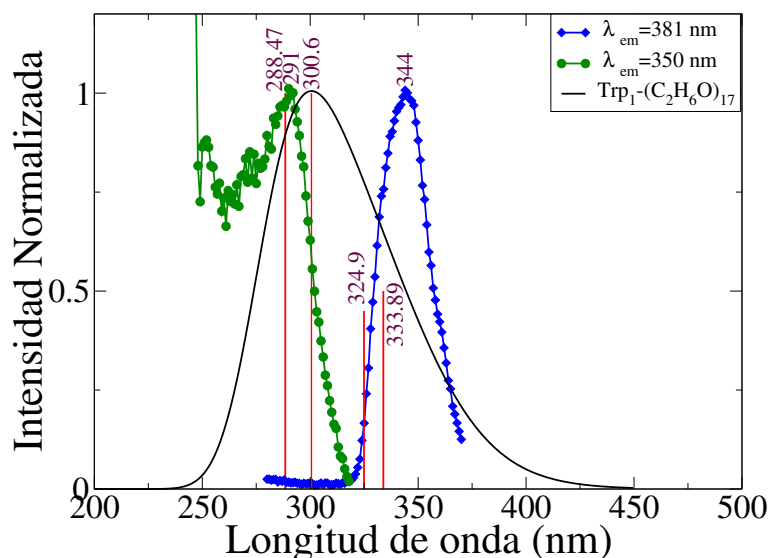


Figura 4.36: Espectros de excitación normalizados de *Trp* en acetona para una concentración de 5 mM a diferentes longitudes de onda $\lambda_{em}=381$ nm (cuadros azules) y $\lambda_{em}=350$ nm (círculos verdes). La línea continua es el espectro de AO normalizado del cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ con las líneas de absorción representativas.

En la Tabla 4.6 se observa que el estado S_{19} del cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ absorbe a $\lambda = 293$ nm y se acerca muy bien al máximo de la banda de excitación de $\lambda = 291$ nm. La Fig. 4.37 muestra que esta transición se debe a la transferencia de carga principalmente de *Trp-Trp*, por supuesto con la contribución de algunas moléculas de acetona, este hecho justifica a nivel molecular la excitación a $\lambda = 291$ nm. Además, el estado S_7 con $\lambda = 334$ nm, también se acerca al máximo de la banda de excitación de $\lambda = 344$. La Fig. 4.37 muestra para este estado, cuya contribución principal es $HOMO \rightarrow LUMO+6$ (37.70 %) ocurre una transferencia de carga del *Trp* a algunas moléculas de acetona circundantes, comportamiento similar a las transiciones a $\lambda = 325$ nm, $\lambda = 300$ nm y $\lambda = 289$ nm. De forma que en el solvente acetona, el *Trp* fun-

Tabla 4.6: Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los dos clusters de *Trp* en acetona, con el conformero *Zpt*, respectivamente.

Cluster	Estado	Excitación de un electrón	Composición	E (eV) (λ (nm))	f
$(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$	S_7	37.79 %	H $\rightarrow$ L+6	3.71 (333.89)	0.0035
		25.80 %	H $\rightarrow$ L+5		
	S_9	71.47 %	H $\rightarrow$ L+9	3.82 (324.91)	0.0028
		20.07 %	H $\rightarrow$ L+6		
	S_{16}	75.13 %	H $\rightarrow$ L+13	4.12 (300.58)	0.0072
		12.77 %	H $\rightarrow$ L+14		
	S_{19}	86.92 %	H $\rightarrow$ L+16	4.23 (292.99)	0.0054
$(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$	S_6	62.12 %	H $\rightarrow$ L+13	3.72 (332.98)	0.0280
		32.53 %	H $\rightarrow$ L+14		
	S_8	38.32 %	H-1 $\rightarrow$ L+5	3.81 (325.11)	0.0266
		19.86 %	H-1 $\rightarrow$ L+11		
	S_{11}	51.91 %	H-1 $\rightarrow$ L+4	3.83 (323.78)	0.0058
		43.42 %	H-1 $\rightarrow$ L+7		
	S_{13}	74.24 %	H-1 $\rightarrow$ L+1	3.88 (319.85)	0.0050
		17.35 %	H-1 $\rightarrow$ L+5		

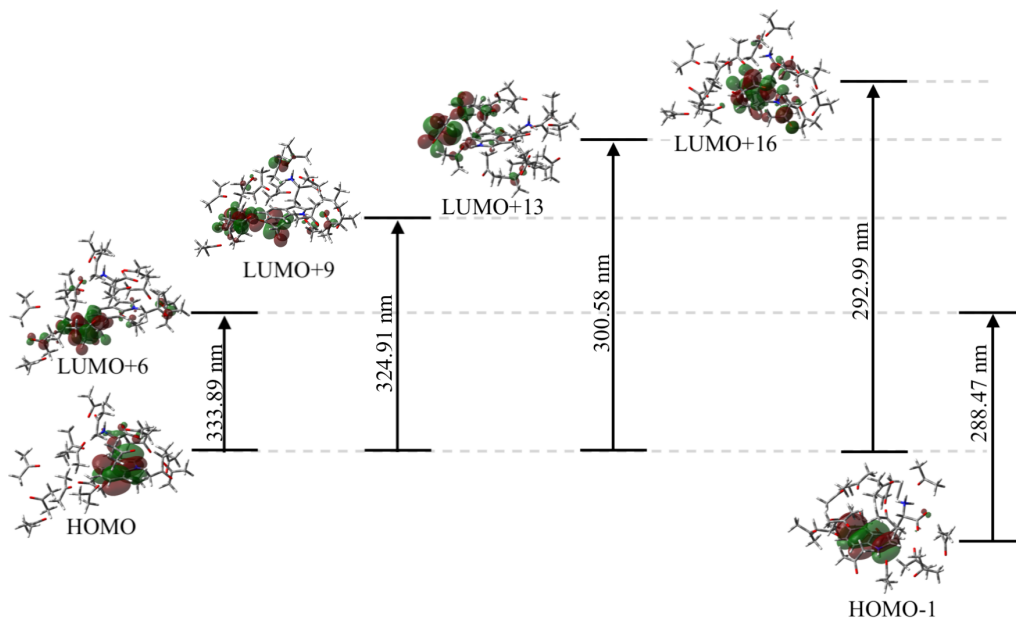


Figura 4.37: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$. Las dos transiciones con mayor fuerza de oscilador se localizan en $\lambda = 300$ nm y $\lambda = 289$ nm y presentan transferencia de carga *Trp* $\rightarrow$ acetona. Aunque a $\lambda = 293$ nm hay transferencia de carga *Trp* $\rightarrow$ *Trp*+acetona.

ción principalmente como sensibilizador en la emisión de acetona, pero no inhibe la posibilidad de que el *Trp* emita con menor intensidad como se observa en la Fig. 4.33.

Para el segundo cluster, en la Tabla 4.6 se presentan los estados excitados con mayor fuerza de oscilador y en la Fig. 4.38 se presentan sus orbitales moleculares. Como se mencionó anteriormente se calcularon cuarenta estados excitados debido al tamaño del sistema, sin embargo el estado S_{40} para este cluster absorbe en $\lambda = 293.93$ nm cercano al máximo de $\lambda = 291$ nm, aunque no fue suficiente, pues los orbitales moleculares aún no muestran transiciones de *Trp-Trp*. Tal vez, sea necesario calcular más estados excitados, no obstante esto requiere mayor recurso computacional y para los propósitos de este trabajo es suficiente mostrar que en el cluster más pequeño ocurre una transferencia *Trp-Trp* con una longitud de onda cercana a la experimental. Además de esto, es importante resaltar que las transiciones que ocurren alrededor de $\lambda = 325$ nm y $\lambda = 333$ nm, en ambos clusters, tienen contribuciones en sus orbitales muy similares, aunque para el segundo cluster en el estado S_6 la contribución HOMO $\rightarrow$ LUMO+13 muestra que la carga se transfiere del segundo *Trp* a las moléculas de acetona alrededor de ella, mientras que en el estado S_8 ocurre de forma análoga pero para el primer *Trp*. En los estados excitados S_{11} y S_{13} la transferencia de carga es similar a algunos estados de los clusters modelados en agua, pues pasa de un *Trp* a las moléculas de acetona circundantes del *Trp* vecino.

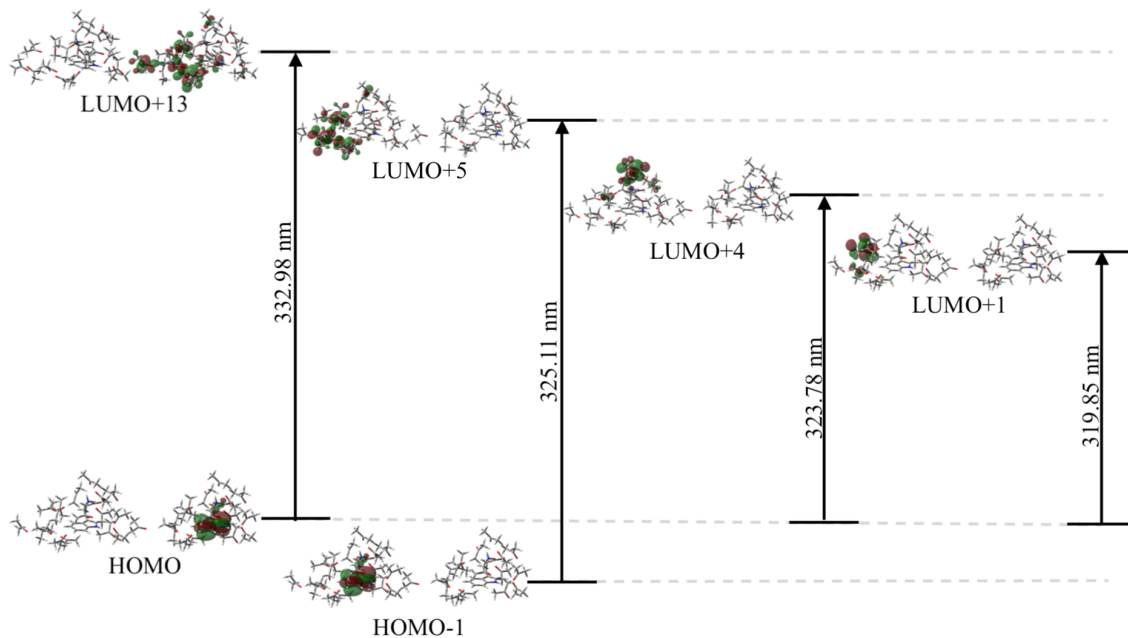


Figura 4.38: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$. Las transiciones con mayor fuerza de oscilador se localizan en $\lambda = 333$ nm y $\lambda = 325$ nm y presentan transferencia de carga *Trp* $\rightarrow$ acetona.

Respecto al cálculo de emisión para *Trp* en acetona, desafortunadamente no fue posible obtener, como se ha mencionado antes, es necesario emplear un nivel de cálculo

más alto B3LYP/6-31+G(d,p), el cual es difícil aplicar dado el tamaño de los clusters modelados.

4.8. Propiedades luminiscentes del Triptófano en ciclohexano

4.8.1. Análisis experimental

En el proceso de preparación de las disoluciones, se encontró un límite de saturación de *Trp* en ciclohexano, debido a que *Trp* como una molécula polar es poco soluble en solventes no-polares. Sin embargo, se lograron preparar tres soluciones no saturadas a concentraciones bajas de 0.01, 0.05 y 0.1 mM. Los espectros de excitación para cada concentración se muestran en la Fig. 4.39, para las soluciones concentradas a 0.05 y 0.1 mM se puede notar el máximo de la banda en $\lambda = 291$ nm, mientras que para la concentración más baja 0.01 mM se muestra un espectro amplio aproximadamente entre $\lambda = 270$ nm y $\lambda = 300$ nm donde el sistema absorbe, evidentemente esta contenida la banda de $\lambda = 291$ nm de las otras soluciones. En el caso de la curva de excitación para ciclohexano puro, no se puede identificar una banda representativa.

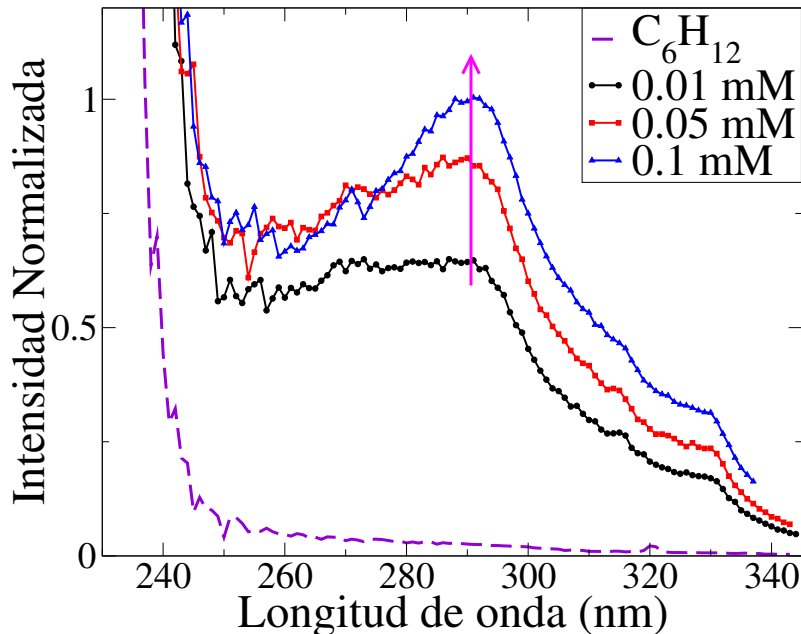


Figura 4.39: Espectros de excitación normalizados de *Trp* en ciclohexano a tres concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta con líneas discontinuas el espectro de excitación de ciclohexano puro. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.

Los espectros de emisión normalizados de las soluciones de *Trp* en ciclohexano

preparadas se presentan en la Fig. 4.40. La longitud de onda de excitación para las tres soluciones fue $\lambda_{ex} = 291$ nm, la banda de emisión se localiza a $\lambda_{em} = 347$ nm. Ahora, en ciclohexano puro se observa una banda de emisión a $\lambda_{em} = 354$ nm y la longitud de onda de excitación aplicada fue también $\lambda = 291$ nm.

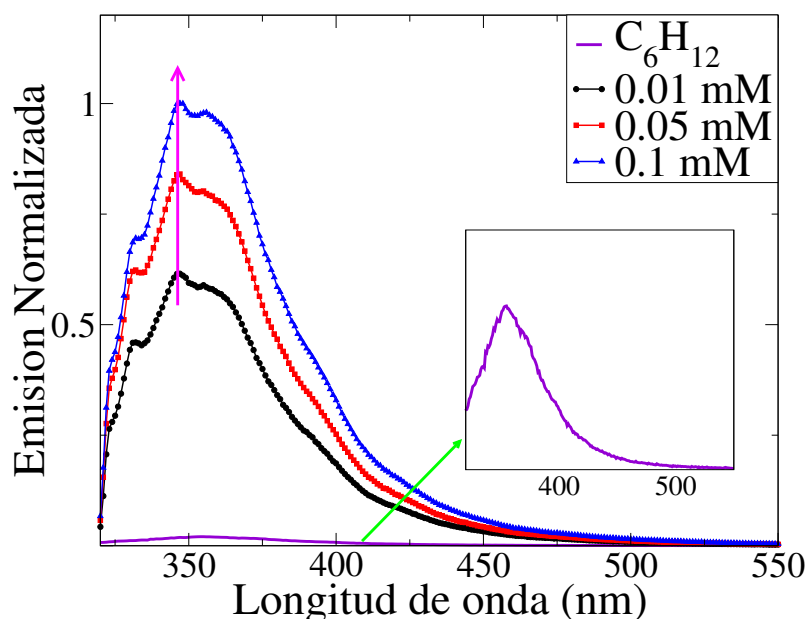


Figura 4.40: Espectros de emisión normalizados de *Trp* en ciclohexano a tres concentraciones diferentes. Se incluye en color violeta y en un recuadro un acercamiento del espectro de emisión de ciclohexano puro. La flecha vertical indica el incremento de la intensidad con la concentración. Se normalizó en referencia al espectro de máxima intensidad.

Para este caso, en el que la polaridad del solvente es muy baja, es conveniente comparar las propiedades luminiscentes con las reportadas para el *Trp* en estado gaseoso, cuya absorción se encuentra alrededor de $\lambda = 280$ nm y su emisión alrededor de $\lambda = 300$ nm. De manera que la energía necesaria para excitar al *Trp* en ciclohexano es menor, al igual que la energía con la que emite. Ahora, comparando con el caso opuesto, en un solvente completamente polar como el agua, la emisión presenta un corrimiento al azul de $\lambda = 357$ nm a $\lambda = 347$ nm y la absorción sufre un corrimiento al rojo de $\lambda = 278$ nm a $\lambda = 291$ nm.

4.8.2. Análisis Teórico

Partiendo del hecho que el ciclohexano es un disolvente no polar con una constante dieléctrica muy baja ($\epsilon = 2$), químicamente no hay una transferencia de electrones que permita al *Trp* protonarse. De tal forma, la estructura neutra es la más estable en ciclohexano, igual que en estado gaseoso. Con este disolvente, el conformero más estable es Nag^+ , como se mostró en la sección 3.1.3, con el cual se construyeron

cuatro clusters, los espectros de excitación para los respectivos clusters se muestran en la Fig. 4.41, como se observa, las cuatro curvas presentan un máximo en común alrededor de $\lambda = 280$ nm, cercano al máximo experimental localizado a $\lambda = 291$ nm. Análogo al incremento de la intensidad con la concentración experimentalmente, en el modelado, la intensidad crece al incrementar las moléculas de *Trp* en cada cluster. Una comparación apropiada entre los datos de absorción experimentales y teóricos, para una concentración de 0.1 mM y el cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$ se presenta en la Fig. 4.42, pues como se observa la transición de mayor fuerza de oscilador se encuentra cerca del máximo de la banda experimental por 10 nm, sin embargo el primer estado excitado calculado se encuentra a $\lambda = 288$ nm, aún más cerca de $\lambda = 291$ nm por 3 nm, es decir que la interacción de más moléculas de *Trp* aumenta la probabilidad de estados excitados con longitudes de onda más largas crezca.

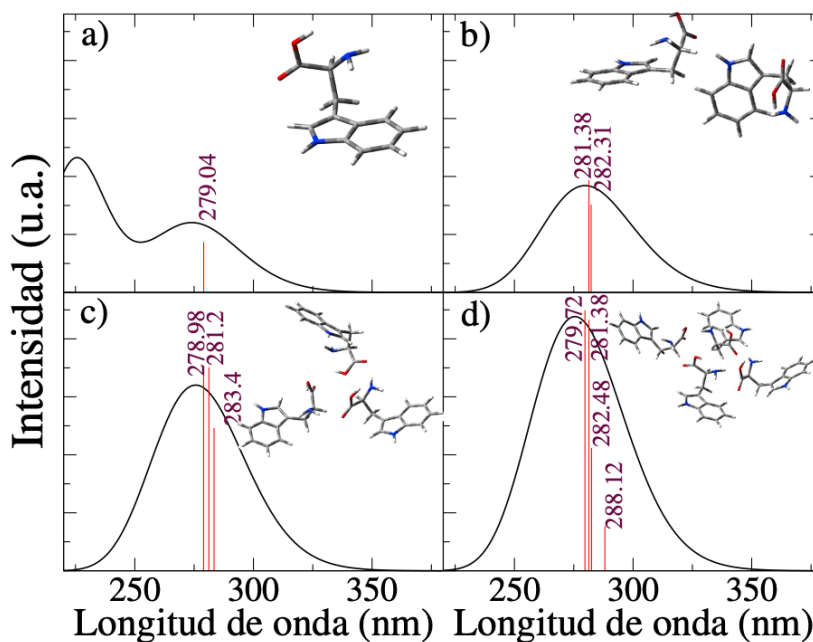


Figura 4.41: Espectros de AO para los clusters contruidos (a) $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, (b) $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, (c) $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ y (d) $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$.

Las transiciones más relevantes de los cálculos TD-DFT se presentan la Tabla 4.7. Para el cluster más pequeño, el estado con mayor fuerza de oscilador S_8 , muestra una contribución que transita del orbital HOMO, con una participación del grupo indol de tipo π , al orbital LUMO+5 de tipo σ^* con una gran participación del medio ambiente y una pequeña participación del grupo indol y la cadena lateral, como se observa en la Fig. 4.43. Este estado, según la notación de Platt [96] es denominado $B_{a,b}$ pero no es una transición directa del *Trp*. Luego, el segundo estado excitado más fuerte S_1 , se puede relacionar directamente con la transición L_a de tipo $\pi\pi^*$, ver Fig. 4.43. De hecho, los orbitales HOMO-1, HOMO, LUMO y LUMO+1 son muy similares a los

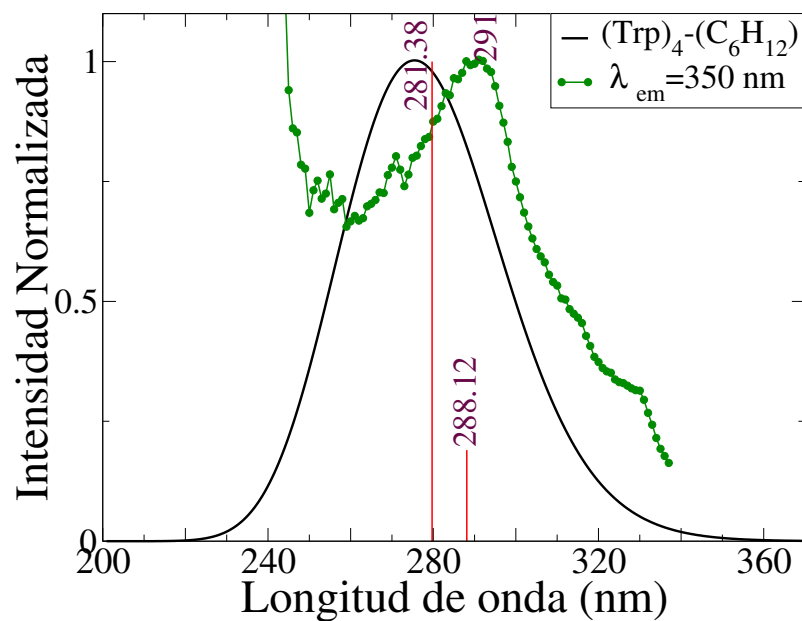


Figura 4.42: Espectro de excitación normalizado de *Trp* en ciclohexano para una concentración de 0.1 mM, $\lambda_{em}=347$ nm (círculos verdes). La línea continua es el espectro de AO normalizado del cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$ con sus respectivas líneas de absorción.

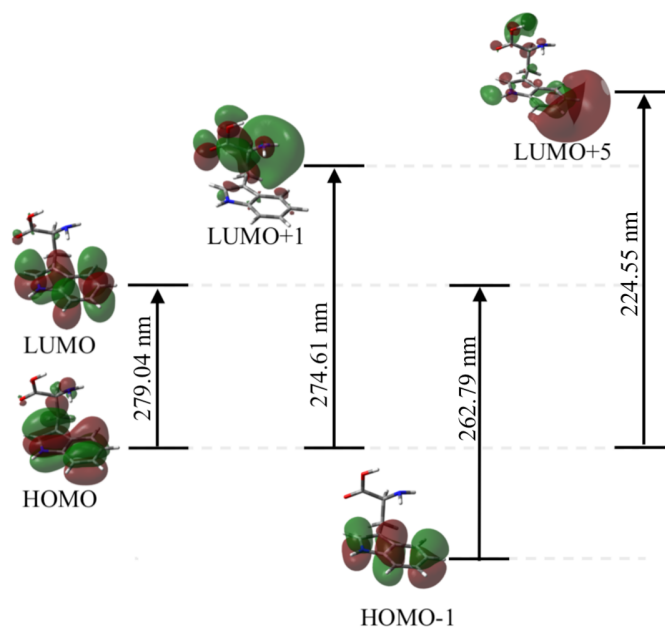


Figura 4.43: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$. Las transiciones a $\lambda = 279$ nm y $\lambda = 263$ nm se relacionan con los estados característicos 1L_a y 1L_b , respectivamente.

