

TRABAJO DE FIN DE GRADO

MEMORIA FINAL

FOTOFÍSICA DE ANTIBIÓTICOS ACTIVADOS POR LUZ

Autora: Ariadna Plaza Romo

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Grado en Química

Curso 2023-24

ÍNDICE

1. Abstract.....	1
2. Introducción	1
3. Objetivos	5
4. Plan de trabajo	6
5. Métodos teóricos	7
5.1. Ecuación de Schrödinger	7
5.2. Métodos DFT y TD-DFT	8
5.3. Funciones de base.....	10
5.4. Dinámica molecular	10
5.5. Métodos híbridos.....	13
6. Resultados y discusión	14
6.1. Detalles computacionales	14
6.1.1. Espectros de absorción.....	14
6.1.2. Curvas de energía potencial	16
6.2. Elección del funcional - <i>Benchmarking</i>	17
6.2.1. Espectro de absorción estático.....	17
6.2.2. Espectro de absorción dinámico.....	18
6.3. Caracterización de los estados excitados.....	20
6.4. Efecto del disolvente	22
6.5. Efecto de la desprotonación	23
6.6. Efecto de la derivación del azobenceno	24
6.7. Mecanismo de fotoisomerización del azobenceno y la azoquinolona	25
7. Conclusiones.....	26
8. Bibliografía.....	27

1. Abstract

Quinolones are a group of synthetic antibiotics, widely used to treat bacterial infections. Their antibacterial activity consists of their interaction with the DNA gyrase and the Topoisomerase-IV enzymes to inhibit DNA replication. When coupled to azobenzene, they can behave as a photoswitchable antibiotic, that isomerizes from the *trans* to the *cis* upon light absorption. The dependence on the absorption wavelength allows a high spatiotemporal control in the photoactivation. In this project, the theoretical study of a photoswitchable azoquinolone has been carried out using the Time Dependent Density Functional Theory within hybrid Quantum Mechanics/Classical approaches, combined with Molecular Dynamics simulations. Specifically, the effects of the solvation, the deprotonation, and the derivation of azobenzene in the absorption spectra of the azoquinolone have been studied. Moreover, the regions of the potential energy surfaces involved in the photoisomerization process have been obtained for both the azoquinolone and the azobenzene in vacuum. The results predict that the *trans*→*cis* photoisomerization mechanism of the azoquinolone leads to a higher quantum yield than that of the azobenzene, as a consequence of the lower energy of its $\pi\pi^*$ state that leads to a lower $\pi\pi^*/n\pi^*$ energy *gap*, and the lower energy barrier to reach the $\pi\pi^*/n\pi^*$ crossing point. In this way the azoquinolone precludes the population of other competitive pathways.

2. Introducción

Los antibióticos son una de las revoluciones médicas más importantes del siglo XX. Sin lugar a dudas, han sido un gran avance para la sociedad ya que han aumentado considerablemente la esperanza de vida. Tras el descubrimiento de la penicilina en 1928, los hallazgos de productos naturales con efectos antibacterianos crecieron exponencialmente. Todos ellos contribuyeron positivamente a los avances de la medicina hasta mediados de los años cincuenta, cuando la eficacia de los antibióticos comenzó a disminuir debido al desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias (1). Esto se debe a que los microorganismos se encuentran sometidos a una alta presión evolutiva selectiva y, por tanto, se favorecen mutaciones que les proporcionan esta resistencia (2). Además, el uso abusivo e inadecuado de los antibióticos acelera su pérdida de eficacia. Esto ocurre porque las bacterias se ven innecesariamente expuestas a estos antibióticos, desarrollando así resistencia ante ellos.

Los antibióticos son compuestos químicos capaces de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que son producidos por un ser vivo o fabricados por síntesis (3).

Uno de los problemas que presentan los fármacos convencionales es su falta de especificidad. Una vez entra en el organismo infectado, el antibiótico actúa sobre su totalidad, es decir, ataca a todas sus bacterias, inhibiendo la reproducción de las que provocan la infección, pero también afectando a las que el organismo necesita para su correcto funcionamiento. Además, el fármaco se deshecha aún siendo activo y, por tanto, se exponen también las bacterias del medio a su efecto. Todo ello contribuye al desarrollo de su resistencia a los fármacos.