Tabla 4.7: Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición de los cuatro clusters de *Trp* en ciclohexano, con el conformero *Nag*⁺, respectivamente.

Cluster	Estado	Excitación de un electrón	Composición	E (eV) (λ (nm))	f
$(Trp)_1 - (C_6H_{12})$	S_1	83.39 %	H→L	4.44 (279.04)	0.0903
		9.72 %	H→L+1		
	S_2	87.37 %	H→L+1	4.51 (274.61)	0.0296
		8.58 %	H→L		
	S_3	64.57 %	H-1→L	4.72 (262.79)	0.0382
		15.88 %	H→L+3		
	S_8	43.52 %	H→L+5	5.52 (224.55)	0.2440
		24.82 %	H→L+3		
$(Trp)_2 - (C_6H_{12})$	S_1	79.10 %	H→L	4.16 (298.13)	0.0124
		10.43 %	H-1→L		
	S_2	33.20 %	H-1→L+1	4.39 (282.31)	0.0758
		32.23 %	H-1→L		
	S_3	60.06 %	H→L+2	4.41 (281.38)	0.0968
		15.95 %	H→L+1		
	S_8	44.89 %	H-2→L+2	4.69 (264.06)	0.0300
		18.64 %	H→L+7		
$(Trp)_3 - (C_6H_{12})$	S_1	84.47 %	H→L+2	4.37 (283.40)	0.0683
		6.19 %	H→L+4		
	S_2	90.67 %	H-1→L+1	4.41 (281.20)	0.0975
		81.62 %	H-2→L		
	S_3	6.80 %	H→L	4.44 (278.98)	0.0936
		60.68 %	H-5→L		
$(Trp)_4 - (C_6H_{12})$	S_1	17.44 %	H-2→L+9	4.72 (262.76)	0.0448
		45.62 %	H-1→L+2		
	S_2	33.69 %	H-1→L+4	4.30 (288.12)	0.0185
		46.31 %	H→L+3		
	S_3	33.29 %	H→L+2	4.39 (282.48)	0.0510
		85.57 %	H-3→L		
	S_4	2.40 %	H-2→L+1	4.40 (281.53)	0.0588
		86.39 %	H-2→L+1		
	S_5	2.47 %	H-3→L	4.40 (281.38)	0.1039
		36.34 %	H-1→L+2		
		36.01 %	H-3→L+3	4.43 (279.72)	0.1078

obtenidos en estado gaseoso como se muestra en la Fig. 4.4, debido a la baja polaridad del ciclohexano y la ausencia de enlaces de hidrógeno entre soluto-solvente.

Para el segundo cluster $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, la Fig. 4.44 muestra los orbitales involucrados en las transiciones más relevantes, los cuales son en la mayoría de tipo $\pi\pi^*$. Se

puede identificar en este cluster que la carga se distribuye en las dos moléculas de *Trp* como efecto de su interacción. Para el tercer cluster $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$, la forma de los orbitales de los estados excitados S_1 , S_2 y S_{14} pueden relacionarse con la forma de la transición L_a para cada *Trp* que conforma el cluster, como se observa en la Fig. 4.45. Situación similar ocurre en el cluster más grande $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$ con los estados S_1 , S_3 y S_4 , cuyos orbitales se representan en la Fig. 4.46, aunque los orbitales LUMO+2 y LUMO+4 dejan ver la distribución de carga sobre otras moléculas de *Trp* vecinas.

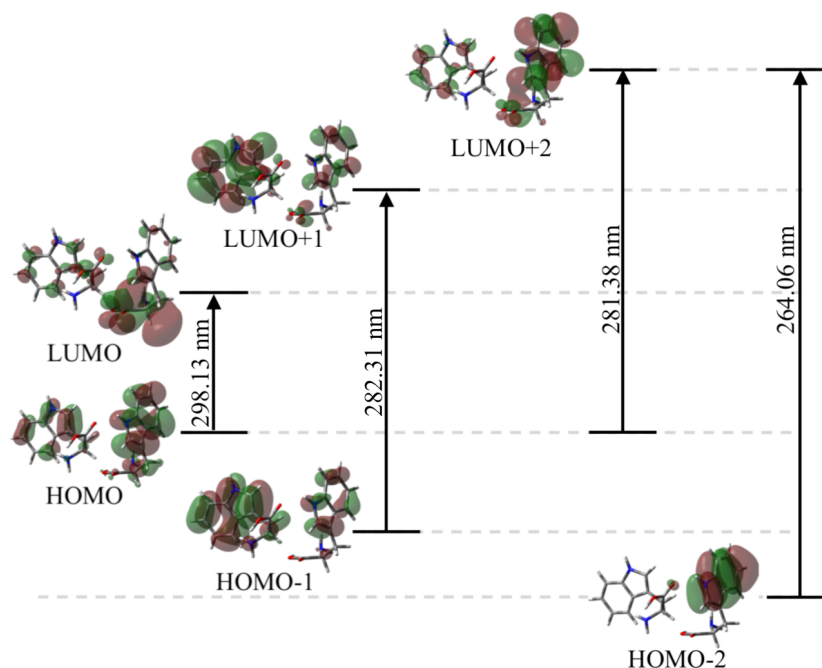


Figura 4.44: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$. Se puede notar la contribución de ambas moléculas de *Trp* en las transiciones electrónicas.

Por otro lado, el tamaño de los clusters modelados en ciclohexano permitió obtener los estados fluorescentes de los dos clusters más pequeños. La Fig. 4.47a ilustra el cambio de la geometría del sistema en el estado fundamental y estado excitado para el cluster $(Trp)_1 - (C_6H_{12})$, el enlace del *Trp* entre el grupo carboxilo y amino cambia de 1.864 a 1.880 Å. Para este cluster, la excitación de interés fue S_1 que ocurre a $\lambda = 277.1$ nm, y su respectiva emisión se obtuvo a $\lambda = 328.7$ nm. Para el segundo cluster la Fig. 4.47b muestra las respectivas geometrías, en este caso el enlace de hidrógeno del primer *Trp* aumenta de 1.838 a 1.864 Å y del segundo *Trp* aumenta de 1.818 a 1.824 Å, aunque un tercer enlace de hidrógeno aparece entre el NH del grupo indol del primer *Trp* y el O del grupo carboxilo del segundo *Trp* que se hace más fuerte en el estado excitado de 1.940 a 1.836 Å, el hecho de que este enlace sea más fuerte indica que la interacción entre las dos moléculas de *Trp* influye de manera relevante en el proceso de emisión. El estado excitado más fuerte para el segundo cluster es

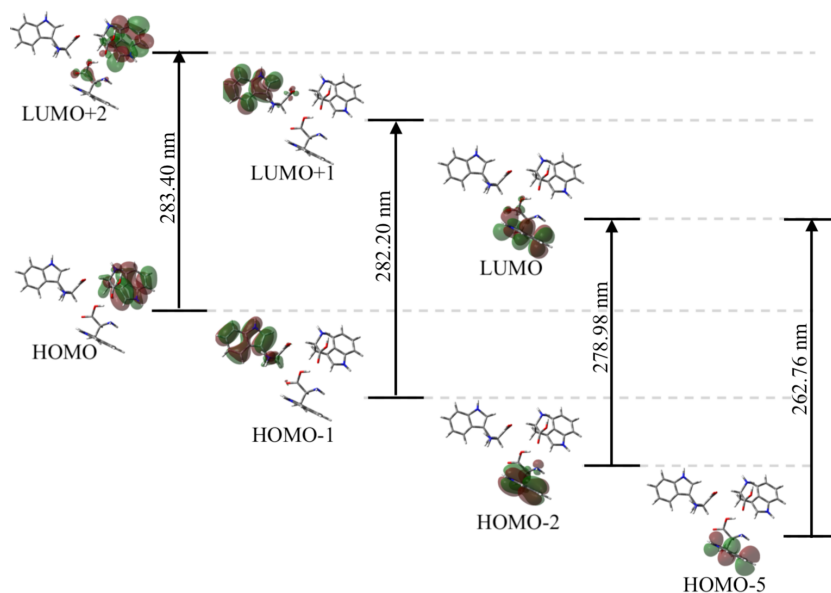


Figura 4.45: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$. Se puede notar la contribución de cada molécula de *Trp* en las transiciones electrónicas.

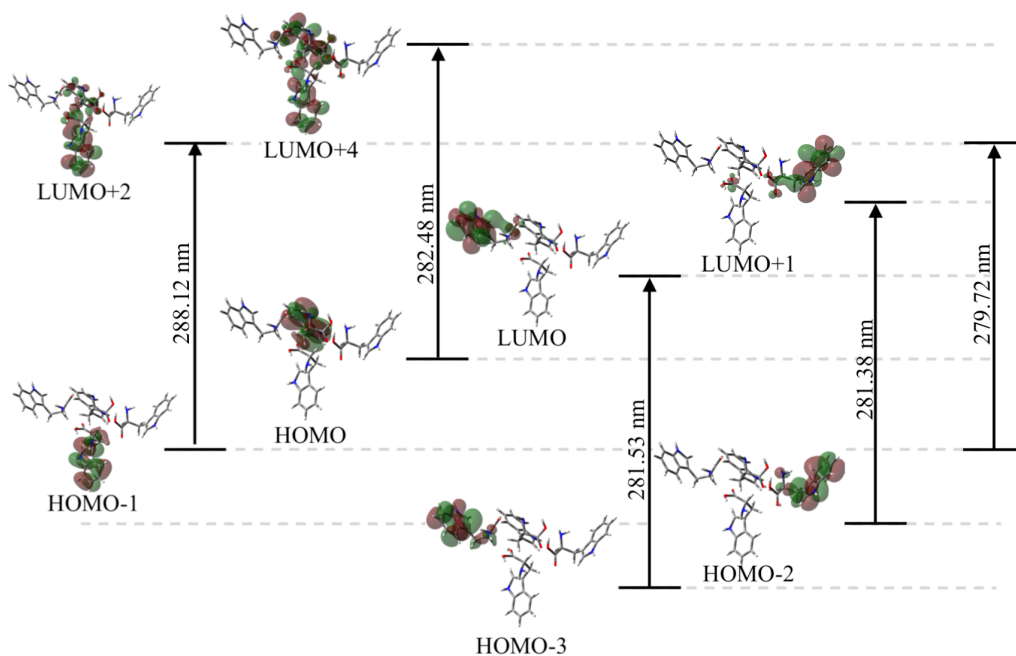


Figura 4.46: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$. En este caso se mezclan los comportamientos de los clusters $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$, se observa distribuciones de carga entre varias moléculas de *Trp* y transiciones individuales de cada molécula.

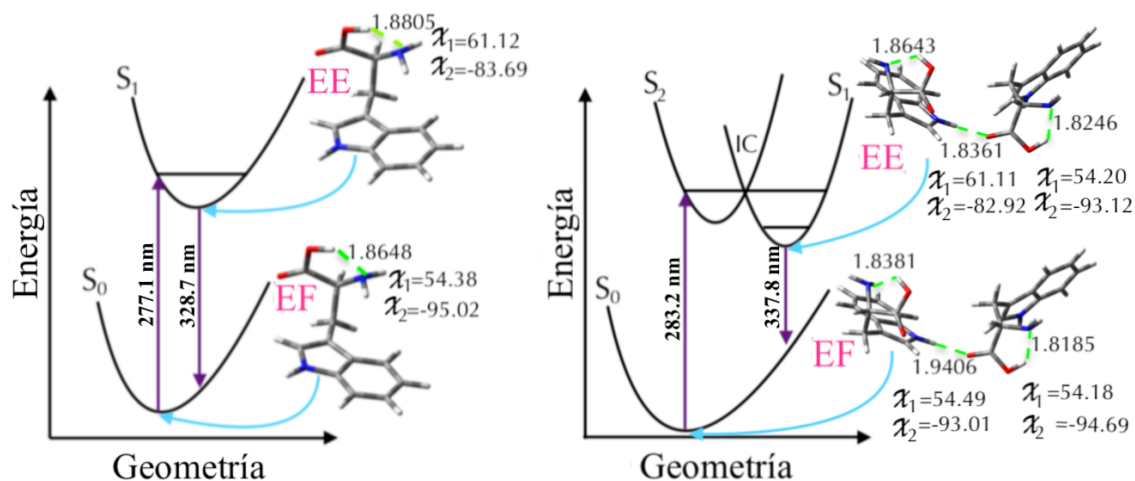


Figura 4.47: Diagrama del proceso de emisión del cluster **a)** $(Trp)_1-(C_6H_{12})$ y **b)** $(Trp)_2-(C_6H_{12})$. Se ilustran las geometrías optimizadas del estado fundamental (EF) y estado excitado (EE) fluorescente. Las líneas verdes muestran las longitudes de los enlaces de hidrógeno del *Trp* en Angstroms (Å).

S_2 con $\lambda = 283.2$ nm, en este proceso el estado S_2 se acopla con el S_1 mediante una conversión interna, luego se relaja y emite a $\lambda = 337.8$ nm. La emisión de los estados excitados de ambos clusters se compara con el máximo de la banda experimental de $\lambda = 347$ nm, como se observa en la Fig. 4.48.

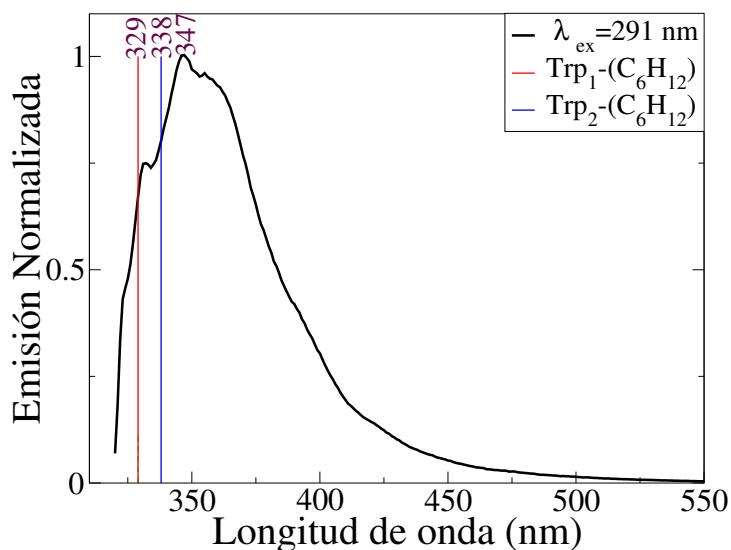


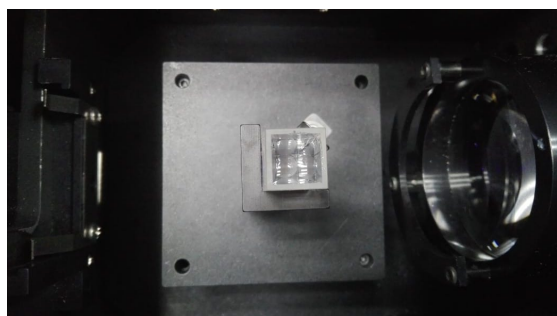
Figura 4.48: Espectro de emisión experimental de *Trp* en ciclohexano a 0.1 mM, representado por la línea negra. Los estados fluorescentes de los clusters $(Trp)_1-(C_6H_{12})$ y $(Trp)_2-(C_6H_{12})$ se representan por la línea roja y azul, respectivamente.

4.9. Estudio de Triptófano sensibilizado con Europio en agua

Debido a que el aminoácido *Trp* se encuentra en múltiples proteínas y tiene propiedades luminiscentes sobresalientes, como se ha mostrado hasta el momento. Los iones lantánidos ligados a proteínas privilegian la emisión de luz visible absorbida por aminoácidos aromáticos, tales como el *Trp*. Algunos investigadores han demostrado que la emisión de los iones lantánidos se potencia cuando se unen a una proteína, y generalmente, el *Trp* es el responsable de la transferencia de energía a los iones Ln^{3+} [97, 98]. De hecho, la interacción entre *Trp* y Eu^{3+} es más fuerte cuando el grupo amino se encuentra en su forma zwitteriónica [99]. En este sentido, es útil estudiar el proceso de absorción y emisión del complejo *Trp*- Eu^{3+} , debido a sus posibles aplicaciones biofísicas y bioquímicas. A continuación, se describe experimental y teóricamente la transferencia de energía del complejo y cómo intervienen a nivel molecular el *Trp* y Eu^{3+} en el proceso de absorción y emisión.

4.9.1. Análisis experimental

Como punto de partida para el estudio de la luminiscencia del europio sensibilizado por el *Trp* se midieron los espectros de excitación y emisión del ion Eu^{3+} en solución acuosa como muestra en la Fig. 4.49. Se prepararon cuatro soluciones de Cloruro de Europio en agua de 10, 20, 30 y 40 mM, los espectros de excitación y emisión medidos para estas soluciones presentan las mismas bandas aunque aumentan las intensidades con la concentración, en la Fig. 4.50 se presentan ambos espectros para la concentración de 10 mM. Las bandas observadas se comparan bien con las reportadas en las Tablas 2.1 y 2.2.



(a) Cubeta con solución de cloruro de Europio en agua.



(b) Emisión de solución de Cloruro de Europio en agua haciendo incidir luz con $\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$.

Figura 4.49: Imagen real de la medición.

Ahora, sobre una solución de Cloruro de Europio en agua a una concentración de 10 mM, se prepararon cuatro soluciones con *Trp* concentradas a 0.01, 0.1, 1 y

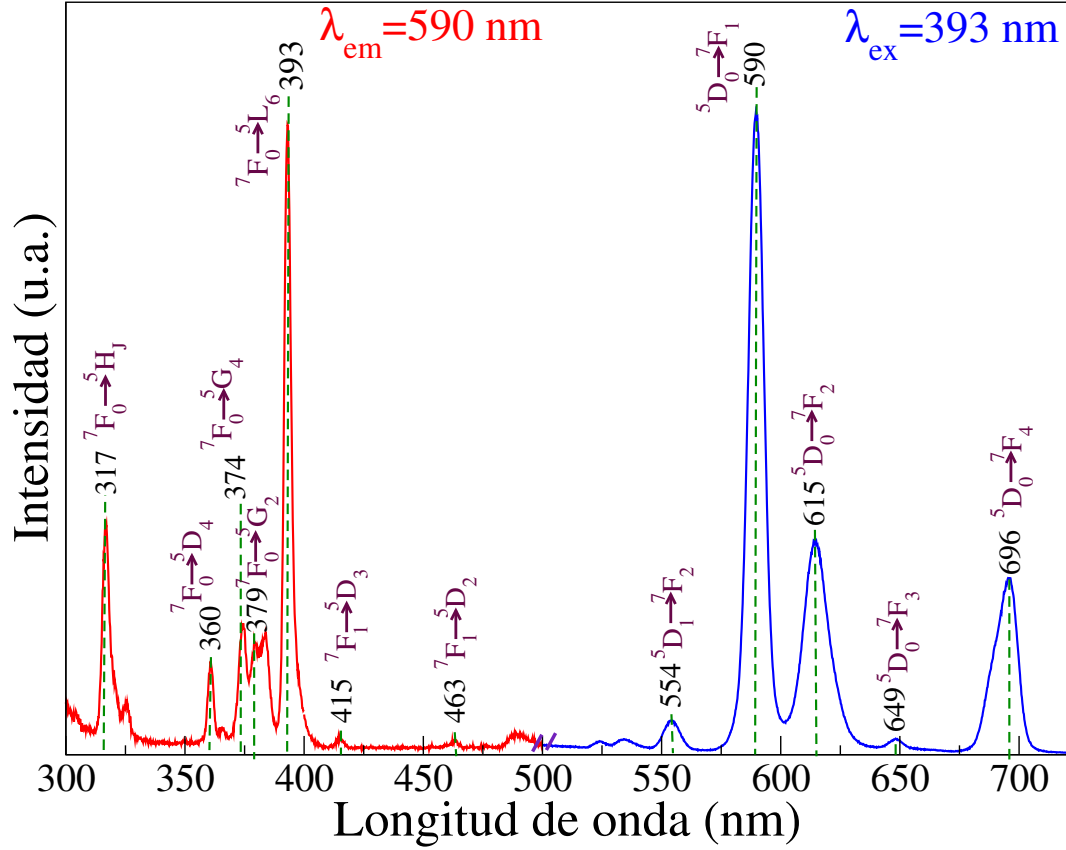


Figura 4.50: Espectro de excitación (curva roja) y emisión (curva azul) experimental del ion Eu^{3+} en agua, con sus respectivas transiciones.

10 mM. La Fig. 4.51 muestra los espectros de excitación monitoreando el Eu^{3+} con $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$, para las diferentes concentraciones de *Trp*, incluyendo la solución libre de *Trp* (curva negra) para establecer sus efectos sobre el Eu^{3+} . Las soluciones que contienen *Trp* preservan las transiciones del Eu^{3+} , aunque la intensidad varía con la concentración de *Trp* con la misma tendencia en todas las bandas representativas del Eu^{3+} . En banda más intensa asignada a ${}^7\text{F}_0 \rightarrow {}^5\text{L}_6$ ($\lambda = 393 \text{ nm}$) son evidentes los cambios en la intensidad, pues aumenta con la concentración para 0.01 y 0.1 mM, pero de decrece para las concentraciones 1 y 10 mM. Esto es consistente con el trabajo experimental de Stubenrauch [32] y colaboradores, quienes afirman que a concentraciones relativamente bajas de *Trp* se observa un máximo en la intensidad de emisión del Europio, que desaparece gradualmente al aumentar la concentración. Tal desactivación (quenching en inglés) es generada por la transferencia de energía entre activadores (*Trp*) pues ésta se activa cuando la distancia entre ellos es menor e inhibe la transferencia de energía hacia el Europio. Aunque este trabajo muestra este comportamiento para concentraciones específicas. Luego, la banda localizada a $\lambda = 305 \text{ nm}$, que no aparece para el Europio solamente, es debido a la presencia de *Trp*,

pero sólo es observado para las concentraciones de 1 y 10 mM.

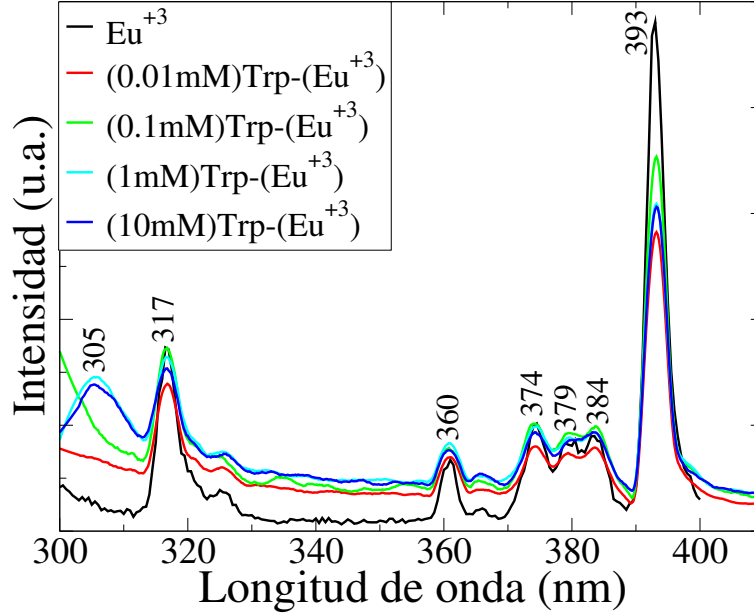


Figura 4.51: Espectros de excitación de Eu^{3+} en agua a 10 mM agregando *Trp* a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM), incluyendo el espectro de excitación de Europio sin *Trp*. En todos los casos $\lambda_{em} = 590$ nm.

Respecto al espectro de emisión, en la Fig. 4.52 se observa de nuevo que las soluciones con *Trp* mantienen las bandas características de emisión del Eu^{3+} (curva negra) con $\lambda_{ex} = 393$ nm. De igual manera al espectro de excitación, la intensidad en cada banda aumenta con la concentración para los casos de 0.01 y 0.1 mM, y luego decrece para 1 y 10 mM, como se muestra en la Fig 4.53.

Ahora bien, aún con Eu^{3+} en las soluciones, se preserva el comportamiento observado en el caso *Trp*-agua de la Fig. 4.14, donde el aumento en la concentración de *Trp* genera un corrimiento al rojo desde $\lambda = 278$ nm a $\lambda = 305$ nm cuando se monitorea la emisión del *Trp* a $\lambda = 357$ nm, como se observa en la Fig. 4.54. Por lo tanto, el proceso de fluorescencia del *Trp* no se ve afectado por la presencia del Eu^{3+} , así que la emisión del *Trp* a $\lambda = 357$ nm es independiente de la longitud de onda de excitación (a pesar de su corrimiento al rojo por concentración) y de la presencia del lantánido. De hecho, se comparó la curva de intensidad de fluorescencia en función de la concentración para las soluciones de *Trp* en agua y con Eu^{3+} en la Fig 4.55, como se puede observar las curvas mantienen la misma tendencia, a pesar de la presencia del Eu^{3+} . Por lo tanto, no hay una transferencia de energía de $\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Trp}$. Mientras que en la Fig. 4.53 se observa que la concentración de *Trp* si afecta la emisión del Eu^{3+} en la intensidad, además de que el *Trp* a concentraciones mayores a 1 mM permite la aparición de una banda en $\lambda = 305$ nm en el espectro de excitación, ver Fig. 4.51. Por consiguiente, la transferencia de energía está dada desde el $\text{Trp} \rightarrow$

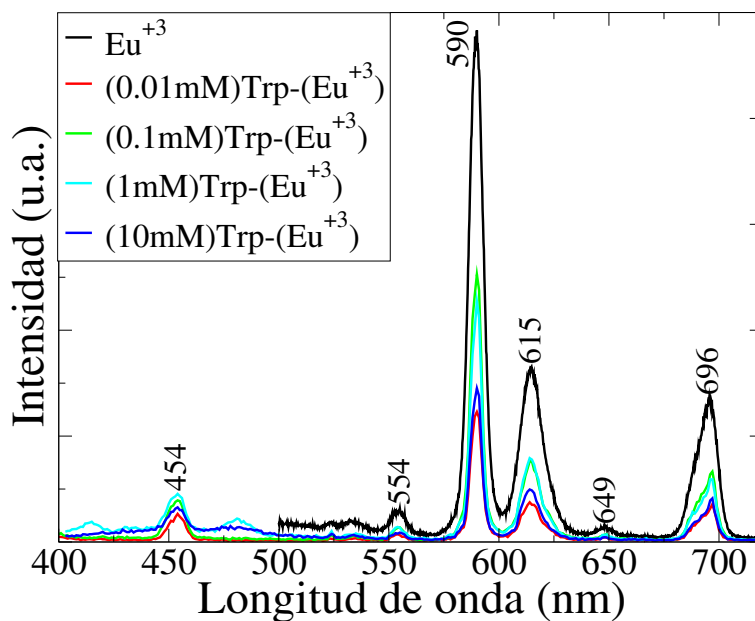


Figura 4.52: Espectros de emisión de Eu^{3+} en agua a 10 mM agregando *Trp* a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM), incluyendo el espectro de emisión de Europio sin *Trp*. En todos los casos $\lambda_{ex} = 393$ nm.

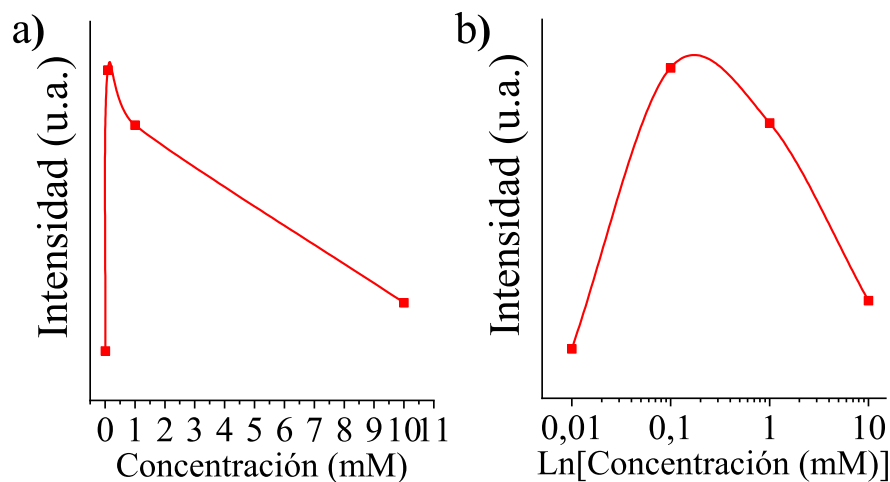


Figura 4.53: a) Intensidad de fluorescencia de Eu^{3+} bajo la presencia de *Trp* a diferentes concentraciones y b) en escala logarítmica de la concentración.

Eu^{3+} . Esta afirmación se puede comprobar excitando en la región de absorción del *Trp* y monitorear la emisión del Eu^{3+} , a través de un gráfico mapeado en 3D, como se muestra en la Fig. 4.56 para la concentración más baja. Nótese que al excitar a $\lambda = 278$ nm (λ_{ex} del *Trp* a 0.01 mM) se manifiestan las transiciones más intensas $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ del Eu^{3+} , localizadas alrededor de $\lambda = 590$ nm y $\lambda = 615$ nm.

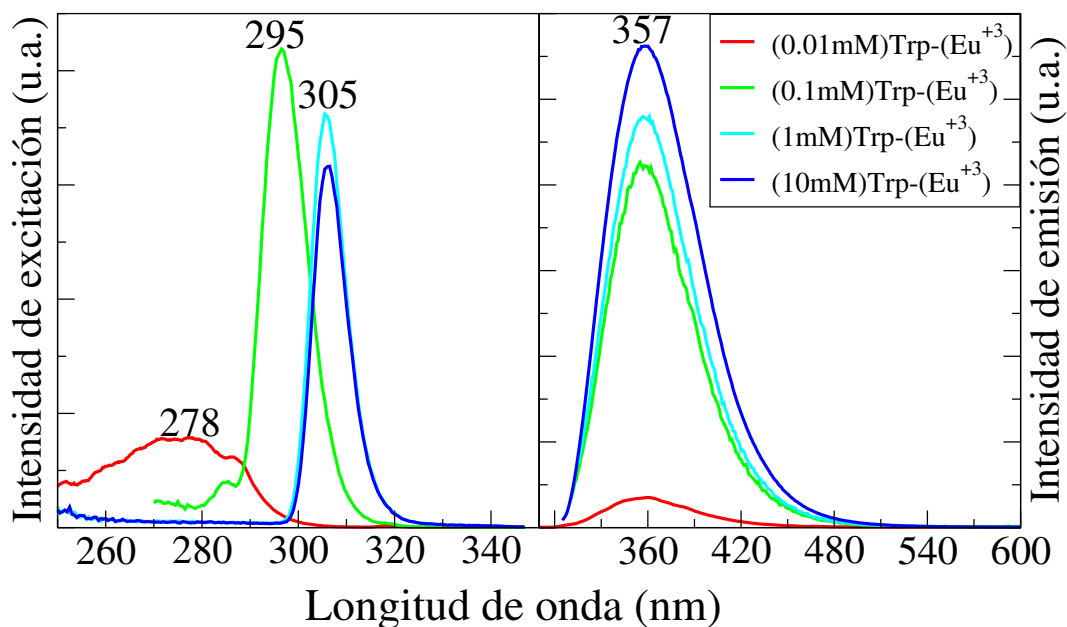


Figura 4.54: En el panel izquierdo se presentan los espectros de excitación y en el panel derecho los espectros de emisión de *Trp* a diferentes concentraciones (0.01, 0.1, 1 y 10 mM) en una solución de cloruro de Europio de 10 mM en agua.

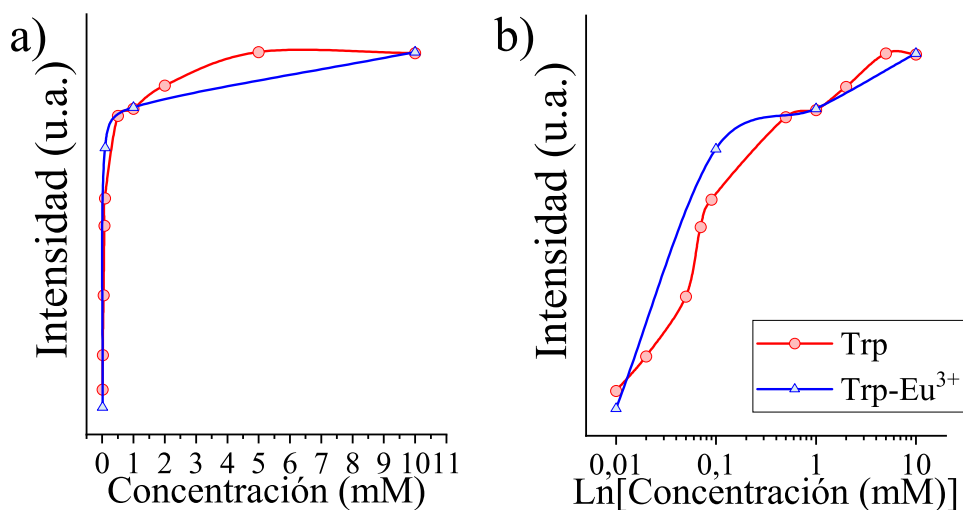


Figura 4.55: a) Intensidad de emisión de *Trp* en agua a diferentes concentraciones y b) en escala logarítmica de la concentración (curva roja) y en una solución de 10 mM de cloruro de Europio en agua (curva azul).

Asimismo, la intensidad de estas transiciones se maximiza con $\lambda_{ex} = 295$ nm, la cual se encuentra también en la banda de absorción del *Trp*.

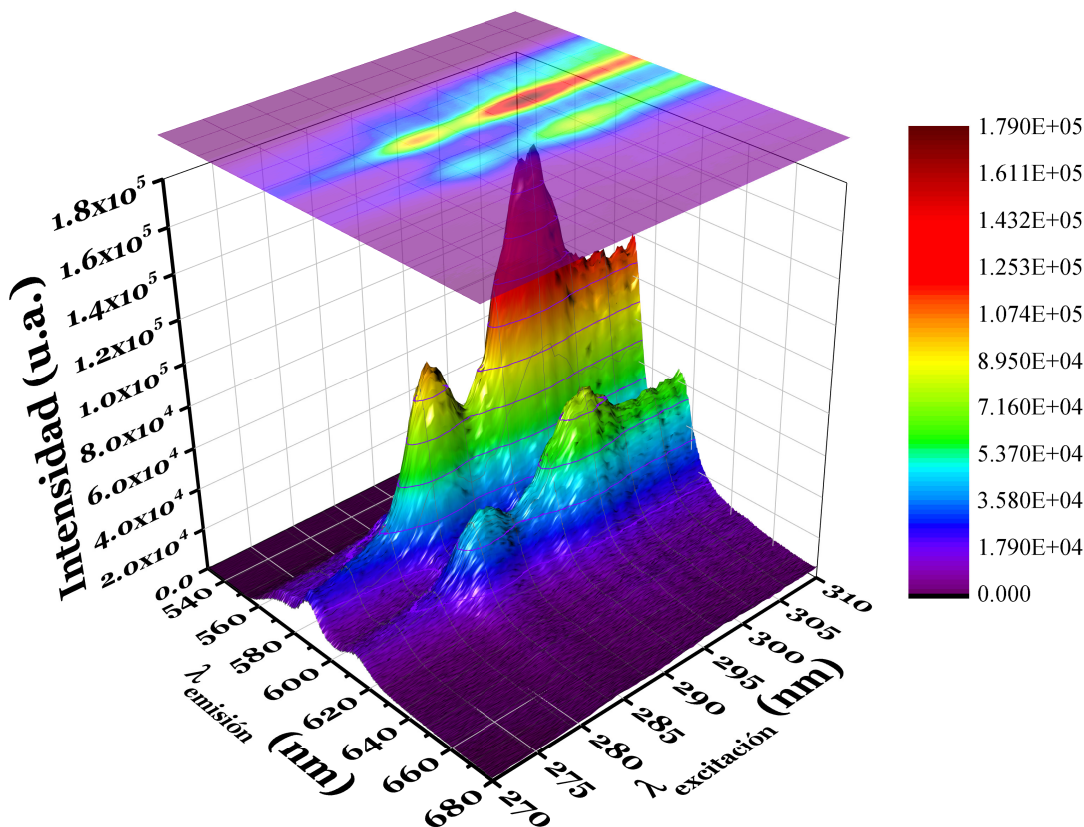


Figura 4.56: Superficie mapeada en color 3D del patrón espectral de excitación-emisión para una concentración de 0.01 mM de *Trp* en una solución de 10 mM de Eu^{3+} en agua.

De igual forma, la Fig. 4.57 muestra un mapa 3D para la concentración de *Trp* más alta, en este caso para el *Trp* $\lambda_{ex} = 305$ nm, a esta longitud de onda de excitación el mapa 3D muestra también las transiciones $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ del Eu^{3+} , se puede notar la tendencia de las curvas que siguen aumentando la intensidad por encima de $\lambda = 310$ nm, pero esto es debido al solapamiento con una banda de absorción propia del Eu^{3+} que corresponde a la transición $^7\text{F}_0 \rightarrow ^5\text{H}_J$ localizada a $\lambda = 317$ nm (ver Fig. 4.50), esto explica completamente el aumento de intensidad de la emisión del Eu^{3+} . No obstante, en este caso presenta un punto en común con la concentración más baja y es que a $\lambda_{ex} = 295$ nm, también emite el Eu^{3+} .

La Fig. 4.58 esquematiza el posible mecanismo por el que los electrones excitados en el *Trp* pueden transferir la energía al nivel $^5\text{D}_4$ y mediante un proceso de resonancia no radiativo, la energía se relaja al estado $^5\text{D}_1$ o $^5\text{D}_0$, para producir la emisión característica del Eu^{3+} por un proceso radiativo. En este proceso, la excitación del ion lantánido se logra a través del ligando orgánico (*Trp*) que actúa como sensibilizador para la emisión del lantánido. En la Fig. 4.59, se muestran los espectros de emisión,

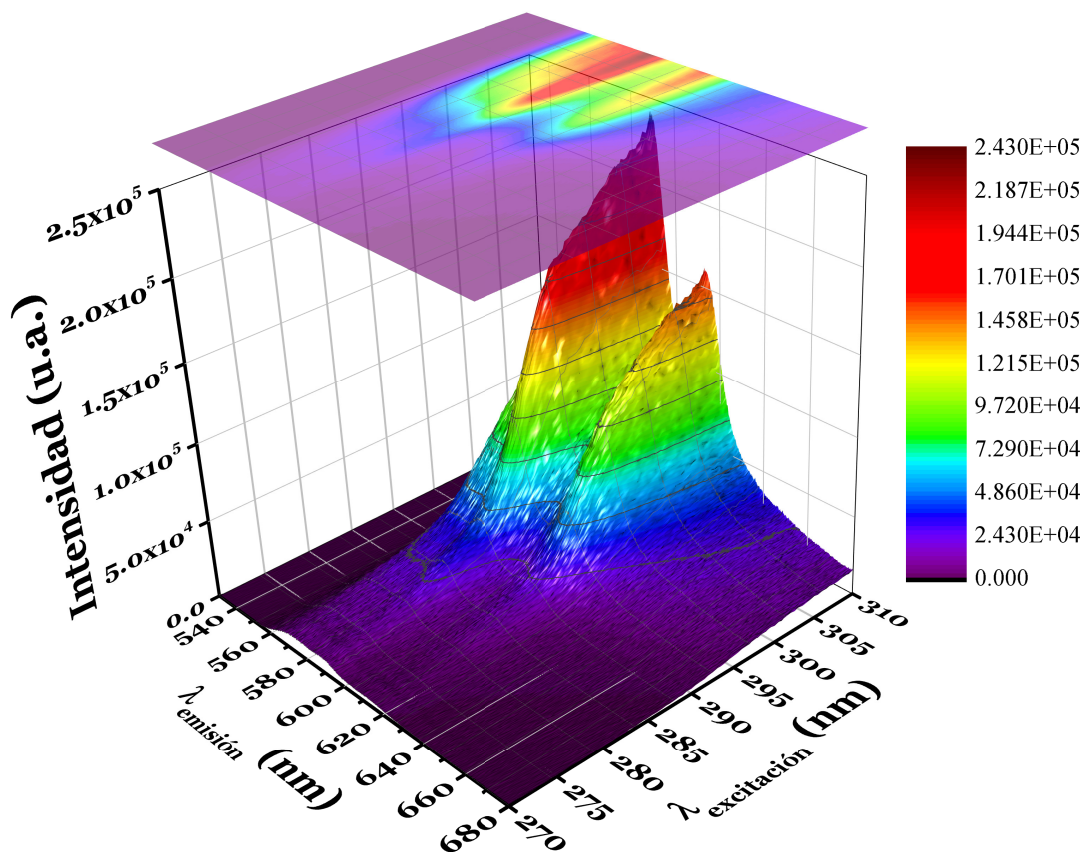


Figura 4.57: Superficie mapeada en color 3D del patrón espectral de excitación-emisión para una concentración de 10 mM de *Trp* en una solución de 10 mM de Eu^{3+} en agua.

excitando a $\lambda = 295$ nm las cuatro soluciones preparadas, se puede observar que para la concentración más baja de *Trp* (curva roja) la emisión del Eu^{3+} incrementa para las transiciones $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$, respecto de la emisión del Eu^{3+} sin *Trp*, sin embargo al aumentar la concentración de *Trp* la intensidad de emisión es cada vez menor, de hecho los agregados de *Trp* llegan a interferir en el proceso de transferencia de energía e inhiben la emisión del Eu^{3+} .

4.9.2. Análisis teórico

Como se mencionó en la sección 3.1.4 dos curvas de AO fueron calculadas en la Fig. 4.60 para el complejo de *Trp*- Eu^{3+} en agua, la primera con LUMPAC (ZINDO-Sparkle) y la segunda con Gaussian 16 (TD-DFT/B3LYP/cep-4g). Se puede notar que ambos espectros son similares en general, a pesar de que la aproximación de LUMPAC no considera los orbitales de la capa f, sólo hasta el análisis con Judd-Ofelt, así sólo se notan las líneas generadas por el medio ambiente del Eu^{3+} (dado

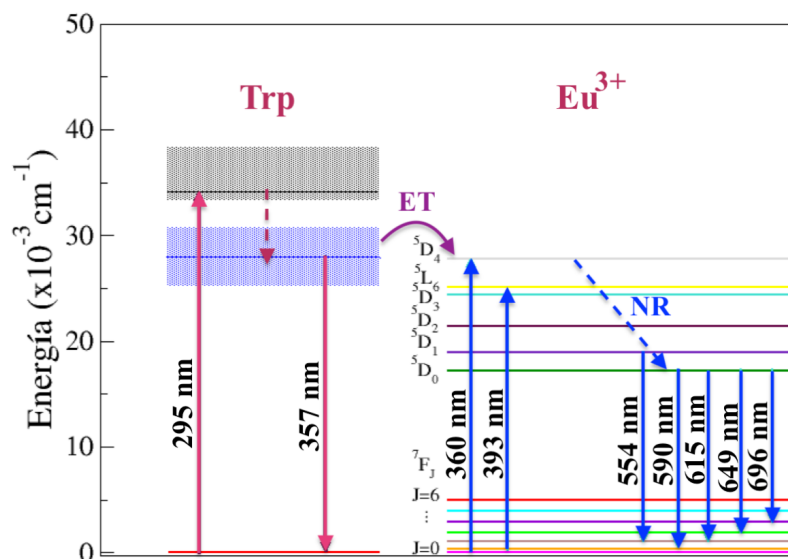


Figura 4.58: Esquema representativo de Jablonski de transferencia de energía de *Trp* a los niveles de emisión del ion Eu^{3+} .

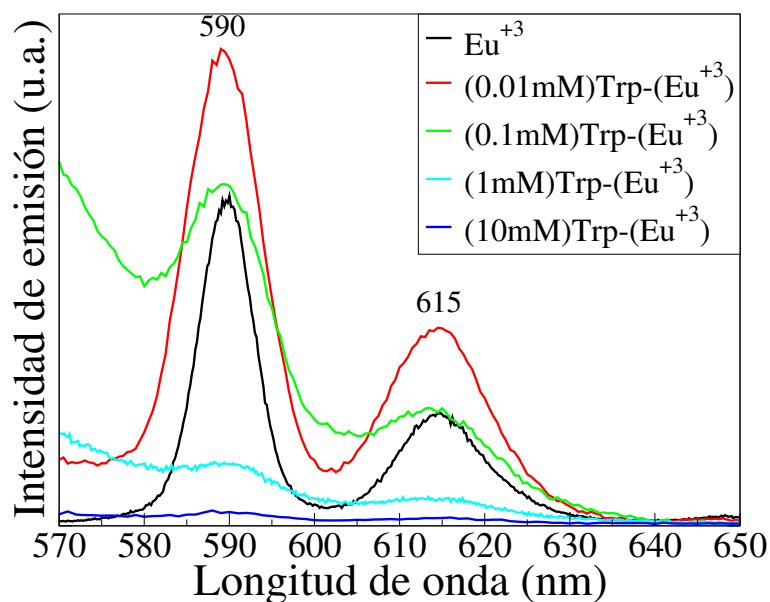


Figura 4.59: Espectros de emisión de los niveles $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (590 nm) y $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (615 nm) medidos para el complejo *Trp*- Eu^{3+} a diferentes concentraciones de *Trp* (0.01, 0.1, 1 y 10 mM) en una solución de cloruro de Europio de 10 mM en agua.

por las moléculas de agua, los átomos de cloro y el *Trp*). Estos estados excitados también son obtenidos por Gaussian, pero considerando además del medio ambiente, el ion Eu^{3+} explícitamente. Aunque ambas curvas de absorción son muy parecidas, la naturaleza de los orbitales involucrados en las transiciones es diferente. Los detalles

de los cálculos de ambos métodos se presentan en la Tabla 4.8, se puede observar que se calcularon más estados excitados con Gaussian, esto es porque el método TD-DFT identifica muchas más transiciones pero con fuerzas de oscilador casi nulas, por lo tanto sólo fueron considerados los estados excitados con mayores valores de fuerza de oscilador, que además son comparables con los estados más fuertes de LUMPAC.

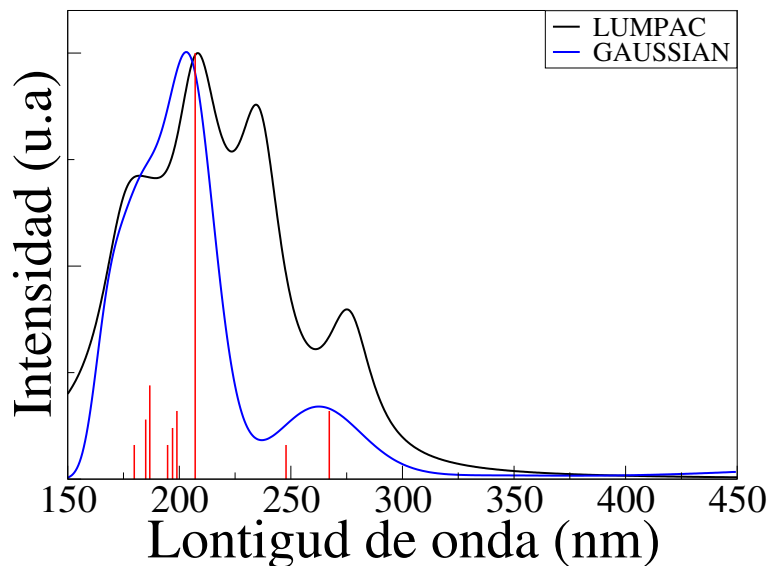


Figura 4.60: Espectros de absorción del complejo de emisión de $Trp-Eu^{3+}$ en agua calculado con LUMPAC (curva negra) y con Gaussian (curva azul). Las líneas rojas son los estados excitados calculados con Gaussian.

La Fig. 4.61 muestra los orbitales moleculares de las transiciones calculadas con LUMPAC, indicadas en la Tabla 4.8, las transiciones son de tipo $\pi\pi^*$, para los orbitales de los estados S_1 y S_2 se observa la participación del grupo indol, de hecho pueden asociarse a las transiciones L_b y L_a , respectivamente. Los orbitales de los estados S_4 y S_9 muestran una distribución de carga hacia la cadena lateral y el orbital del estado S_{21} hace evidente la participación de las moléculas de agua con la cadena lateral y menor contribución de los anillos aromáticos. Sin embargo, no se hace evidente la contribución del ion de Eu^{3+} , debido a que el método de LUMPAC lo reemplaza por una carga puntual. Es por ello que el método TD-DFT de Gaussian, complementa esta información al calcular los estados excitados con la presencia del ion de Eu^{3+} .

Las Figs. 4.62 y 4.63 muestran los orbitales moleculares involucrados en las transiciones calculadas con Gaussian. Aunque el método TD-DFT no considera el cambio de espín las excitaciones electrónicas, si considera las transiciones alpha-alpha (espín $\uparrow$) y beta-beta (espín $\downarrow$) que contribuyen a los estados excitados. El estado S_1 permite visibilizar la participación del ion de Eu^{3+} , además de su interacción con las moléculas de agua, los átomos de cloro y el *Trp*. El estado S_{10} formado por una combinación lineal de transiciones alpha y beta, en sus orbitales manifiesta la contribución princi-

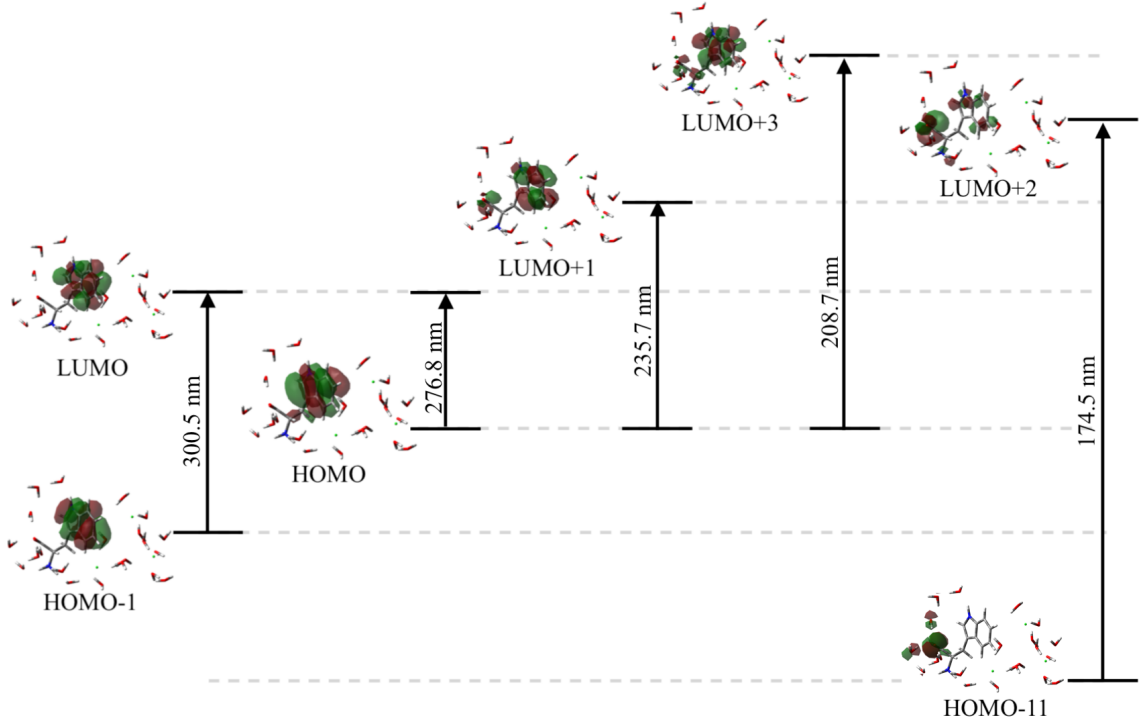


Figura 4.61: Orbitales moleculares involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo *Trp*-Eu³⁺ en agua calculadas en LUMPAC.

pal del *Trp* y en menor proporción la participación del Eu³⁺ y algunas moléculas de agua. Sin embargo, el estado S_{21} manifiesta todavía la transición *Trp*-*Trp* con orbitales similares a los de L_a . Por último, los estados S_{39} y S_{80} exponen la participación del medio, es decir de las moléculas de agua y del *Trp*.

Ahora bien, el programa LUMPAC calcula las propiedades fotofísicas teóricas, a partir del espectro de emisión medido **experimentalmente** se calculan los parámetros de Judd-Ofelt (J-O), Ω_λ^{exp} , las tasas de decaimiento radiativa (A_{rad}^{exp}) y no radiativa (A_{nrad}^{exp}) y la eficiencia cuántica (η^{exp}). Luego, a través de cálculos **teóricos** se obtienen los parámetros de intensidad de J-O (Ω_λ^{teo}), la tasa de transferencia de energía intramolecular (W_{ET}) y de transferencia de energía de retroalimentación o *back-transfer* (W_{BT}) desde los niveles singlete (S_1) y triplete (T) a los niveles emisivos, la distancia del donante a los centros aceptores del proceso de transferencia (R_L), las tasas de emisión radiativa (A_{rad}^{teo}) y no radiativa (A_{nrad}^{teo}), la eficiencia cuántica η^{teo} y el rendimiento cuántico (q). Para comenzar, los parámetros teóricos de intensidad J-O se calculan a partir de los resultados estructurales dados por el modelo semi-empírico Sparkle/RM1 definidos por la ecuación

$$\Omega_\lambda = (2\lambda + 1) \sum_{t,p} \frac{|B_{\lambda tp}|^2}{(2t + 1)}, \quad (4.2)$$

Tabla 4.8: Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición del complejo Trp -Eu³⁺ en agua, con dos métodos.

Método	Estado	Excitación de un electrón	Composición	E (cm ⁻¹) (λ (nm))	f
LUMPAC	S_1	39.81 %	H-1→L	33272.5 (300.5)	0.004
		39.34 %	H→L+1		
	S_2	90.89 %	H→L	36130 (276.8)	0.163
	S_4	43.39 %	H→L+1	42418.3 (235.7)	0.484
		29.83 %	H-1→L		
	S_9	26.36 %	H→L+3	47909 (208.7)	0.385
		18.64 %	H-1→L+1		
	S_{21}	80.50 %	H-11→L+2	57319.6 (174.5)	0.160
Gaussian	S_1	97.10 %	H-32→L [α (espín ↑)]	32579.6 (306.9)	0.0017
	S_{10}	85.18 %	H→L [β (espín ↓)]	37423.7 (267.21)	0.0557
		55.57 %	H→L+1 [α (espín ↑)]		
	S_{21}	60.12 %	H-1→L+1 [α (espín ↑)]	40351.8 (247.82)	0.0241
	S_{39}	53.69 %	H→L+2 [β (espín ↓)]	48278.8 (207.13)	0.4257
		42.66 %	H→L+3 [α (espín ↑)]		
	S_{80}	36.33 %	H→L+6 [α (espín ↑)]	53541.78 (186.77)	0.4257
		30.99 %	H-1→L+2 [β (espín ↓)]		

donde $B_{\lambda tp} = B_{\lambda tp}^{ed} + B_{\lambda tp}^{dc}$, siendo $B_{\lambda tp}^{ed}$ y $B_{\lambda tp}^{dc}$ la contribución al dipolo eléctrico (ed) y acoplamiento dinámico (dc), respectivamente.

Las tasas de transferencia de energía (ET) intramolecular para el ligando y el ion lantánido se define como

$$W_{ET} = W_{ET}^{mm} + W_{ET}^{em}, \quad (4.3)$$

siendo W_{ET}^{mm} y W_{ET}^{em} las tasas de transferencia de energía obtenidas a partir del mecanismo multipolar (Förster) y del mecanismo de exchange o intercambio (Dexter).

Detalles teóricos implementados en LUMPAC se describen en el apéndice G. El proceso que gobierna la intensidad de la luminiscencia puede describirse como una fuerte absorción inicial en la región ultravioleta por el Trp (ligando), seguida de una transferencia de energía no radiativa al ion Eu³⁺, que posteriormente emite en la región visible, así como se observa en el diagrama de niveles y trayectorias de transferencia de energía de la Fig. 4.64. La energía de los estados singlete y triplete es 33272.5 cm⁻¹ (λ = 300.5 nm) y 21119.1 cm⁻¹ (λ = 473.5 nm), respectivamente. Los parámetros de intensidad ω_λ , las tasas de decaimiento radiativa y no radiativa, la eficiencia y rendimiento cuántico resultantes del cálculo con LUMPAC se muestran en la Tabla 4.9.

La distancia entre el estado donador (singlete o triplete) del ligando Trp y el ion Eu³⁺ es R_L , para el estado S_1 es 6.1634 Å y para el estado T es 6.4221 Å. Por reglas de selección la transferencia de energía ocurre desde el estado singlete al

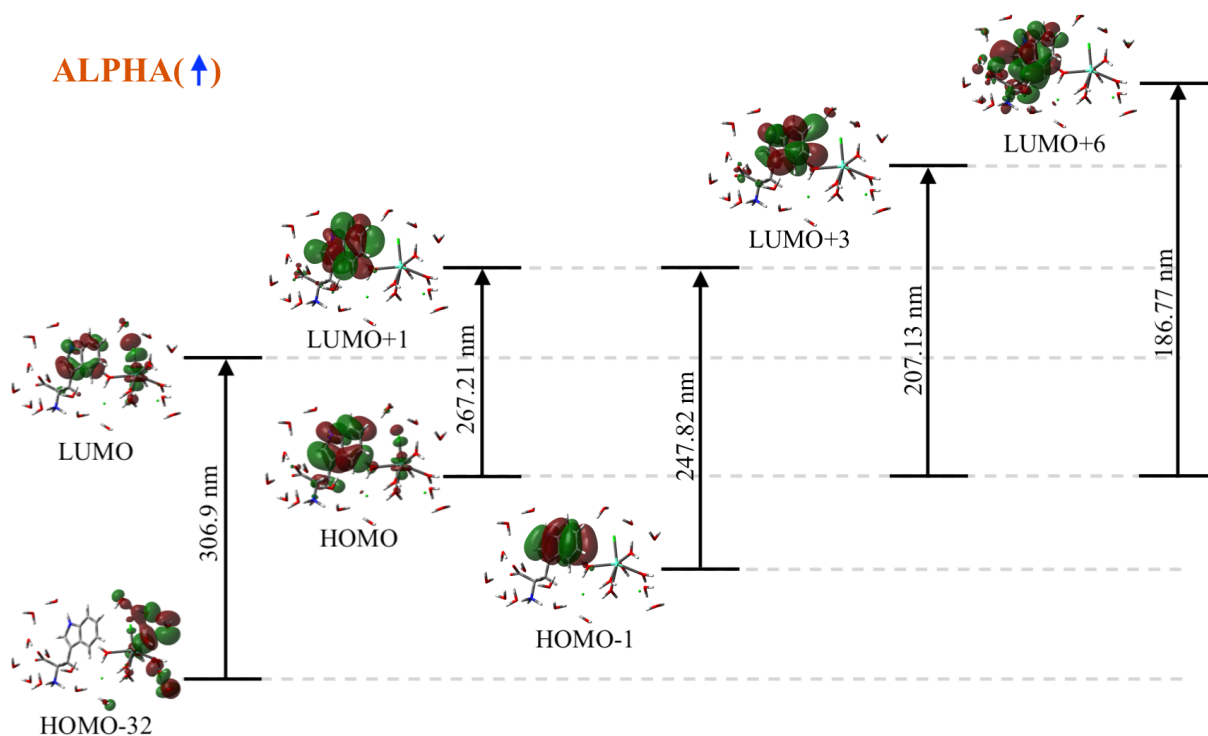


Figura 4.62: Orbitales moleculares (α , espín $\uparrow$) involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo $Trp-Eu^{3+}$ en agua calculadas en Gaussian.

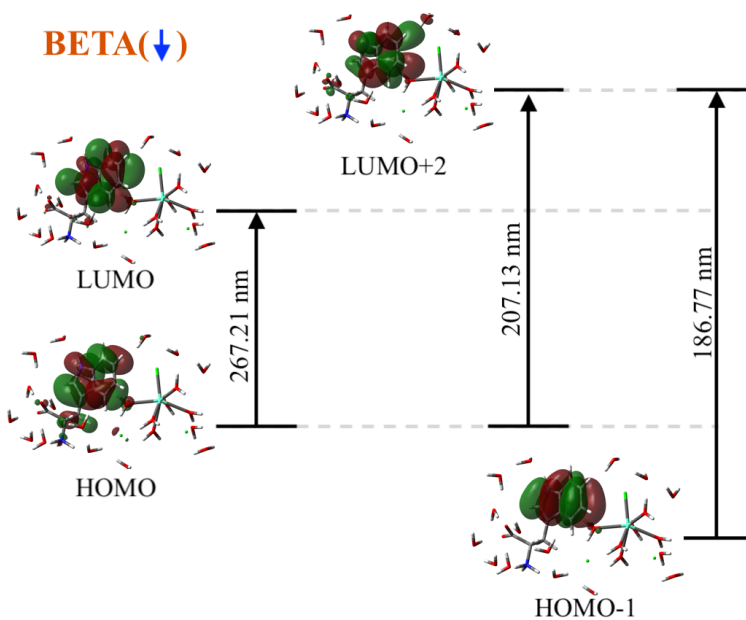


Figura 4.63: Orbitales moleculares (β , espín $\downarrow$) involucrados en las transiciones electrónicas más fuertes para el complejo $Trp-Eu^{3+}$ en agua calculadas en Gaussian.

Tabla 4.9: Valores teóricos y experimentales de los parámetros de intensidad (Ω_λ), tasas de emisión radiativa (A_{rad}) y no radiativa (A_{nrad}) y eficiencia cuántica de emisión del nivel 5D_0 del complejo Trp-Eu $^{3+}$.

Compuesto	Parámetros de Inten. ($10^{-20}cm^2$)			$A_{rad} (s^{-1})$	$A_{nrad} (s^{-1})$	$\eta (\%)$	$q(\%)$
	Ω_2	Ω_4	Ω_6				
Trp-Eu $^{3+}$ (Exp.)	1.0	1.58	-	106.48	893.52	10.6	-
Trp-Eu $^{3+}$ (Teo.)	1.0	1.58	0.01	103.07	927.861	10	9.88

nivel 5D_4 dada a través del mecanismo multipolar, mientras que la transferencia de energía del estado triplete al nivel emisor 5D_1 implica un mecanismo de intercambio o exchange, igualmente en el nivel 5D_0 . Asimismo, las tasas de transferencia y de retroalimentación o *back-transfer* entre el ligando y los niveles del Eu $^{3+}$ 5D_4 , 5D_1 y 5D_0 se muestran en la Tabla 4.10 y la representación esquemática esta dada en la Fig. 4.64. Las tasas W_{ET} y W_{BT} indican valores destacados para la trayectoria triplete $\rightarrow ^5D_{0,1}$ donde las interacciones de exchange son dominantes, mientras que para la trayectoria singlete $\rightarrow ^5D_4$, donde las interacciones son multipolares, los valores son inferiores. Esto indica que los estados triplete del *Trp* y 5D_1 del Eu $^{3+}$ resuenan en el complejo. De forma que se puede predecir que el proceso de transferencia de energía predominante sigue la trayectoria $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow T \rightarrow ^5D_1$, $^5D_0 \rightarrow ^7F_{0-4}$. De hecho la contribución a las transiciones $^5D_0 \rightarrow ^7F_J$ son $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ (47.76 %), $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ (29.11 %) y $^5D_0 \rightarrow ^7F_4$ (23.12). Nótese que las transiciones con mayor contribución $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ y $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ son las medidas experimentalmente en las Figs. 4.56 y 4.57.

Tabla 4.10: Energías del estado singlete y triplete, mecanismo multipolar y de exchange, valores R_L (distancia entre el estado donante y aceptor, involucrados en el proceso de transferencia de energía), tasa de transferencia de energía (W_{ET}) y de retroalimentación o *back-transfer* (W_{BT}).

Estado del ligando (cm^{-1})	Estado 4f (cm^{-1})	Mecanismo	R_L (Å)	Tasa de transferencia (s^{-1})	Tasa de retroalimentación (s^{-1})
$S_1(33272.5) \rightarrow$	$^5D_4(27600)$	Multipolar	6.1634	$W_{ET1} = 5.77 \times 10^2$	$W_{BT1} = 8.26 \times 10^{-10}$
$T(21119.1) \rightarrow$	$^5D_1(18979)$	Exchange	6.4221	$W_{ET2} = 2.90 \times 10^7$	$W_{BT2} = 1.27 \times 10^3$
$T(21119.1) \rightarrow$	$^5D_0(17227)$	Exchange	6.4221	$W_{ET3} = 2.84 \times 10^7$	$W_{BT3} = 3.05 \times 10^{-1}$

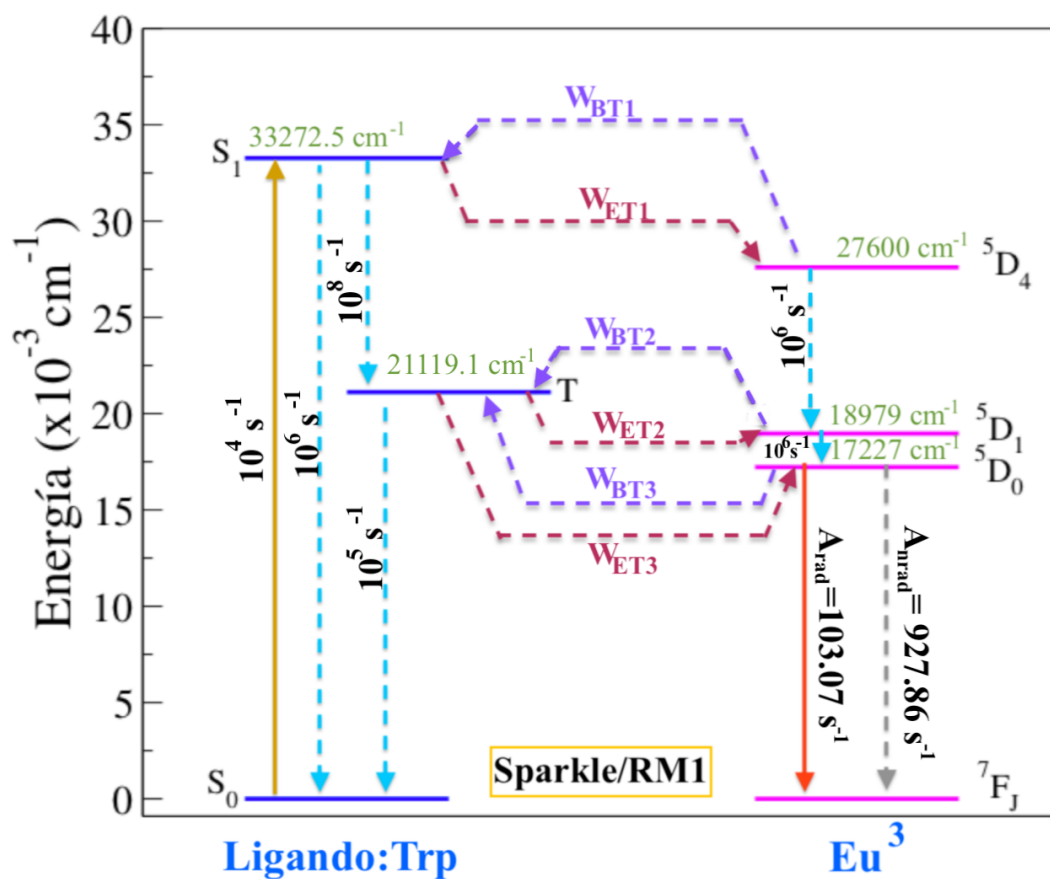


Figura 4.64: Diagrama de Jablonski para el complejo $\text{Eu}^{3+}(\text{Trp})$ en agua que muestra las trayectorias más probables para la transferencia de energía intramolecular.

Capítulo 5

Conclusiones

- Los espectros de excitación y emisión medidos en diferentes solventes hacen evidente la sensibilidad del *Trp* a la polaridad del medio ambiente. En este estudio se establece cómo cambian los procesos de luminiscencia del *Trp* en agua, acetona y ciclohexano.
- En agua, se observó experimentalmente un corrimiento al rojo de la longitud de onda de excitación de 278 a 305 nm, generado por la concentración de *Trp* en agua de 0.01 a 10 mM. Por lo tanto, a altas concentraciones la energía de excitación es menor. Teóricamente, se estudiaron a nivel molecular, además de la estabilidad zwitteriónica del *Trp*, las interacciones entre los grupos indoles, las cadenas laterales y las moléculas de agua de los clusters construidos.
- Se encontró que la contribución de las moléculas de agua alrededor del *Trp* es relevante debido los enlaces de hidrógeno, sin embargo la interacción entre moléculas de *Trp* cada vez más cercanas (situación análoga a aumentar la concentración), sería la razón más importante por la que se genera el desplazamiento de las líneas espectrales. Adicionalmente, se descubrió que las partes del sistema importantes en el proceso de emisión, dada a $\lambda = 357$ nm, son el zwitterión del grupo amino y el anillo pirrol, pues sus enlaces de hidrógeno se fortalecen en el estado fluorescente.
- En acetona, la variación en la concentración sólo genera un incremento en la intensidad de los espectros de excitación y emisión, los cuales producen un máximo en $\lambda = 344$ nm y $\lambda = 381$ nm, respectivamente. Se demostró teóricamente que el *Trp* en acetona es estable en su forma zwitteriónica, pues al comparar la energía total de las estructuras neutra y zwitteriónica, esta última tiene un valor menor. Asimismo, los orbitales involucrados en la absorción calculada a $\lambda = 334$ nm muestran transferencia de carga del *Trp* a las moléculas de acetona circundantes, aunque la transferencia *Trp-Trp*+acetona no desaparece, se localiza en $\lambda = 288$ nm teóricamente y a $\lambda = 291$ nm experimentalmente, pero con

menor intensidad. Los clusters que se forman en soluciones de acetona son muy grandes, pero consistentes con los resultados de absorción experimentales, desafortunadamente esa también es la razón por la que no es posible el desarrollo del cálculo de emisión para hacer una comparativa.

- En ciclohexano, la baja polaridad del solvente inhibe la formación de enlaces de hidrógeno soluto-solvente, y también la posibilidad de protonar el *Trp*, así que su estructura más estable es la neutra. En este solvente, el máximo de excitación se midió en $\lambda = 291$ nm y de emisión en $\lambda = 347$ nm. Los orbitales moleculares de las transiciones electrónicas calculadas muestran similitudes con el caso de *Trp* en fase gaseosa, y al incrementar las moléculas de *Trp* mantienen un máximo alrededor de $\lambda = 280$ nm, sin embargo este hecho permite que se manifiesten pequeñas transiciones de longitudes de onda más largas (por ejemplo 288 nm), que acercan más al valor experimental. Respecto a la emisión, los átomos relevantes son el NH del grupo indol y un O del grupo carboxilo que se fortalecen en dicho proceso.
- Las simulaciones desarrolladas en este trabajo, utilizando el método TD-DFT, arrojan resultados espectroscópicos que están en buen acuerdo con los experimentales, por lo tanto permiten comprender mejor la luminiscencia del *Trp* a nivel molecular. Asimismo, en este trabajo se muestra cómo el *Trp* actúa como sensibilizador para la luminiscencia del ion Eu^{3+} en solución acuosa. Entender el proceso de absorción, transferencia de energía y de emisión del complejo *Trp*- Eu^{3+} con resultados teóricos y experimentales comparables, que permiten entrever las interacciones moleculares involucradas en las transiciones electrónicas, aporta significativamente a las posibles aplicaciones biofísicas y bioquímicas de lantánidos unidos a proteínas que contengan *Trp*.
- Experimentalmente, bajas concentraciones de *Trp* en una solución de Eu^{3+} en agua generan una fuerte absorción del *Trp* a $\lambda = 295$ nm, y a través de un proceso de transferencia de energía, la emisión de los niveles $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ del ion de Eu^{3+} se intensifica. Comparado con la emisión estos niveles en ausencia de *Trp*, el aumento de la concentración de *Trp* genera una clara tendencia a disminuir la luminiscencia del Eu^{3+} (*quenching*) excitando a esa longitud de onda.
- No se puede omitir el hecho que a altas concentraciones, la máxima excitación del *Trp* a $\lambda = 305$ nm comienza a superponerse con la excitación del Eu^{3+} a $\lambda = 317$ nm, para maximizar la emisión de los niveles $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$ y $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$ del ion de Eu^{3+} . Teóricamente se demostró, a través de la teoría de J-O, aplicada por el software LUMPAC, que la transferencia de energía ocurre del *Trp* al ion Eu^{3+} . De hecho las trayectorias de transferencia de energía más probables están

dadas desde el estado S_1 al nivel 5D_4 por un mecanismo de Förster y desde el estado T al nivel 5D_1 por un mecanismo de Dexter.

- El complejo $Trp-Eu^{3+}$ modelado representa una relación 1 a 1 de Trp y Eu^{3+} , respectivamente, lo cual equivale a la realización experimental de la concentración 10 mM de Trp y 10 mM de $EuCl_3$, así la excitación experimental de $\lambda = 305$ nm se compara muy bien con la absorción del estado S_1 a $\lambda = 300.5$ nm.

Apéndice A

Aspectos generales de los métodos PM3 y PM6

Existen varios métodos semi-empíricos, aquí se discuten de forma general los empleados para los cálculos desarrollados en el trabajo de investigación.

Método de parametrización PM3

El método PM3 tiene sus bases en la desestimación modificada de solapamiento diatómico modificado (MNDO por sus siglas en inglés), la cual tiene ciertas deficiencias, particularmente es un método que puede ser mejorado si se parametriza correctamente. Así, los parámetros propuestos por Stewart en 1988 [50] corrigen varios errores presentes en MNDO.

Inicialmente, es importante mencionar de forma general cómo se utilizan los parámetros utilizados por MNDO. El calor de formación está dado por

$$\delta H_f = E_{elec} + E_{nucl} - \sum_A E_{el}^A + \sum_A \delta H_f^A, \quad (\text{A.1})$$

donde δH_f^A es el calor de formación del átomo A experimental, E_{el}^A es la energía de formación del átomo A calculada a partir de su ion

$$E_{el}^A = f(P_{ii}, U_{ii}, \langle ii|jj \rangle, \langle ij|ij \rangle), \quad (\text{A.2})$$

donde P_{ii} , es el orbital atómico en el estado base del orbital atómico i , U_{ii} son las energías de un electrón de los orbitales atómicos del ion resultante de eliminar los electrones de valencia, estos parámetros se representan por U_{ss} y U_{pp} , $\langle ii|jj \rangle$ son las integrales de dos electrones de un centro que, generalmente se encuentran cinco integrales por átomo, representadas por los parámetros $\langle ss|ss \rangle = G_{ss}$, $\langle ss|pp \rangle = G_{sp}$, $\langle pp|pp \rangle = G_{pp}$, $\langle pp|p'p' \rangle = G_{p2}$ y $\langle sp|sp \rangle = H_{sp}$, siendo p y p' los orbitales atómicos de tipo p sobre un mismo centro, y difieren en su forma funcional angular.

La energía de repulsión núcleo-núcleo esta dada por

$$E_{nucl} = \sum_{i < j} E_N(i, j), \quad (\text{A.3})$$

considerando

$$E_N(i, j) = Z_A Z_B \langle AA|BB \rangle (1 + e^{(-a_A R_{ij})} + e^{(-a_B R_{ij})}) + \frac{Z_i Z_j}{R_{ij}} \left(\sum_{\kappa} a_{\kappa A}^{-b_{\kappa}} e^{A(R_{ij} - c_{\kappa A})^2} + \sum_{\kappa} a_{\kappa B}^{-b_{\kappa}} e^{B(R_{ij} - c_{\kappa B})^2} \right), \quad (\text{A.4})$$

aquí $\langle AA|BB \rangle$ es la integral de dos centros de tipo $\langle ss|ss \rangle$, Z_i es el número de electrones de valencia del átomo i y R_{ij} es la distancia interatómica. De la expresión (A.4), sólo se considera el primer término para MNDO, posteriormente el método semi-empírico consideró el segundo término para corregir el exceso de repulsiones core-core de largo alcance. Las cantidades a_A , $a_{i\kappa}$, $b_{i\kappa}$ y $c_{i\kappa}$ son parámetros optimizables.

La energía electrónica total es

$$E_{elec} = \frac{1}{2} \mathbf{P}(\mathbf{H} + \mathbf{F}), \quad (\text{A.5})$$

siendo $\mathbf{P}$ la matriz densidad, $\mathbf{H}$ la matriz de un electrón y $\mathbf{F}$ la matriz de Fock. Ahora bien, los elementos de la matriz de Fock que conectan los orbitales de diferentes átomos, se puede expresar como

$$\mathbf{F}_{\mu\nu} = \frac{S_{\mu\nu}}{2} (\beta_{\mu} + \beta_{\nu}) - \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \langle \mu\lambda|\nu\sigma \rangle, \quad (\text{A.6})$$

donde β_{μ} y β_{ν} son parámetros atómicos de tipo β_s o β_p , $S_{\mu\nu}$ es el solapamiento de dos orbitales atómicos de Slater de tipo

$$\phi_{\mu} = N r^{n-1} e^{-\xi_r} Y_l^m(\Theta, \phi), \quad (\text{A.7})$$

siendo ξ_r un orbital atómico de tipo ξ_s o ξ_p , $\langle \mu\lambda|\nu\sigma \rangle$ son funciones complicadas de los orbitales de Slater y de las integrales de dos electrones de un centro.

Es posible identificar 12 parámetros según lo mencionado anteriormente para MNDO, de las cuales 7 fueron optimizadas U_{ss} , U_{pp} , β_s , β_p , ξ_s , ξ_p y a , las 5 restantes G_{ss} , G_{sp} , G_{pp} , G_{p2} y H_{sp} se les asignaron valores a partir de espectros atómicos. El método AM1 introdujo un segundo conjunto de parámetros que representan la interacción gaussiana core-core, pero bajo esta consideración cada átomo puede tener hasta cuatro gaussianas, lo cual genera 12 parámetros más, así cada elemento con AM1 se describe por 10-19 parámetros.

El método paramétrico número 3, PM3, considera 18 parámetros para cada elemento, excepto para el hidrógeno que considera 11 parámetros. Tales parámetros son $P = P_1, \dots, P_i, \dots, P_N (i = 1, N)$, que representan U_{ss} , U_{pp} , β_s , β_p , ξ_s , ξ_p , a , G_{ss} , G_{sp} , G_{pp} , G_{p2} , H_{sp} , a_1 , b_1 , c_1 , a_2 , b_2 y c_2 , para el hidrógeno los parámetros que implican los orbitales tipo p evidentemente no son considerados [50].

Método de parametrización PM6

Este método semi-empírico es de nuevo una modificación del PM3 en el término de interacción core-core y de los parámetros optimizados. Principalmente, este método se caracterizó por la inclusión de metales de transición en la optimización de parámetros. Como resultado predice los calores de formación para compuestos de interés en bioquímica mejor que algunos métodos tales como Hartree Fock o B3LYP/6-31G(d). La razón por la que la precisión de este método sea buena es, probablemente, el uso de datos de referencia derivados de métodos de alto nivel y el desarrollo de mejores herramientas para detectar errores en una fase temprana del desarrollo del método [35].

Apéndice B

Funciones Base

Las funciones base son un conjunto de funciones matemáticas, cuyas combinaciones lineales producen orbitales moleculares (MOs por sus siglas en inglés), de la siguiente manera

$$\begin{aligned}
 \Psi_1 &= c_{11}\phi_1 + c_{21}\phi_2c_{31}\phi_3 + \cdots + c_{m1}\phi_m \\
 \Psi_2 &= c_{12}\phi_1 + c_{22}\phi_2c_{32}\phi_3 + \cdots + c_{m2}\phi_m \\
 \Psi_3 &= c_{13}\phi_1 + c_{23}\phi_2c_{33}\phi_3 + \cdots + c_{m3}\phi_m \\
 &\vdots \\
 \Psi_m &= c_{1m}\phi_1 + c_{2m}\phi_2c_{3m}\phi_3 + \cdots + c_{mm}\phi_m,
 \end{aligned} \tag{B.1}$$

teniendo en cuenta que c_{mm} son los coeficientes de peso que deben ajustarse en un proceso SCF para obtener el mejor Ψ_m . Una forma más compacta de representar los MOs Ψ y las funciones base ϕ es definiendo el MO i -ésimo, Ψ_i

$$\Psi_i = \sum_{s=1}^m c_{si}\phi_s, \quad i = 1, 2, 3, \cdots, m, \tag{B.2}$$

donde se ha expandido cada MO, Ψ , en términos de las m funciones base, c_{si} son los coeficientes de peso de la s -ésima función base del i -ésimo MO y ϕ_s es la s -ésima función base.

La distribución de electrones alrededor de un átomo puede representarse de diferentes formas, como lo son las funciones similares a las del hidrógeno, que se obtienen de solucionar la ecuación de Shrödinger para el átomo de hidrógeno, funciones polinómicas con parámetros ajustables, funciones de Slater ($\phi = ae^{-br}$) y funciones de Gauss ($\phi = ae^{-br^2}$). Sin embargo, las últimas dos son las más sencillas matemáticamente y las más utilizadas actualmente como funciones base en cálculos moleculares, específicamente las funciones de Slater son empleadas en cálculos semi-empíricos y las funciones de Gauss son empleadas en cálculos ab initio [101].

Considerar una sola función gaussiana para los orbitales moleculares es una mala aproximación a la descripción ideal de una función de onda atómica, proporcionada

por una función de Slater, lo que representa un orbital de tipo Slater aproximado por una gaussiana (STO-1G). Sin embargo, una combinación lineal de tres gaussianas que aproximan un orbital de tipo Slater (STO-3G) se ajustan mejor [101]. De manera que la base STO-3G se convierte en la base más pequeña utilizada en cálculos ab-initio y para el átomo de hidrógeno se define como [39]

$$\begin{aligned}\phi(STO - 3G) &= 0,4446 \left(\frac{2\alpha}{\Pi}\right)^{3/4} e^{-\alpha r^2} + 0,5353 \left(\frac{2\alpha}{\Pi}\right)^{3/4} e^{-\alpha r^2} + 0,1543 \left(\frac{2\alpha}{\Pi}\right)^{3/4} e^{-\alpha r^2} \\ &= 0,0835e^{-0,1689r^2} + 0,2678e^{-0,6239r^2} + 0,2769e^{-3,4253r^2}.\end{aligned}\tag{B.3}$$

Conjunto de bases 6-31G y 6-311G

Ambos conjuntos de bases 6-31G y 6-311G se pueden emplear en sistemas relativamente pequeños, ya que estos conjuntos de bases están compuestos de más funciones gaussianas. La capa de valencia de cada átomo del conjunto de bases 6-31G se divide en una parte interna, compuesta por 3 gaussianas, y una parte externa compuesta por 1 gaussiana, representado por 31. Luego, cada orbital del core se representa por una función base compuesta de 6 gaussianas, lo que explica en nombre 6-31G y es del tipo doble zeta. Por ejemplo, para el átomo de Carbón la función 1s se representa por 6 gaussianas, la parte interna $2s'$, $2p'_x$, $2p'_y$ y $2p'_z$, cada una compuesta por 3 gaussianas y la parte externa $2s''$, $2p''_x$, $2p''_y$ y $2p''_z$, cada una compuesta por 1 gaussiana, y 6 funciones mas $3d$, haciendo un total de 15 funciones base, lo que genera 15 MO's.

La base 6-31G ha demostrado ser buena en la optimización de geometrías, ya que frecuentemente proporciona energías relativas razonables. En ocasiones es útil considerar funciones de polarización en la base de los hidrógenos con 3 funciones $2p$ en cada átomo de H y He (además de las funciones $1s'$ y $1s''$), esta base se llama 6-31G(d,p) y es muy conveniente utilizar cuando existen enlaces de hidrógeno importantes [101].

Ahora bien, los electrones en un orbital virtual se encuentran relativamente libres y, en promedio, a una distancia mayor de los núcleos que del core o de los electrones de enlace. Estas nubes de electrones ocurren en moléculas con aniones y moléculas electrónicamente excitadas, y para simular bien su comportamiento es conveniente usar funciones difusas. Estas funciones son de tipo gaussianas que generan un decaimiento lento con la distancia r , a través de un coeficiente α ($e^{\alpha r^2}$). Los conjuntos de bases con funciones difusas tienen una sola gaussiana por cada orbital atómico de valencia de los átomos pesados. Estas funciones pueden complementar la base 6-31G y se representa como 6-31+G, de forma que para el átomo de Carbono consideraría las funciones $1s$, $2s'$, $2p'_x$, $2p'_y$, $2p'_z$, $2s''$, $2p''_x$, $2p''_y$, $2p''_z$, 6 funciones $3d$, $2s+$, $2px+$, $2py+$ y $2pz+$; en total 19 funciones base.

La base 6-31+G(d,p) tiene un tamaño de funciones moderado. Sin embargo, existe una base aún más grande, pero no demasiado grande, etiquetada como 6-311+G(d,p). Esta base tiene una valencia dividida en tres capas (triple zeta), la primera compuesta

por 3 gaussianas, la segunda por 1 gaussiana y la tercera por 1 gaussiana. Luego, los orbitales del core están representados por una función base compuesta de 6 gaussianas, y cada átomo pesado tiene 5 funciones $3d$ y cada hidrógeno y helio tiene 3 funciones $2p$. En este sentido, el átomo de Carbón tendría las funciones para $1s$, $2s'$, $2p'x$, $2p'y$, $2p'z$, $2s''$, $2p''x$, $2p''y$, $2p''z$ y 5 funciones $3d$, en total 18 funciones base [101].

Apéndice C

Análisis de posibles geometrías de *Trp* en agua

Con el fin de modelar de forma análoga el incremento de la concentración de *Trp* en agua, se propuso incluir cada vez más moléculas de *Trp* cercanas, cada una con sus nueve moléculas de agua para estabilizar el zwitterión, ya que en el software empleado Gaussian 16, no se tiene control sobre el parámetro de volumen. En este sentido, surge la posibilidad de ubicar la segunda, tercera y cuarta molécula de *Trp* en diferentes posiciones, y aunque esto necesitaría un amplio estudio, que permita encontrar la más apropiada, en este trabajo se estudiaron dos posiciones probables en las que se pueden encontrar las moléculas de cada cluster y se eligió en cada caso la más estable. Las dos posiciones estudiadas se denominaron paralela y antiparalela.

Para el cluster $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ la geometría paralela inicial consiste en ubicar las moléculas de *Trp* en el mismo sentido, mientras que la geometría antiparalela inicial consiste en ubicar las moléculas de *Trp* en el sentido contrario, como se muestra en la Fig C.1.

Las geometrías optimizadas de confórmero *Zpt*, al nivel PM6, con sus respectivas energías se muestran en la Fig. F.4. De forma análoga la Fig. C.3 muestra las

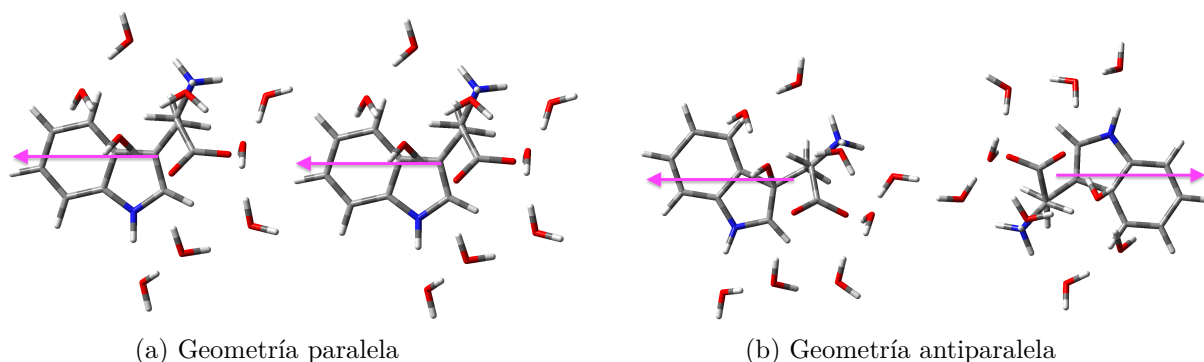
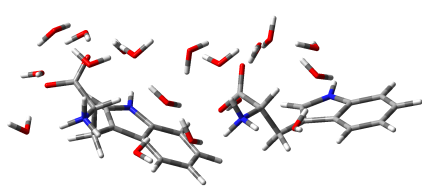
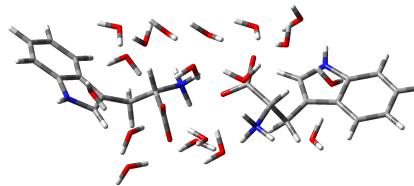


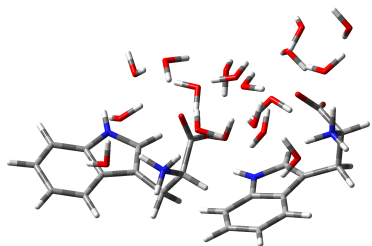
Figura C.1: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$.



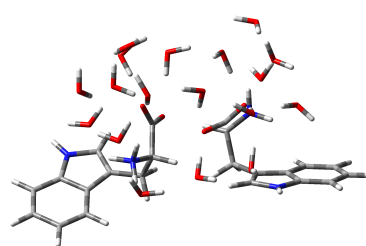
(a) Energía=-1.998668 Hartrees



(b) Energía=-2.025604 Hartrees

Figura C.2: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ con Zpt .

(a) Energía=-2.031341 Hartrees

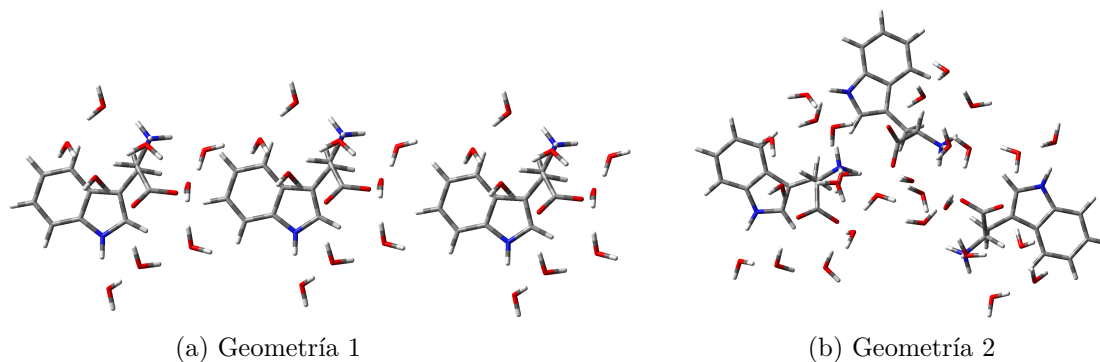


(b) Energía=-2.025162 Hartrees

Figura C.3: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$ con Zag^+ .

geometrías optimizadas y sus energías del conformero Zag^+

De forma análoga se estudiaron dos geometrías iniciales para los clusters $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ las cuales se muestran en las Figs. C.4 y C.5. Las geometrías optimizadas y energías para tercer cluster con el conformero Zpt se muestran en la Fig. C.6 y para el conformero Zag^+ en la Fig. C.7. Para el cuarto cluster, las geometrías optimizadas con el conformero Zpt se muestran en la Fig. C.8 y para el conformero Zag^+ en la Fig. C.9.



(a) Geometría 1

(b) Geometría 2

Figura C.4: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$.

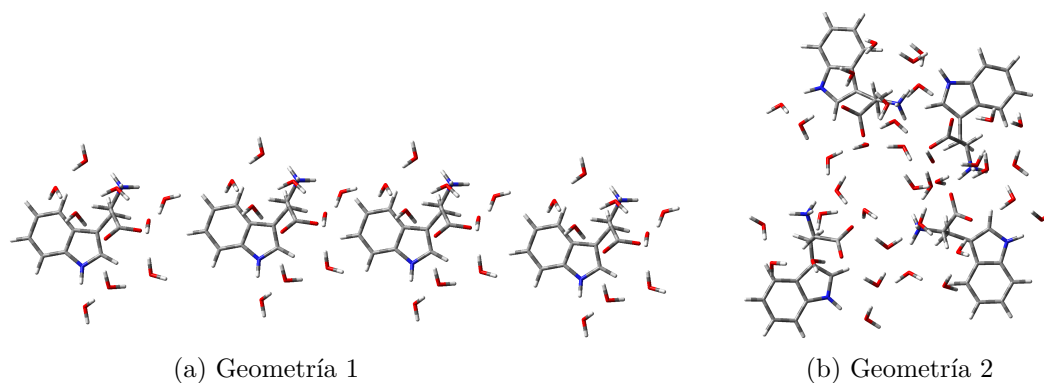


Figura C.5: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$.

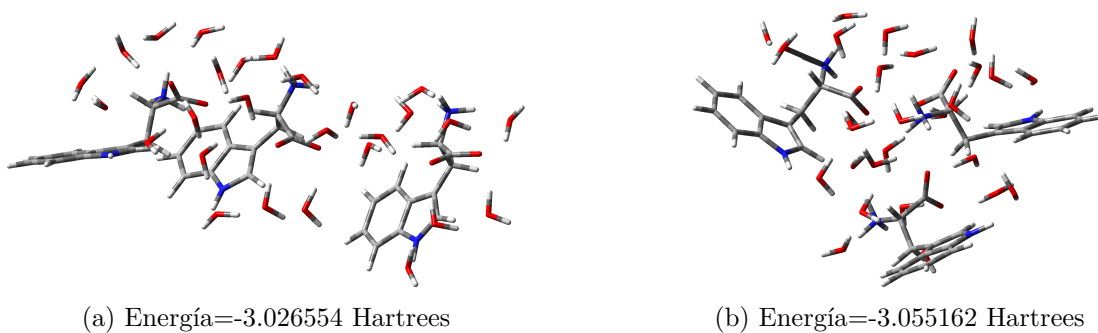


Figura C.6: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ con *Zpt*.

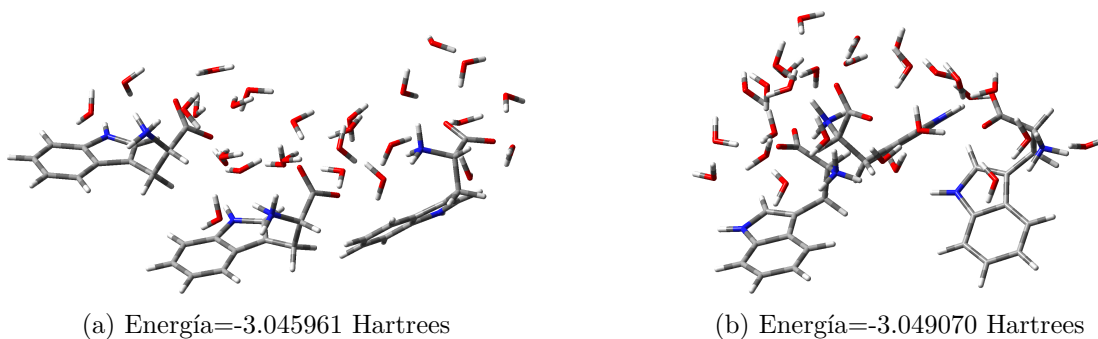


Figura C.7: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ con *Zag*⁺.

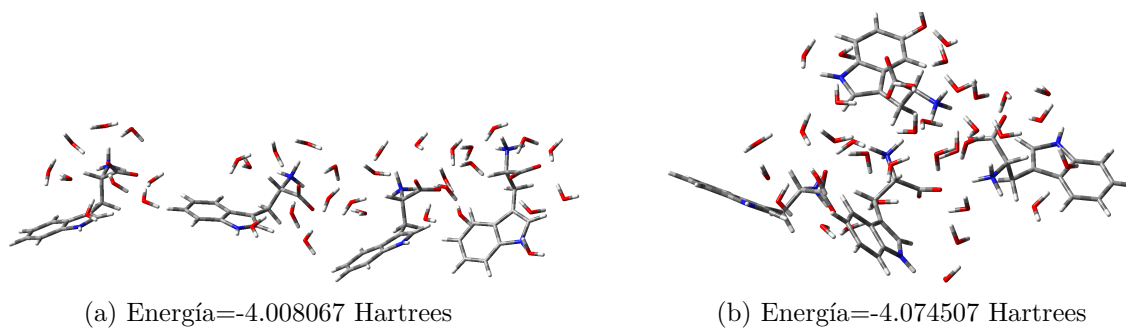


Figura C.8: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ con Zpt .

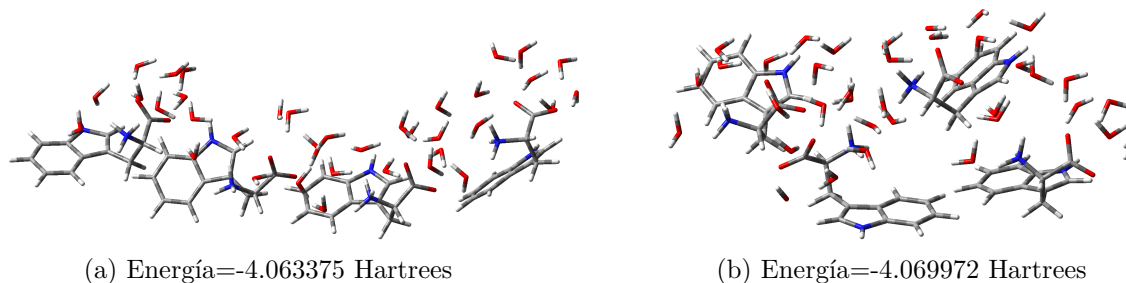


Figura C.9: Geometrías optimizadas para el cluster $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$ con Zag^+ .

Finalmente, para los cálculos espectroscópicos de los clusters $(Trp)_2 - (H_2O)_{18}$, $(Trp)_3 - (H_2O)_{27}$ y $(Trp)_4 - (H_2O)_{36}$, se escogieron las geometrías con menor energía.

Apéndice D

Efecto de considerar moléculas de agua como impurezas en el disolvente acetona

Luego de obtener el cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ se calculó el espectro de absorción (que se mostraron en el Capítulo 4) y se encontraron dos estados excitados en 324.9 y 333.89 nm, los cuales se acercan al valor experimental en 344 nm. Sin embargo, antes de proponer la extensión del cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$ para modelar la concentración, es apropiado considerar algunas moléculas de agua en el cluster más pequeños y posteriormente en el más grande, ya que es natural encontrar impurezas que corresponden entre otras sustancias al agua. Esto con el fin de observar si la presencia de algunas moléculas de agua generan algunas interacciones importantes que afecten la fluorescencia del *Trp* en acetona.

D.1. Efecto de moléculas de agua en el espectro de absorción para el cluster $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$

A continuación en la Fig. D.1 se presentan dos casos de comparación al incluir o no moléculas de agua en el cluster más pequeño. En el primer caso, se consideraron 1 molécula de *Trp* y 9 moléculas de acetona, $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_9$, el cual genera un pico en 310.6 nm, para este mismo caso se agregaron ahora 2 moléculas de agua, $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_9 - (H_2O)_2$, el efecto del agua es un corrimiento al azul, con un pico en 294.2 nm, alejando el espectro teórico del experimental. En el segundo caso, se consideraron 1 molécula de *Trp* y 17 moléculas de acetona, $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{17}$, el cual genera un pico en 300.58 nm y líneas de absorción con fuerza de oscilador relevantes alrededor de 334 nm. Un caso similar a este fue con 18 moléculas de acetona y 2 moléculas de agua, $(Trp)_1 - (C_3H_6O)_{18} - (H_2O)_2$, en el cual se mantiene muy cerca el pico máximo en 310.3 nm, pero las contribuciones alrededor de 334 nm se hacen menos probables.

Por lo tanto, las moléculas de agua no ayudan al cluster a obtener un resultado más cercano al experimental.

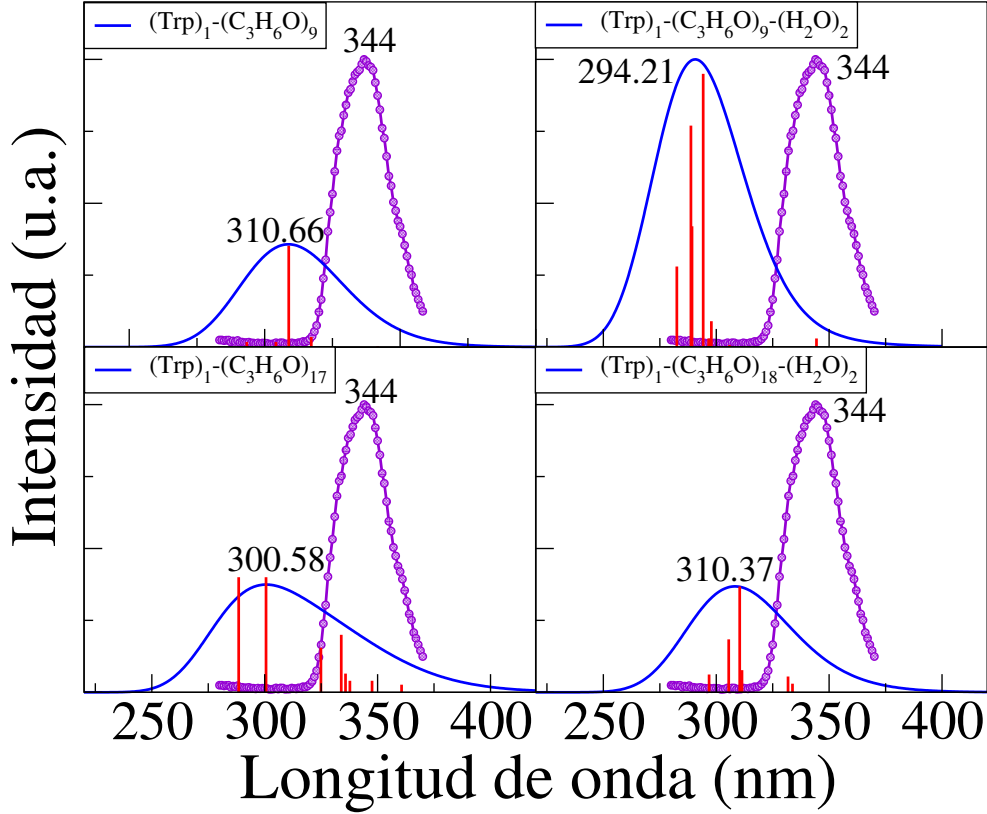


Figura D.1: Comparación del espectro de excitación experimental de *Trp* en acetona (curva violeta) a $\lambda_{em} = 381$ nm, con espectros de absorción de 1 molécula de *Trp* con y sin moléculas de agua acompañadas de moléculas de acetona, como se describe en la parte superior de cada panel.

D.2. Efecto de moléculas de agua en el espectro de absorción para el cluster $(Trp)_2-(C_3H_6O)_{34}$

Realizando una comparación similar a la sección anterior, pero ahora con 2 moléculas de acetona. Se estudió el caso de 2 moléculas de *Trp* con 18 moléculas de acetona el cual genera un pico en 304 nm, sobre este caso se agregaron 4 moléculas de agua y su efecto fue un leve corrimiento al rojo de 2 nm, pero un deceso en la intensidad de absorción. Luego, como es probable encontrar las moléculas de acetona y agua en posiciones diferentes las cuales se estudiaron en los clusters $(Trp)_2-(C_3H_6O)_{18}-(H_2O)_4 \rightarrow G2$ representando una segunda geometría, muestra el pico principal en 304.84 nm lo cual no está muy lejos del caso sin moléculas de agua, aunque aparecen pequeñas transiciones alrededor de 340 y 360 nm. En una tercera geometría, con las mismas moléculas se

presenta un corrimiento al azul a 291 nm alejándose aún más del valor experimental. Sin embargo, ninguno se acerca mejor que el caso de $(Trp)_2 - (C_3H_6O)_{34}$. Lo que permite concluir que al número de moléculas consideradas, aún las moléculas de agua no influyen de forma relevante a la absorción.

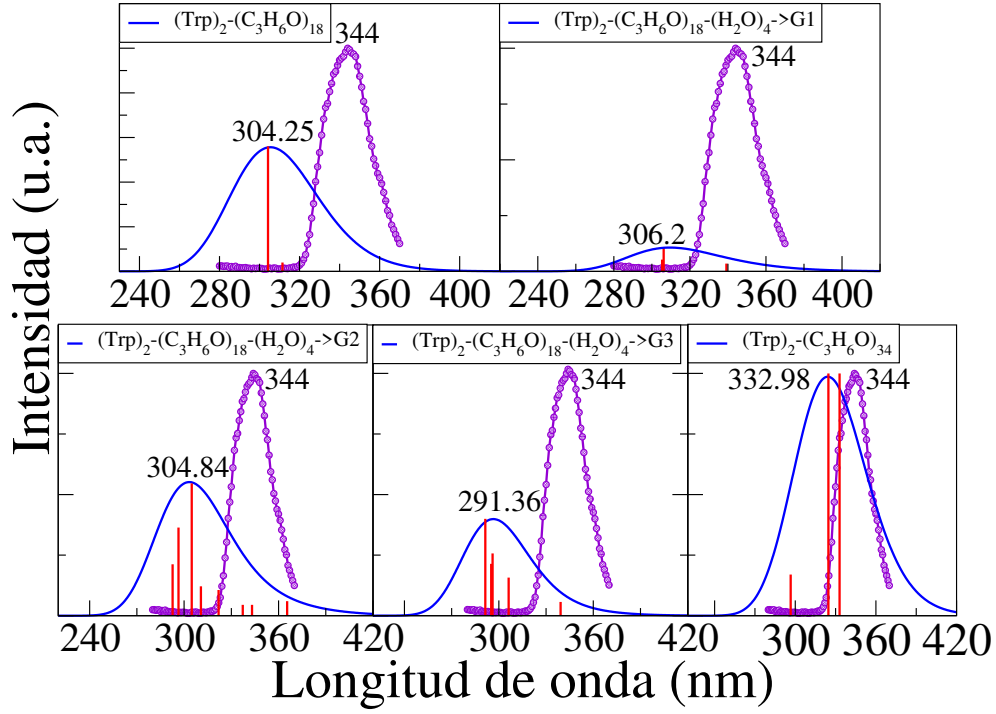


Figura D.2: Comparación del espectro de excitación experimental de *Trp* en acetona (curva violeta) a $\lambda_{em} = 381$ nm, con espectros de absorción de 2 moléculas de *Trp* con y sin moléculas de agua acompañadas de moléculas de acetona, como se describe en la parte superior de cada panel.

Apéndice E

Análisis de los orbitales moleculares de *Trp* en ciclohexano con dos métodos de solvatación

Se estudiaron dos casos de solvatación para ver la contribución de las moléculas de ciclohexano en la absorción del sistema *Trp*-(C_6H_{12}). Con el conformero Nag^+ se optimizó al nivel PM6 y luego B3LYP/6-31+g(d,p), primero modelando el solvente con PCM, y segundo, modelando el solvente con 2 moléculas de ciclohexano. En ambos casos, se calculó el espectro UV-Vis usando TD-DFT/B3LYP/6-311+g(d,p), el espectro fue comparado en la Fig. 3.8, sin embargo los estados excitados más probables se presentan en la Tabla E.1 y los orbitales de los respectivos estados excitados se comparan en la Fig. E.1, como se observa los orbitales HOMO-1, HOMO y LUMO son iguales y se encuentran localizados principalmente en el grupo indol del *Trp*. Mientras que los orbitales LUMO+1, LUMO+3 y LUMO+5 ya muestran contribución del medio ambiente, por ejemplo el orbital LUMO+1 distribuye la carga en la cadena lateral del *Trp* y su alrededor, pero en el caso del solvente discreto se alcanza a notar una conexión con una molécula de ciclohexano, pero este efecto también es considerado en caso del solvente continuo. Y la longitud de onda de cada transición es muy cercana para ambos casos, lo que permite establecer que el solvente PCM es suficiente para el cálculo de absorción, además que este modelo ofrece la ventaja de considerar menos átomos en los clusters, los cuales requieren menor recurso computacional.

Tabla E.1: Energías de transición (E) en eV y longitud de onda (λ) en nm, con fuerza de oscilador (f) y la composición de los orbitales que contribuyen a la transición del *Trp* en ciclohexano, con dos métodos de solvatación.

Cluster	Estado	Excitación de un electrón	Composición	E (eV) (λ (nm))	f
$(Trp)_1 - PCM$	S_1	92.22 %	H $\rightarrow$ L	4.45 (278.7)	0.0943
	S_2	91.96 %	H $\rightarrow$ L+1	4.65 (266.68)	0.0113
	S_3	61.92 %	H-1 $\rightarrow$ L	4.75 (260.85)	0.04182
		20.18 %	H $\rightarrow$ L+3		
	S_5	62.05 %	H-2 $\rightarrow$ L+1	5.27 (235.18)	0.0109
	S_8	85.16 %	H $\rightarrow$ L+5	5.57 (222.53)	0.0226
$(Trp)_1 - (C_6H_{12})_2$	S_1	92.71 %	H $\rightarrow$ L	4.45 (278.43)	0.1001
	S_2	83.36 %	H $\rightarrow$ L+1	4.70 (263.88)	0.0089
	S_3	57.42 %	H-1 $\rightarrow$ L	4.76 (260.2)	0.0470
		18.51 %	H $\rightarrow$ L+4		
	S_5	59.04 %	H $\rightarrow$ L+3	5.26 (235.848)	0.0082
	S_8	85.20 %	H $\rightarrow$ L+5	4.49 (225.90)	0.0078

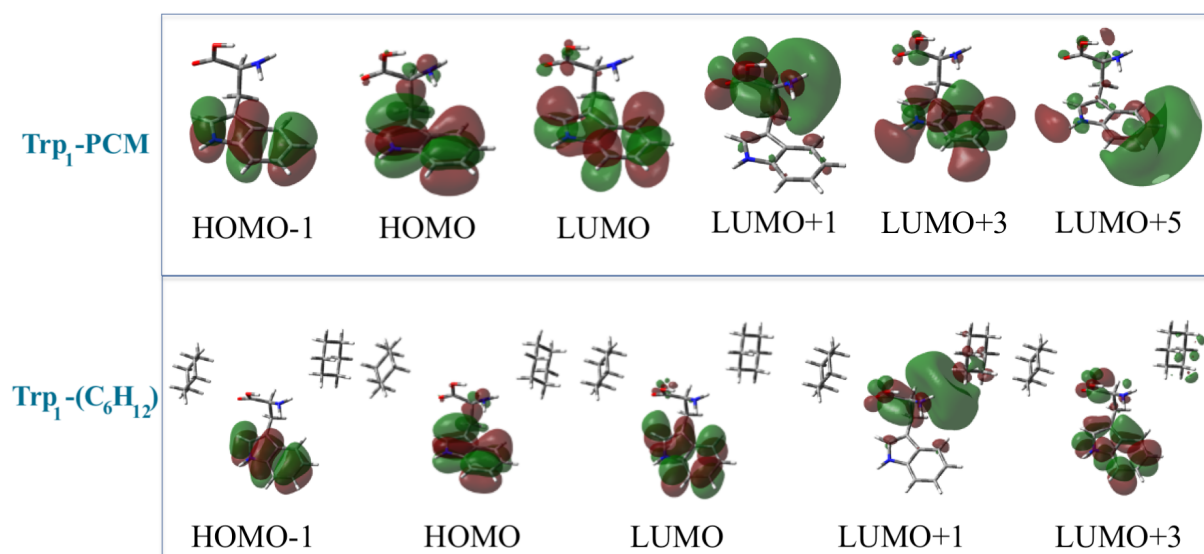


Figura E.1: Comparación de los orbitales moleculares involucrados en las transiciones más relevantes de *Trp* en ciclohexano modelado de de forma continua (PCM) y discreta (con dos moléculas de ciclohexano).

Apéndice F

Análisis de posibles geometrías de *Trp* en ciclohexano

Para la construcción de los clusters en ciclohexano, similar al caso del agua (apéndice C) se estudiaron dos geometrías iniciales para los clusters $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$, $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$ y $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$, presentadas en las Figs. F.1, F.2 y F.3.

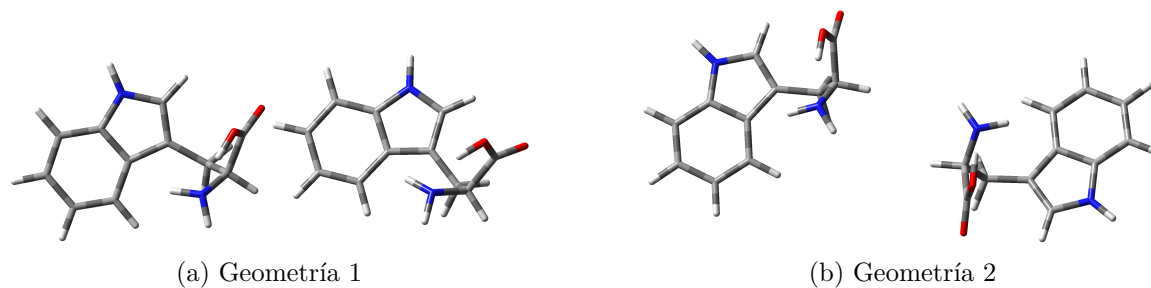


Figura F.1: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$.

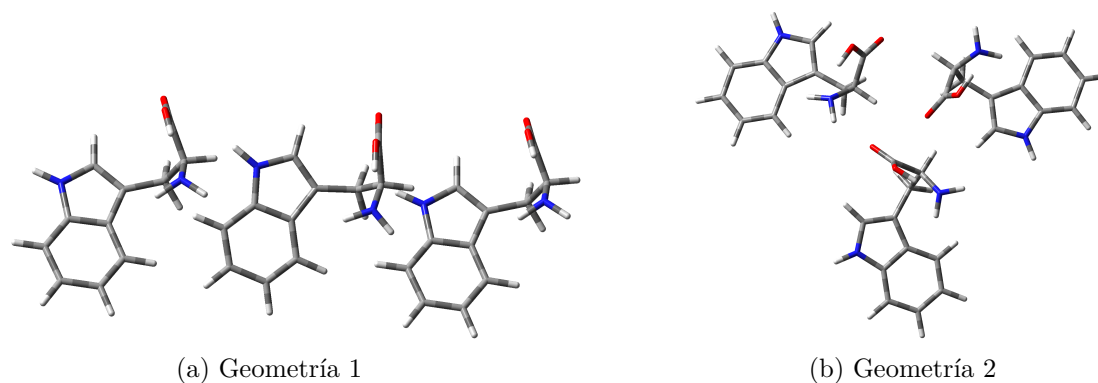


Figura F.2: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$.

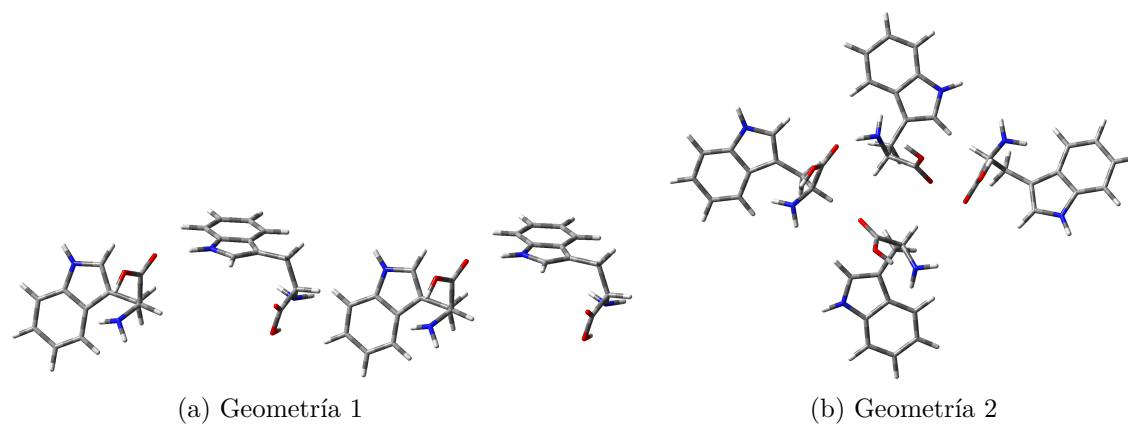


Figura F.3: Geometrías iniciales de estudio para la construcción del cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$.

Las geometrías fueron optimizadas al nivel B3LYP/6-31+g(d,p), ya que lo permitió el tamaño del sistema, aún para el cluster más grande. Las Figs. F.4, F.5 y F.6 presenta estas geometrías con sus respectivas energías.

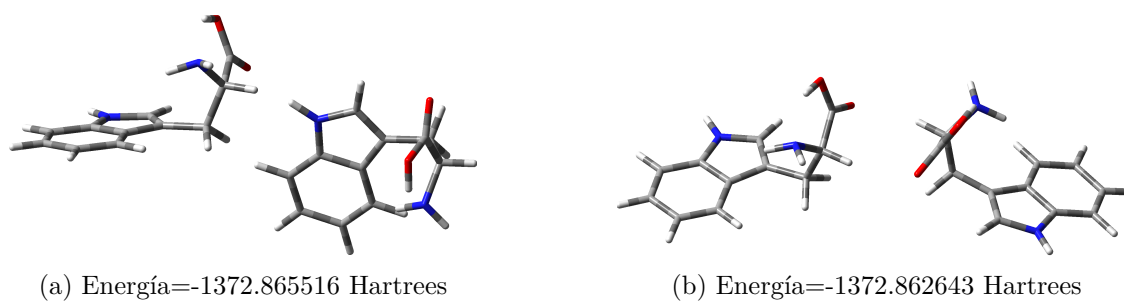


Figura F.4: Geometrías optimizadas del cluster $(Trp)_2 - (C_6H_{12})$.

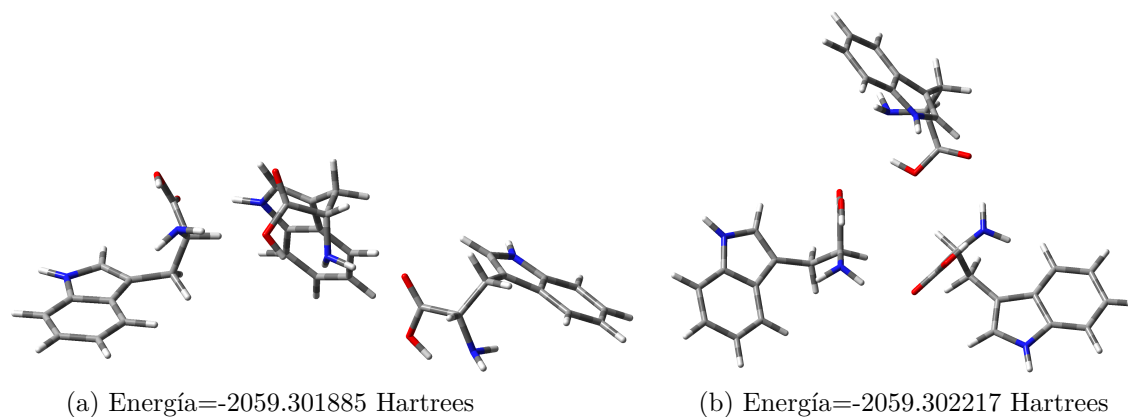


Figura F.5: Geometrías optimizadas del cluster $(Trp)_3 - (C_6H_{12})$.

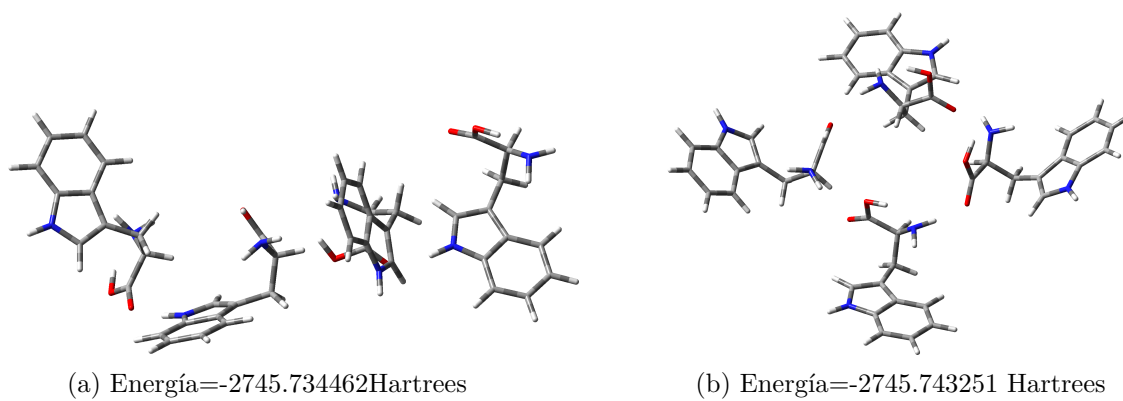


Figura F.6: Geometrías optimizadas del cluster $(Trp)_4 - (C_6H_{12})$.

En cada cluster se escogió la geometría con energía más baja para los cálculos de absorción.

Apéndice G

Fundamentos teóricos de los modelos implementados en LUMPAC

G.1. Proceso de optimización de geometría

La superficie de energía potencial (PES por sus siglas en inglés) consiste en una superficie de la energía calculada (E) en función de los parámetros geométricos de una molécula (q), $E = f(q_1, q_2, \dots, q_n)$, donde n es el número de parámetros geométricos. Un punto estable en el PES se define por un punto plano en la superficie, representado matemáticamente por $dE/dq = 0$. Si $d^2E/dq^2 < 0$, el punto estable es un estado de transición. Por el contrario, si $d^2E/dq^2 > 0$, el punto estable corresponde a un mínimo de energía, generalmente un mínimo local. El más bajo de los mínimos locales, los mínimos globales, generalmente define la geometría del estado fundamental más estable de la molécula.

En general, el procedimiento de optimización de la geometría consiste en suministrar una estructura molecular de entrada con parámetros geométricos q_0 esperando estar lo más cerca posible del punto estable deseado. Esta geometría razonable se somete luego a un algoritmo que altera sistemáticamente las posiciones atómicas hasta que se alcanza un punto estable mínimo, definido por sus parámetros geométricos q_i .

Algunos métodos de cálculo cuántico que se suelen usar para la optimización han sido descritos en el Capítulo 2. El método de elección para realizar optimizaciones geométricas depende principalmente del número de átomos presentes en el sistema deseado.

Las geometrías del estado fundamental de los complejos de lantánidos se pueden calcular mediante dos enfoques diferentes basados en la química cuántica: i) DFT o métodos ab initio con potenciales centrales efectivos (ECP por sus siglas en inglés) para tratar los iones lantánidos, o ii) métodos semiempíricos. Entre todos los métodos

ab initio evaluados, el método RHF / STO-3G que utiliza el potencial efectivo del núcleo de MWB fue el más eficiente para predecir el poliedro de coordinación de los complejos de lantánidos [102]. Este resultado confirma que los modelos Sparkle, que demandan un esfuerzo computacional mucho menor, tienen mayor precisión en los cálculos y modelado, en comparación con los ab initio / ECP [103].

En LUMPAC, los modelos Sparkle se utilizarán en el paso de optimización de geometría porque dichos métodos tienen una excelente capacidad de predicción de geometría y también un costo computacional considerablemente bajo. Como resultado, ahora proporcionaremos una descripción detallada de estos modelos. El procedimiento de desarrollo del modelo Sparkle consiste en parametrizar un hamiltoniano semiempírico, como AM1 o PM3, por ejemplo, en el que el ion lantánido se sustituye por una carga puntual +3e. Esta carga puntual está sujeta a un potencial repulsivo $\exp(-\alpha r)$, donde el parámetro α cuantifica el tamaño del ion. Esta entidad matemática se llama "sparkle". Como el enlace entre Ln^{3+} y los ligandos del átomo tiene un alto carácter iónico, se ha demostrado consistentemente que el modelo Sparkle es adecuado.

Todos los modelos Sparkle publicados (Sparkle / AM1, Sparkle / PM3, Sparkle / PM6, Sparkle / PM7 y Sparkle / RM1) están disponibles en MOPAC(2009) [104].

G.2. Cálculo de estados excitados

Los estados excitados singlete y triplete de la parte orgánica se pueden calcular utilizando métodos basados en la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT) o mediante el método INDO / S semiempírico. Sin embargo, el método TD-DFT sigue siendo inadecuado para tratar complejos con más de 100 átomos, debido a su alta demanda de recursos computacionales.

En este contexto, las geometrías optimizadas por los modelos Sparkle se utilizan para calcular los estados excitados singlete y triplete utilizando la interacción de configuración simple (CIS) de INDO / S, que tiene una precisión de aproximadamente 1000 cm^{-1} [93,105]. Este método se implementa en los programas ZINDO [93] y ORCA [106]. En este procedimiento, un punto de carga +3 e representa el ion lantánido [107].

G.3. Cálculo de parámetros de intensidad

Los parámetros de intensidad, Ω_λ ($\lambda = 2, 4$ y 6), se calculan mediante la teoría de Judd-Ofelt (JO) [108,109]. Según esta teoría, el ion central se ve afectado por los átomos vecinos más cercanos, a través de un campo eléctrico estático también denominado campo de cristal o ligando. Judd y Ofelt describieron, en trabajos independientes, la importancia del mecanismo dipolo eléctrico para las transiciones $4f - 4f$, teniendo en cuenta sólo la configuración electrónica $4f^n$, es decir, se desprecian las interacciones interconfiguracionales $4f^n - 4f^{n-1}5d^1$. Por otro lado, el acoplamiento

espín-órbita se trata en el marco del esquema de acoplamiento intermedio. La fuerza del dipolo de una transición f-f de dipolo eléctrico (ED por sus siglas en inglés) inducido entre los estados Φ y Φ' viene dada por:

$$D_{ED} = e^2 \sum_{\lambda=2,4,6} \Omega |\langle \Phi | U^\lambda | \Phi' \rangle|^2, \quad (\text{G.1})$$

donde e es la carga eléctrica del electrón, las funciones de onda Φ y Φ' son funciones completas del acoplamiento intermedio, U^λ son las formas tensoriales irreducibles del operador ED y Ω_λ son los parámetros fenomenológicos JO, expresados en cm^2 , los cuales describen la interacción entre los átomos del lantánido y del ligando, y se calculan mediante la ecuación:

$$\Omega_\lambda = (2\lambda + 1) \sum_{t=\lambda-1}^{\lambda+1(\text{impares})} \sum_{p=-t}^{t(\text{todos})} \frac{|B_{\lambda tp}|^2}{(2t + 1)}. \quad (\text{G.2})$$

Un aspecto que es muy importante para la posible aplicación de esta teoría es conocer los valores que cada una de las variables de rango λ , t y p que pueden asumir en relación con los demás. Como se puede ver en la ecuación (G.2), por ejemplo, cuando λ es igual a 2, t será igual a 1 y 3, mientras que los valores de p serán igual a 0, 1, ..., t .

Los parámetros $B_{\lambda tp}$ se calculan mediante:

$$B_{\lambda tp} = B_{\lambda tp}^{ed} + B_{\lambda tp}^{dc}. \quad (\text{G.3})$$

El primer término, se refiere solo a la contribución del dipolo eléctrico forzado (ED), y están dadas por la ecuación:

$$B_{\lambda tp}^{ed} = \frac{2}{\Delta E} \langle r^{t+1} \rangle \theta(t, \lambda) \gamma_p^t. \quad (\text{G.4})$$

El término ΔE corresponde a la diferencia de energía entre los baricentros del estado fundamental y la primera configuración de estado excitado de paridad opuesta. Las integrales radiales, $\langle r^\lambda \rangle$, se toman de la referencia [110], con una extrapolación de la cantidad $\langle r^8 \rangle$. Los valores de las integrales radiales para el ion Eu^{3+} son $\langle r^2 \rangle = 0,9175au$, $\langle r^4 \rangle = 2,0200au$, $\langle r^6 \rangle = 9,0390au$, y $\langle r^8 \rangle = 110,0323au$. Los términos $\theta(t, \lambda)$ son factores numéricos asociados con cada ion lantánido y se estiman a partir de integrales radiales de cálculos de Hartree-Fock. Los valores de $\theta(t, \lambda)$ son $\theta(1, 2) = -0,17$; $\theta(3, 2) = 0,345$; $\theta(3, 4) = 0,18$; $\theta(5, 4) = -0,24$; $\theta(5, 6) = -0,24$, and $\theta(7, 6) = 0,24$, para el ion Eu^{3+} .

Los parámetros γ_p^t , son los denominados parámetros de campo de ligando de rango impar y contienen una suma sobre los átomos circundantes, dados por la ecuación:

$$\gamma_p^t = \left(\frac{4\pi}{2t + 1} \right)^{1/2} e^2 \sum_j \rho_j (2\beta_j)^{t+1} \frac{g_j}{R_j^{t+1}} Y_p^{t*}(\theta_j, \phi_j), \quad (\text{G.5})$$

Y_p^{t*} son los armónicos esféricos conjugados que dependen de las coordenadas esféricas (θ_j, ϕ_j) de los átomos del ligando j . De la ecuación (G.5), el término $\rho_j(2\beta_j)^{t+1}$ según el Modelo de Superposición Simple (SOM por sus siglas en inglés) [113, 114] desarrollado por O. Malta, formaliza ese campo cristalino hamiltoniano y se calcula adecuadamente en función de la densidad de carga ($-ge\rho$) entre el ion lantánido y el j átomo del ligando.

El modelo SOM asume dos postulados [113]: i) el potencial de energía $4f$ es generado por cargas, uniformemente distribuidas en una pequeña región localizada alrededor de los puntos medios de los enlaces químicos lantánido-ligando; y ii) la carga total en cada región es igual a $-ge\rho$, donde el parámetro ρ es proporcional a la magnitud de la superposición total entre el ion lantánido y los átomos del ligando. El vector $\vec{R}_j$ representa la posición j de los átomos del ligando, y el vector $\vec{r}_j$ representa la posición del electrón i^{th} del ion metálico central.

En otras palabras, el término $\rho_j(2\beta_j)^{t+1}$ introduce una corrección a los parámetros del campo cristalino del modelo electrostático de carga puntual (PCEM por sus siglas en inglés), tal que $\gamma_p^t(PCEM) = \rho_j(2\beta_j)^{t+1}\gamma_p^t(SOM)$. De esta forma, esta corrección confiere un grado de covalencia al modelo de carga puntual a partir de la inclusión del parámetro ρ , ya que PCEM trata los enlaces átomo metal-ligando como un fenómeno puramente electrostático.

Las cargas efectivas están en posiciones definidas a las distancias dadas por $\vec{R}_j/2\beta_j$. El factor β_j indica que las cargas efectivas no están exactamente en $\vec{R}_j/2\beta_j$, dado por

$$\beta_j = \frac{1}{1 \pm \rho_j}, \quad (G.6)$$

El signo más se utiliza cuando el baricentro de la región de superposición se desplaza hacia el ligando, lo que ocurre en el caso de los átomos coordinadores de oxígeno y flúor. El signo menos se utiliza cuando este baricentro se desplaza hacia el ion central, como es el caso de los átomos coordinadores de nitrógeno y cloro.

La superposición entre los orbitales $4f$ y los orbitales de valencia de los j ligandos, ρ_j , se calcula mediante la ecuación

$$\rho_j = \rho_0 \left(\frac{R_0}{R_j} \right)^n, \quad (G.7)$$

donde ρ_0 es una constante igual a 0.05 y n es igual a 3,5 para los lantánidos. R_0 es la más pequeña entre todas las distancias entre átomos de ligando y lantánidos.

El segundo término de la ecuación (G.3) se refiere solo a la contribución del acoplamiento dinámico (DC) y viene dada por la ecuación

$$B_{\lambda tp}^{dc} = - \left[\frac{(\lambda + 1)(2\lambda + 3)}{2\lambda + 1} \right]^{1/2} \langle r^\lambda \rangle (1 - \sigma_\lambda) \langle f || C^{(\lambda)} || f \rangle \Gamma_p^t \delta_{t, \lambda+1}, \quad (G.8)$$

esta contribución es complementaria a la del modelo de campo eléctrico estático de Judd-Ofelt, y fue considerada en primer lugar por Mason et al. [111]. El mecanismo de acoplamiento dinámico, que es más importante que el mecanismo dipolo eléctrico para algunas transiciones, se debe al alto gradiente del campo electromagnético generado por los ligandos cuando interactúan con un campo externo incidente. El mecanismo de DC depende de la naturaleza de ambos ligandos y de la geometría de coordinación, y explica la hipersensibilidad en las transiciones $4f-4f$. La cantidad $(1-\sigma_\lambda)$ es un campo de protección debido a los orbitales $5s$ y $5p$ llenos de iones lantánidos, que tienen una extensión radial mayor que la de los orbitales $4f$. Los valores de σ_λ son $\sigma_2 = 0,600$, $\sigma_4 = 0,139$ y $\sigma_6 = 0,100$. $\langle f || C^{(\lambda)} || f \rangle$ es un operador tensorial de rango λ ($\lambda = 2, 4, 6$) con valores $\langle 3 || C^{(2)} || 3 \rangle = -1,366$, $\langle 3 || C^{(4)} || 3 \rangle = -1,128$, y $\langle 3 || C^{(6)} || 3 \rangle = -1,270$ para iones lantánidos. $\delta_{t,\lambda+1}$ es la función delta de Kronecker. Tal como, $B_{\lambda tp}^{dc}$ es igual a 0 cuando t es diferente de $\lambda + 1$ [112].

Los parámetros Γ_p^t ($t=1,3,5$ y 7), como el parámetro γ_p^t , también depende de la geometría de coordinación y del entorno químico alrededor del ion lantánido, y está dada por la ecuación:

$$\Gamma_p^t = \left(\frac{4\pi}{2t+1} \right)^{1/2} \sum_j \frac{\alpha_j}{R_j^{t+1}} Y_p^{t*}(\theta_j, \phi_j). \quad (G.9)$$

Las limitaciones en el cálculo de los parámetros de intensidad consisten en determinar las cantidades, γ_p^t y Γ_p^t . Como resultado, es necesario utilizar los parámetros de intensidad experimentales.

Los factores de carga y polarizabilidades, utilizados en los cálculos de γ_p^t y Γ_p^t , respectivamente, se ajustan para reproducir los parámetros de intensidad experimentales. Durante el procedimiento de ajuste, los parámetros de intensidad calculados (Ω_λ^{calc}) de la geometría optimizada, obtenida del modelo Sparkle, se comparan con los parámetros experimentales de intensidad (Ω_λ^{exp}). La función de respuesta (F_{resp}) está definido por la ecuación:

$$F_{resp} = (\Omega_2^{calc} - \Omega_2^{exp})^2 + (\Omega_4^{calc} - \Omega_4^{exp})^2 \quad (G.10)$$

G.4. Cálculo de la tasa de emisión radiativa

La tasa radiativa de emisión (A_{rad}), teniendo en cuenta los mecanismos dipolo magnético y dipolo eléctrico forzado, viene dada por la ecuación:

$$A(^5D_0 - ^7F_J) = \frac{64\pi^4 v^3}{3h(2J+1)} \left[\frac{n(n^2+2)^2}{9} S_{ed} + n^3 S_{md} \right], \quad (G.11)$$

donde h es la constante de Plank, $2J+1$ es la degeneración del estado inicial, y n es el índice de refracción del medio, generalmente se supone que es igual a 1.5. S_{ed} y S_{md}

son los mecanismos de dipolo eléctrico forzado y dipolo magnético, respectivamente, y están dados por:

$$S_{ed} = e^2 \sum_{\lambda=2,4,6} \Omega_{\lambda} |\langle {}^5D_0 || U^{(\lambda)} || {}^7F_J \rangle|^2, \quad (\text{G.12})$$

y

$$S_{md} = \frac{\hbar^2}{4mc^2} \langle J' || L + 2S || J \rangle^2, \quad (\text{G.13})$$

para la ecuación (G.12) los elementos de la matriz al cuadrado $\langle {}^5D_0 || U^{(2)} || {}^7F_2 \rangle^2$, $\langle {}^5D_0 || U^{(4)} || {}^7F_4 \rangle^2$ y $\langle {}^5D_0 || U^{(6)} || {}^7F_6 \rangle^2$ son iguales a 0.0032, 0.0023 y 0.0002, respectivamente, para Eu^{3+} [115]. De la ecuación (G.13), m es la masa del electrón, los elementos de matriz se determinan de acuerdo con el mecanismo de acoplamiento intermedio. La transición ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ es la única que no tiene contribuciones del mecanismo dipolo eléctrico y se cuantificó teóricamente como $S_{md} = 9,6 \times 10^{-42} esu^2 cm^2$ [116].

Las transiciones ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_J$ ($J = 0, 3$ y 5) están prohibidos por los mecanismos dipolo magnético y dipolo eléctrico forzado, es decir, sus contribuciones son iguales a 0.

Las contribuciones de cada transición a la tasa de radiación de emisión se calculan mediante las relaciones de ramificación, dadas por

$$\beta_{0,J} = \frac{A_{0,J}}{A_{rad}} \quad (\text{G.14})$$

G.5. Cálculo de tasas de transferencia de energía

El modelo teórico utilizado para calcular la tasa de transferencia de energía entre los ligandos orgánicos y el ion lantánido fue desarrollado por Malta y colaboradores [117, 118]. Según este modelo, las tasas de transferencia de energía, W_{ET} , están dados por la suma de dos términos:

$$W_{ET} = W_{ET}^{mm} + W_{ET}^{em}, \quad (\text{G.15})$$

el término W_{ET}^{mm} corresponde a la tasa de transferencia de energía obtenida en el mecanismo multipolar y está dada por

$$W_{ET}^{mm} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{e^2 S_L}{(2J+1)G} F \sum_{\lambda} \gamma_{\lambda} \langle \alpha' J' || U^{(\lambda)} || \alpha J \rangle^2 + \frac{4\pi}{\hbar} \frac{e^2 S_L}{(2J+1)GR_L^6} F \sum_{\lambda} \Omega_{\lambda}^{ed} \langle \alpha' J' || U^{(\lambda)} || \alpha J \rangle^2. \quad (\text{G.16})$$

Las cantidades Ω_{λ}^{ed} son las contribuciones del dipolo eléctrico a los parámetros de intensidad, teniendo en cuenta solo las contribuciones de los parámetros $B_{\lambda tp}^{ed}$.

$\langle \alpha' J' || U^{(\lambda)} || \alpha J \rangle$ son elementos matriciales reducidos de los operadores tensoriales $U(l)$. Los parámetros γ_λ se calculan mediante

$$\gamma_\lambda = (\lambda + 1) \frac{\langle r^\lambda \rangle^2}{(R_L^{\lambda+2})^2} \langle 3 || C^{(\lambda)} || 3 \rangle^2 (1 - \sigma_\lambda)^2, \quad (\text{G.17})$$

de la ecuación (G.16), J es el número cuántico del momento angular total del ion lantánido, G es la degeneración del estado inicial del ligando y α especifica el término espectroscópico de los orbitales $4f$. S_L es la fuerza del dipolo asociada con las transiciones $\phi \rightarrow \phi'$ en los ligandos. La cantidad F corresponde al factor dependiente de la temperatura y contiene una suma de factores de Frank Condon, y se define por

$$F = \frac{1}{\hbar} \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \exp \left[- \left(\frac{\Delta}{\hbar \gamma_L} \right)^2 \ln 2 \right], \quad (\text{G.18})$$

de esta última ecuación $\hbar \gamma_L$ es el ancho de banda del estado ligando a la mitad del máximo (en cm^{-1}), y Δ es la diferencia de energía entre los estados donante y aceptor implicados en el proceso de transferencia de energía. Para los complejos de lantánidos, los estados donantes de energía corresponden a los estados excitados singlete y triplete, mientras que los estados aceptores corresponden a los estados excitados con iones lantánidos. Los valores típicos de F están en el rango de $10^{12} - 10^{13} \text{ erg}^{-1}$.

El segundo término de la ecuación (G.15), se refiere a las tasas de transferencia de energía obtenidas del mecanismo de intercambio y se calculan mediante la ecuación

$$W_{ET}^{em} = \frac{8\pi}{3\hbar} \frac{e^2(1 - \sigma_0)^2}{(2J + 1)R_L^4} F \langle \alpha' J' || S || \alpha J \rangle^2 \sum_m |\langle \varphi | \sum_k \mu_Z(k) s_m(k) | \varphi' \rangle|^2, \quad (\text{G.19})$$

donde s_m ($m = -1, 0, 1$) es el componente esférico del operador de espín del electrón j en el ligando j . μ_Z es la componente z de su operador dipolo, y S es el operador de espín total del ion lantánido. Los valores típicos del elemento de la matriz al cuadrado del dipolo acoplado y los operadores de espín se encuentran en el rango $10^{-34} - 10^{-36} \text{ esu}^2 \text{cm}^2$ [119].

Malta propuso algunas correcciones para las ecuaciones de las tasas de transferencia de energía en 2008 [119]. La primera corresponde a la suma de un factor de apantallamiento, $(1 - \sigma_1)^2$ al primer término de la ecuación (G.19). Esta contribución se había descuidado inicialmente para el mecanismo dipolo-dipolo. El segundo corresponde a la reposición de la cantidad $(1 - \sigma_0)^2$ en la ecuación (G.19) por la integral de solapamiento $\langle 4f | L \rangle$. Esta última corrección provoca un cambio de tres órdenes en la magnitud de la tasa de transferencia de energía calculada por el mecanismo de intercambio. No obstante, como estas tasas siguen siendo mucho más altas que las tasas radiativas y no radiativas, las conclusiones generales para el rendimiento cuántico teórico obtenidas en trabajos anteriores siguen siendo válidas [119].

Las tasas de transferencia de energía dependen de la diferencia de distancia entre los estados donante y aceptor involucrados en el proceso de transferencia de energía.

Esta distancia se conoce como R_L , y para su determinación es necesario estimar los coeficientes orbitales moleculares del átomo i (c_i) que contribuye a los estados del ligando (triplete o singlete). Es importante conocer la distancia desde el átomo i al ion lantánido (R_i). Las cantidades c_i y R_i se calculan con datos obtenidos de cálculos de estados excitados utilizando el método INDO / S semiempírico. De esta manera, R_L esta dado por

$$R_L = \frac{\sum_i c_i^2 R_i}{\sum_i c_i^2}. \quad (\text{G.20})$$

Las tasas de transferencia de energía (W_{BT}) se obtienen multiplicando la tasa de transferencia (W_{ET}) por el factor de Boltzmann, $\exp(-|\Delta|/k_B T)$, considerando la temperatura ambiente. Δ se refiere a la diferencia de energía entre los niveles donante y aceptor, y k_B es la constante de Boltzmann.

Las reglas de selección del momento angular total, J , de los estados $4f$ del lantánido, son complementarios. Los estados excitados del europio que tienen más probabilidades de aceptar energía de ligandos a través del mecanismo de interacción directa de Coulomb son 5D_2 , 5L_6 , 5G_6 y 5D_4 . La transferencia de energía de los estados excitados del ligando al nivel 5D_1 está permitido por el mecanismo de interacción de intercambio (ec. (G.19)). Aunque la transferencia de energía al nivel 5D_0 , en principio, está prohibida por la interacción directa o el mecanismo de intercambio, la regla de selección puede ser relajada por una mezcla de los momentos angulares totales (J) [118].

G.6. Cálculo del rendimiento cuántico de emisiones

El rendimiento cuántico de emisión se define como la relación entre las intensidades de luz emitida y absorbida, y está dado por la ecuación

$$q = \frac{A_{rad}\eta_{^5D_0}}{\varphi\eta_{S_0}}, \quad (\text{G.21})$$

donde $\eta_{^5D_0}$ es la población del nivel 5D_0 , φ y η_{S_0} a la tasa de absorción y la población del nivel singlete S_0 , respectivamente. Los niveles de población normalizados, η , se obtienen de las ecuaciones de velocidad apropiadas dadas por la ecuación:

$$\frac{d\eta_j}{dt} = - \left(\sum_{i \neq j} W_{ji} \right) \eta_j + \sum_{i \neq j} W_{ij} \eta_i, \quad (\text{G.22})$$

siendo W_{ji} o W_{ij} las tasas de transferencia entre los estados i y j , o los estados j e i .

La población del nivel 5D_0 depende de la tasa de emisión no radiativa A_{nrad} , que todavía no se puede calcular teóricamente. Sin embargo, A_{nrad} se puede cuantificar mediante A_{rad} y el tiempo de vida experimental (τ), de la forma

$$\frac{1}{\tau} = A_{rad} + A_{nrad}. \quad (\text{G.23})$$

Debido a esto, el rendimiento cuántico de emisión teórico depende de la vida útil del experimento.

La información que se acaba de describir ha sido tomada de [120].

Bibliografía

- [1] A.J. Atherton, and C. Clarke, *Multiple labeling techniques for fluorescence microscopy*. Methods Mol Med. **57**, 41-48 (2001).
- [2] L. Ma, F. Yang, and J. Zheng, *Application of fluorescence resonance energy transfer in protein studies*. J. Mol. Struct. **1077**, 87–100 (2014).
- [3] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed.; Publisher: Springer, New York, 2006; pp. 530-577.
- [4] T.J.A. Craddock, D. Friesen, J. Mane, S. Hameroff, J.A. Tuzynski, *The feasibility of coherent energy transfer in microtubules*. J. R. Soc. Interface. **94**, 20140677 (2014).
- [5] P. Kurian, T.O. Obisesan, T.J.A. Craddock, *Oxidative species-induced excitonic transport in tubulin aromatic networks: Potential implications for neurodegenerative disease*. J. Photochem. Photobiol. B **175**, 109-124 (2017).
- [6] C. Consani, G. Aubock, F. Mourik, M. Chergui, *Ultrafast Tryptophan-to-Heme Electron Transfer in Myoglobins Revealed by UV 2D Spectroscopy*. Science. **339**, 1586-1589 (2013).
- [7] P.R. Callis, *1L_a and 1L_b Transitions of Tryptophan: Applications of Theory and Experimental Observations to Fluorescence of Proteins*. Methods in enzymology. **278**, 113-150 (1997).
- [8] I. Daizadeh, E.S. Medvedev, and A.A. Stucherbrukhov, *Effect of protein dynamics on biological electron transfer*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biophys. **94**, 3703-3708 (1997).
- [9] D.B. Wetlaufer, *Ultraviolet spectra of proteins and amino acids*. Advan. Protein Chem. **17**, 303-390 (1962).
- [10] I. Gryczynski, W. Wick, M.L. Johnson, J.R. Lakowicz, *Lifetime distributions and anisotropy decays of indole fluorescence in cyclohexane /ethanol mixtures by frequency-domain fluorometry*. Biophys. Chem. **32**, 173-185 (1998).

- [11] F.W.J. Teale and G. Weber, *Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids*. Biochem. J. **65**, 476-482 (1957).
- [12] G. Weber, *Fluorescence-Polarization Spectrum and Electronic-Energy Transfer in Tyrosine, Tryptophan and Related Compounds*. Biochem J. **75**, 335-345 (1960).
- [13] S V. Knoev, *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*, 1st ed.; Publisher: Plenum Press, New York, 1967; pp. 9-58.
- [14] Y. Yamamoto, J. Tanaka, *Polarized Absorption Spectra of Crystals of Indole and Its Related Compounds*. Bull. Chem. Soc. Jpn. **45**, 1362-1366 (1972).
- [15] B. Valeur, G. Weber, *Resolution of the fluorescence excitation spectrum of indole into the 1L_a , and 1L_b excitation bands*. Photochem. Photobiol. **25**, 441-444 (1977).
- [16] P.R. Callis, *Molecular orbital theory of the 1L_b and 1L_a states of indole*. J. Chem. Phys. **95**, 4230-4240, (1991).
- [17] L.S. Slater and P.R. Callis, *Molecular Orbital Theory of the 1L_a and 1L_b , States of Indole. 2. An ab Initio Study*. J. Phys. Chem. **99**, 8571-8581, (1995).
- [18] L.C. Snoek, R.T. Kroemer, M.R. Hockridge, J.P. Simons, *Conformational landscapes of aromatic amino acids in the gas phase: Infrared and ultraviolet ion dip spectroscopy of tryptophan*. Phys. Chem. Chem. Phys. **3**, 1819-1826 (2001).
- [19] L.C. Snoek, R.T. Kroemer, J.P. Simons, *A spectroscopic and computational exploration of tryptophan-water cluster structures in the gas phase*. Phys. Chem. Chem. Phys. **4**, 2130-2139 (2002).
- [20] E. Gindensperger, A. Haegy, C. Daniel, R. Marquardt, *Ab initio study of the electronic singlet excited-state properties of tryptophan in the gas phase: The role of alanyl side-chain conformations*. J. Phys. Chem. **374**, 104-110 (2010).
- [21] H. Liu, H. Zhang, B. Jin, *Fluorescence of tryptophan in aqueous solution*. Spect. Acta Part A: Mol. Biomol. Spect. **106**, 54-59 (2013).
- [22] D. Nolting, C. Marian, R. Weinkauff, *Protonation effect on the electronic spectrum of tryptophan in the gas phase*. Phys. Chem. Chem. Phys. **6**, 2633-2640 (2004).
- [23] A.L. Sobolewski, D. Shemesh, W. Domcke, *Computational Studies of the Photophysics of Neutral and Zwitterionic Amino Acids in an Aqueous Environment: Tyrosine-(H₂O)₂ and Tryptophan-(H₂O)₂ Clusters*. J. Chem. A **113**, 542-550 (2009).

- [24] J.M. Hurtado, M.I. Menéndez, R. López, M.F.R. López, *An ab initio analysis of the structure of L-tryptophan tautomers in microhydrated environments, in water and in hydrophobic solvents*. Comput. Theor. Chem. **1034**, 17-25 (2014).
- [25] M.N. Blom, I. Compagnon, N.C. Polfer, V.G. Helden, G. Meijer, S. Suhai, B. Paizd, J. Oomens, *Stepwise Solvation of an Amino Acid: The Appearance of Zwitterionic Structures*. Phys. Chem. A **111**, 7309-7316 (2007).
- [26] Z. Huang and Z. Lin, *Detailed Ab Initio Studies of the Conformers and Conformational Distributions of Gaseous Tryptophan*. J. Phys. Chem A **109**, 2656-2659 (2005).
- [27] P. Stepanek and P. Bour, *Multi-scale modeling of electronic spectra of three aromatic amino acids: importance of conformational averaging and explicit solute-solvent interactions*. Phys. Chem. Chem. Phys. **16**, 20639-20649 (2014).
- [28] R. Ghassemizadeh, B. Moore, T. Momose, M. Walter, *Stability and IR Spectroscopy of Zwitterionic Form of β -Alanine in Water Clusters*. J. Phys. Chem. B **123**, 4392-4399 (2019).
- [29] Y. Chu, Z. Yang, M.T. Rodgers, *Solvation of Copper Ions by Acetone. Structures and Sequential Binding Energies of $\text{Cu}^+(\text{acetone})_x$, $x = 1-4$ from Collision-Induced Dissociation and Theoretical Studies*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **13**, 453-468 (2002).
- [30] M.G. Giorgini, H. Torii, M. Musso, *The influence of alkaline earth ions on the structural organization of acetone probed by the noncoincidence effect of the $\nu(\text{C=O})$ band: experimental and quantum chemical results*. Phys. Chem. Chem. Phys. **12**, 183-193 (2010).
- [31] K.J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali, *Lanthanide-Binding Tags as Versatile Protein Coexpression Probes*. Chem. Bio. Chem. **4**, 265-271 (2003).
- [32] J.A. Stubenrauch, C. Mevissen, M.F. Shulte, S. Bochenek, M. Albrecht, S. Subramanian, *Highly specific "sensing" of tryptophan by a luminescent europium(III) complex*. Z. Naturforsch. **71**, 1025-1028 (2016).
- [33] J.A. Pople, H.F. Shaefer, *Modern theoretical chemistry 4*, 1st ed.; Publisher: Plenum Press, New York, 1977.
- [34] D.R. Hartree, *The Wave Mechanics of an Atom with a Non-Coulomb Central Field*. Math. Proc. Camb. Philos. Soc. **24**, 111-132 (1927). V.A. Fock, *"Näherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörperproblems"*. Z. Phys. **61**, 126-148 (1930).

- [35] J.J.P. Stewart, *Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements*. J. Mol. Model. **13**, 1173-123 (2007).
- [36] P. Hohenberg and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*. Phys. Rev. **136**, B864-B871 (1964); W. Kohn and L.J. Sham, *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Phys. Rev. **140**, A1133-A1138 (1965); R.G. Parr and W. Yang, *Density-functional theory of atoms and molecules*; Publisher: Oxford Univ. Press, Oxford, 1989.
- [37] M. Born, R. Oppenheimer, *Zur Quantentheorie der Molekeln*. Anna. Phys. **84**, 457-488 (1927).
- [38] P.O. Löwdin, *Quantum Theory of Many-Particle Systems. III. Extension of the Hartree-Fock Scheme to Include Degenerate Systems and Correlation Effects*. Phys. Rev. **97**, 1509-1520 (1954)
- [39] A. Szabo, N.S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*, 1st ed.; Publisher: Dover Publications, New York, 1996.
- [40] D.A. McQuarrie, J.D. Simon, *Physical Chemistry: A Molecular Approach*, 1st ed.; Publisher: University Science Books, USA, 1997.
- [41] F.L. Pilar, *Elementary Quantum Chemistry*, 2nd ed.; Publisher: Dover Publications, New York, 1990.
- [42] J.C. Slater, *Molecular energy levels and valence bonds*. Phys. Rev. **38**, 1109-1144 (1931).
- [43] C.C.J. Roothaan, *New Developments in Molecular Orbital Theory*. Rev. Mod. Phys. **23**, 69-89 (1951).
- [44] J.A. Pople and D.L. Beveridge. *Approximate Molecular Orbital Theory*, Publisher: McGraw-Hill, New York, 1970.
- [45] E. Lewars. *Computational chemistry introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 1st ed.; Publisher: Kluwer Academic Publishers, New York, 2003; pp. 339-436.
- [46] R. Pariser and R.G. Parr. *A Semi-Empirical Theory of the Electronic Spectra and Electronic Structure of Complex Unsaturated Molecules. II**. J. Chem. Phys. **21**, 767-776 (1953); J.A. Pople. *Electron interaction in unsaturated hydrocarbons*. Trans. Faraday Soc. **49**, 1375-1385 (1953).

- [47] J.A. Pople and G.A. Segal. *Approximate SelfConsistent Molecular Orbital Theory. III. CNDO Results for AB₂ and AB₃ Systems*. J. Chem. Phys. **44**, 3289-3296 (1966).
- [48] J.A. Pople, D.L. Beveridge and P.A. Dobosh. *Approximate Self-Consistent Molecular-Orbital Theory. V. Intermediate Neglect of Differential Overlap*. J. Chem. Phys. **47**, 2026-2033; R.N. Dixon *Approximate self-consistent field molecular orbital calculations for valence shell electronic states*. Mol. Phys. **12**, 83-90 (1967).
- [49] J.A. Santry, D.P. Santry and G.A. Segal. *Approximate SelfConsistent Molecular Orbital Theory. I. Invariant Procedures*. J. Chem. Phys. **43**, S129-S135 (1965); J.A. Pople and G.A. Segal *Approximate SelfConsistent Molecular Orbital Theory. II. Calculations with Complete Neglect of Differential Overlap*. J. Chem. Phys. **43**, S136-S151 (1965).
- [50] J.J.P. Stewart. *Optimization of Parameters for Semiempirical Methods I. Method*. J. Comp. Chem. **10**, 209-220 (1989).
- [51] M.J.S. Dewar. *The Molecular Orbital Theory of Organic Chemistry*. Publisher: McGraw-Hill, New York, 1969.
- [52] I.N. Levine. *Quantum Chemistry*, 5th Ed., Publisher: Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2000.
- [53] N. Argaman, G. Makov, *Density functional theory: An introduction*. Am. J. Phys. **68**, 69-79 (2000).
- [54] R.G. Parr and W. Yang, *Density-Functional theory of atoms and molecules*, 1st ed.; Publisher: Oxford University Press, New York, 1989.
- [55] W. Koch and M.C Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, 2nd ed.; Publisher: John Wiley & Sons, Germany, 2001.
- [56] L.H. Thomas, *The calculation of atomic field*. Proc. Camb. Phil. **23**, 542-548 (1927).
- [57] E. Fermi, *Un Metodo Statistico per la Determinazione di alcune Prioprietà dell'Atomo. Endiconti: Accademia Nazionale dei Lincei*. Rend. Accad. **54**, 602-607 (1927).
- [58] P. Hohenberg and W. Kohn, *Inhomogeneous Electron Gas*. Phys. Rev. **136**, B864-B871 (1964).
- [59] W. Kohn and L.J. Sham, *Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Phys. Rev. **140**, A1133-A1138 (1965).

- [60] C. Fiolhais, F. Nogueira and M. Marques *Lecture Notes in Physics*, 1st ed.; Publisher: Springer, New York, 2003.
- [61] P.A.M. Dirac, *Note on exchange phenomena in the Thomas atom*. Proc. Cambridge Phil. Soc. **26**, 376-385 (1930).
- [62] U. von Barth and L. Hedin, *A local exchange-correlation potential for the spin polarized case*. J. Phys. C **5**, 1629-1642 (1972).
- [63] O. Gunnarsson and B. Lundqvist, *Exchange and correlation in atoms, molecules, and solids by the spin-density-functional formalism*. Phys. Rev. B **13**, 4274-4298 (1976).
- [64] D.M. Ceperley and B.J. Alder, *Ground State of the Electron Gas by a Stochastic Method*. Phys. Rev. Lett. **45**, 566-569 (1980).
- [65] J.P. Perdew and W. Yue, *Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation*. Phys. Rev. B **33**, 8800-8802 (1986).
- [66] K. Capelle, *A Bird's-Eye View of Density-Functional Theory*. Braz. J. Phys., São Paulo, **36**, 1318-1343 (2006).
- [67] J.P. Perdew, K. Burke and M. Ernzerhof, *Generalized Gradient Approximation Made Simple*. Phys. Rev. Lett. **77**, 3865-3868 (1996); *ibid* **78**, 1396-1396 (1997), V. Staroverov, G.E. Scuseria, J.P. Perdew, E.R. Davidson and J. Katriel. *High-density limit of the Perdew-Burke-Ernzerhof generalized gradient approximation and related density functionals*. Phys. Rev. A **74**, 044501 (2006).
- [68] A.D. Becke. *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior*. Phys. Rev. A **38**, 3098-3100 (1988).
- [69] C. Lee, W. Yang and R.G. Parr. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys. Rev. B **37**, 785-789 (1988).
- [70] A.D. Becke. *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. J. Chem. Phys. **98**, 5648-5652 (1993).
- [71] P.J. Stephens, F.J. Devlin, C.F. Chabalowski and M.J. Frish *Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields*. J. Phys. Chem. **45**, 11623-11627 (1994).
- [72] Lewars, E.G. *Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 1st ed.; Publisher: Springer, Germany, 2003; pp. 297-299.

- [73] E. Runge and E.K.U. Gross. *Density-Functional Theory for Time-Dependent Systems*. Phys. Rev. Lett. **52**, 997-1000 (1984).
- [74] K. Burke et al. *The ABC of DFT* (Department of Chemistry, University of California-Irvine 2007).
- [75] R.E. Stratmann, G.E. Scuseria and M.J Frisch. *An efficient implementation of time-dependent density-functional theory for the calculation of excitation energies of large molecules*. J. Chem. Phys. **109**, 8218-8224 (1998).
- [76] A. Onufriev. *Implicit Solvent Models in Molecular Dynamics Simulations: A Brief Overview*. Annu. Rep. Comput. Chem. **4**, 125-137 (2008).
- [77] J. Tomasi, B. Mennucci and E. Cancès. *The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level*. J. Mol. Struc. **464**, 211-226 (1999).
- [78] M.S.H. Akash and K. Rehman. *Essentials of Pharmaceutical Analysis*. Publisher: Springer, Singapore, 2020.
- [79] G.G. Stokes. *On the change of refrangibility of light*. Phil. Trans. R. Soc. (London) **142**, 463-562 (1852).
- [80] F. Artizzu *Near-Infrared Luminescent Lanthanide Complexes of Quinolinol Ligands: Structure/Properties Relationship*. Ph.D. Thesis, University of Cagliari, 2008.
- [81] P. Leyton, J Brunet, V. Silva, C. Paipa, M.V. Castillo and S.A. Brandán. *An experimental and theoretical study of L-tryptophan in an aqueous solution, combining two-layered ONIOM and SCRF calculations*. Spectrochim. Acta Part. A. **88**, 162-170 (2012).
- [82] B. Debuze, C.M. Dobson and C.E. Teague *Conformational Analysis of Tryptophan in Solution using Nuclear Magnetic Resonance Methods*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2. **4**, 730-735 (1981).
- [83] J.J. Eriksen, J.M.H. Olsen, K. Aidas, H. Agren, K.V. Mikkelsen and J. Kongssted. *Computational Protocols for Prediction of Solute NMR Relative Chemical Shifts. A Case Study of L-Tryptophan in Aqueous Solution*. J. Comput. Chem. **32**, 2853-2864 (2011).
- [84] E.M. Engler, J.D. Andose and P.V.R. Schleyer. *Critical Evaluation of Molecular Mechanics*. J. Am. Chem. Soc. **95**, 8005-8025 (1973).
- [85] S.L. Mayo, B.D. Olafson and W.A. Goddard III. *Dreiding: A Generic Force Field for Molecular Simulations*. J. Phys. Chem. **94**, 8897-8909 (1990).

- [86] Lewars, E.G. *Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 1st ed.; Publisher: Springer, Germany, 2003; pp. 43-78.
- [87] P. Mark and L. Nilsson. *A Molecular Dynamics Study of Tryptophan in Water*. J. Phys. Chem. B **106**, 9440-9445 (2002).
- [88] Jean-Claude G. Bünzli and S.V. Eliseeva *Basics of Lanthanide Photophysics*. Lanthanide Luminescence. Publisher: Springer, pp. 1-45 (2010).
- [89] G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart *RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I*. J. Comput. Chem. **27**, 1101-1111 (2006).
- [90] R.O. Freire, G.B. Rocha, and A.M. Simas. *Sparkle model for the calculation of lanthanide complexes: AM1 parameters for Eu(III), Gd(III), and Tb(III)*. Inorganic Chemistry **44**, 3299-3310 (2005).
- [91] R.O. Freire, G.B. Rocha, and A.M. Simas. *Sparkle/PM6 Parameters for all Lanthanide Trications from La(III) to Lu(III)*. Journal of Chemical Theory and Computation **6**, 2019-2023 (2010).
- [92] Filho, M.A.M., et al. *Sparkle/RM1 parameters for the semiempirical quantum chemical calculation of lanthanide complexes*. RSC Advances **3**, 16747-16755 (2013).
- [93] J. Ridley and M. Zernerl. *An intermediate neglect of differential overlap technique for spectroscopy: Pyrrole and the azines*. Theoretica chimica acta **32**, 111-134 (1973).
- [94] Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JAJr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB, Fox DJ (2016) Gaussian 16, Revision C.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT.

- [95] T.R. Cundari and W.J. Stevens. *Effective core potential methods for the lanthanides*. J. Chem. Phys **98**, 5555-65 (1993).
- [96] J.R. Platt. *Classification of Spectra of Cata-Condensed Hydrocarbons*. J. Chem. Phys. **17**, 484-495 (1949).
- [97] C.R. Carubelli, A.M.G. Massabni and S.R. de A. Leite. *Study of the Binding of Eu^{3+} and Tb^{3+} to L-phenylalanine and L-tryptophan*. J. Braz. Chem. Soc. **8**, 597-602 (1997).
- [98] A. Sigel and H. Sigel *Metal ions in biological systems*. The Lanthanides and Their Interrelations with Biosystems. Publisher: CRC Press, (2003).
- [99] F.S. Richardson. *Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular Systems*. Chem. Rev. **82**, 541-552 (1982).
- [100] O.L. Malta, H.F. Brito, J.F.S. Menezes, F.R. Goncalves e Solva, C. de Mello Donegá, S. Alvez Jr. *Experimental and theoretical emission quantum yield in the compound $\text{Eu}(\text{thenoyltrifluoroacetate})_3 \cdot 2(\text{dibenzyl sulfoxide})$* . Chem Phys. Lett. **282**, 233-238 (1998).
- [101] Lewars, E.G. *Computational chemistry: introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics*, 1st ed.; Publisher: Springer, Germany, 2003; pp. 210-231.
- [102] R.O. Freire, G.B. Rocha and A.M. Simas. *Lanthanide complex coordination polyhedron geometry prediction accuracies of ab initio effective core potential calculations*. J. Mol. Model. **12**, 373-389 (2006).
- [103] D.A. Rodrigues, N.B. da Costa and R.O. Freire. *Would the Pseudocoordination Centre Method Be Appropriate To Describe the Geometries of Lanthanide Complexes?*. J. Chem. Inf. Model. **51**, 45-51 (2011).
- [104] J.J.P. Stewart, MOPAC2009, 2009, Colorado Springs: USA. p. Stewart Computational Chemistry
- [105] J.E. Ridley and M.C. Zerner. *Triplet-States Via Intermediate Neglect of Differential Overlap - Benzene, Pyridine and Diazines*. Theor. Chim. Acta. **42**, 223-236 (1976).
- [106] F. Neese. *The ORCA program system*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Computational Molecular Science, **2**, 73-78 (2012).
- [107] A.V.M. de Andrade et al. *Theoretical model for the prediction of electronic spectra of lanthanide complexes*. J. Chem. Soc. Faraday Trans., **92**, 1835-1839 (1996).

- [108] B.R. Judd. Optical Absorption Intensities of Rare-Earth Ions, *Phys. Rev.* **127** (1962) 750–761.
- [109] G.S. Ofelt. *Intensities of Crystal Spectra of Rare-Earth Ions*, *J. Chem. Phys.* **37** (1962) 511–520.
- [110] A.J. Freeman and J.P. Desclaux. *Dirac-Fock Studies of Some Electronic Properties of Rare-Earth Ions*. *J. Magn. Magn. Mater.* **12** (1979) 11–21.
- [111] S.F. Mason, R.D. Peacock and B. Stewart. *Dynamic coupling contributions to the intensity of hypersensitive lanthanide transitions*. *Chem. Phys. Lett.* **29** (1974) 149–153.
- [112] O.L. Malta et al. *Theoretical Intensities of 4f-4f Transitions between Stark Levels of the Eu³⁺ Ion in Crystals*. *J. Phys. Chem. Solids.* **52** (1991) 587–593.
- [113] O.L. Malta. *A Simple Overlap Model in Lanthanide Crystal-Field Theory*. *Chem. Phys. Lett.* **87** (1982) 27–29.
- [114] O.L. Malta. *Theoretical Crystal-Field Parameters for the Yoc1 - Eu-3+ System - a Simple Overlap Model*. *Chem. Phys. Lett.* **88** (1982) 353–356.
- [115] W.T. Carnall, H. Crosswhite, and H.M. Crosswhite. *Energy level structure and transition probabilities of the trivalent lanthanides in LaF₃*, Argonne National Laboratory (1977).
- [116] R. Peacock. *The intensities of lanthanide $f \leftrightarrow f$ transitions, in Rare Earths*, Springer Berlin Heidelberg. (1975) 83–122.
- [117] O.L. Malta. *Ligand-rare-earth ion energy transfer in coordination compounds. A theoretical approach*. *J. Lumin.* **71** (1997) 229–236.
- [118] F.R.G.E. Silva and O.L. Malta. *Calculation of the ligand-lanthanide ion energy transfer rate in coordination compounds: Contributions of exchange interactions*. *J. Alloys Compd.* **250** (1997) 427–430.
- [119] O.L. Malta. *Mechanisms of non-radiative energy transfer involving lanthanide ions revisited*. *J. Non-Cryst. Solids.* **354** (2008) 4770–4776.
- [120] R. Freire, J.D.K. Dutra and T.D. Bispo. (31 de agosto de 2021). *LUMPAC: Lanthanide Luminescence Software Package*. <https://lumpac.pro.br/theory>