Los fármacos activados por luz son una alternativa a los fármacos convencionales que ofrece un alto control espaciotemporal de la actividad biológica. Estos tratan de mejorar su especificidad mediante el control óptico irreversible o reversible. Si los cambios en el fármaco tras la irradiación son irreversibles, entonces se habla de *photo-triggers*, que son biomoléculas con un grupo protector fotosensible, que se desprende al interaccionar con la luz, quedando el fármaco activo hasta su degradación. Por otro lado, si lo que produce la luz son cambios reversibles, los compuestos se denominan *photoswitches*. Estos cambios pueden producirse por la apertura y cierre de anillos, o por isomerizaciones *cis-trans* (4). Este trabajo se centra en el estudio de los *photoswitches* que, idealmente, en la oscuridad tienen que ser biológicamente inactivos, pero tras ser irradiados con luz de una determinada longitud de onda, tienen que sufrir un cambio conformacional que los active (2).

La luz tiene numerosas ventajas como agente externo activador de estos fármacos (2). Por un lado, es relativamente no invasiva y bioortogonal, es decir, no perturba la actividad biológica en los organismos, ni contamina la muestra. Por otro lado, tiene una gran resolución espaciotemporal, ya que se puede seleccionar con alta precisión el área diana, y su efecto se ve limitado al tiempo de activación; lo cual no es posible con los antibióticos convencionales, que se distribuyen e interaccionan sistémicamente por tiempos poco controlados. Además, se tiene un gran dominio de la activación de estos fármacos, por ser esta dependiente de la longitud de onda y de la intensidad de la luz incidente. Sin embargo, hay cinco requisitos que deben de seguir estos compuestos para poder ser empleados como fotofármacos: la especie debe de absorber luz de manera efectiva a una longitud de onda compatible con los sistemas biológicos, es decir, fuera de la región UV nociva para los organismos vivos, $\lambda \geq 340$ nm, pero sin llegar al IR, $\lambda \leq 800$ nm; la actividad biológica de las dos conformaciones de la molécula

tiene que ser sustancialmente diferente; ambas conformaciones, antes y después de la irradiación, deben de ser estables en condiciones biológicas; debe de haber un elevado rendimiento cuántico de fotoisomerización; y las transiciones electrónicas han de tener fuerzas de oscilador, f , elevadas para absorber luz eficazmente (4).

El azobenceno es el *photoswitch* por excelencia, por cubrir la mayoría de los requisitos mencionados anteriormente. El azobenceno fotoisomeriza de su forma *trans* a la *cis* tras la absorción de luz, tal y como se ve en la Figura 1 (A) (5). Por este motivo, muchos *photoswitches* son derivados del azobenceno.

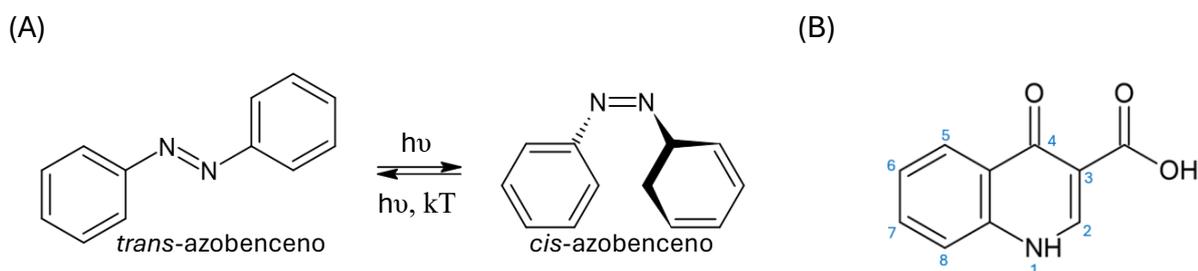


Figura 1. (A) Isomerización del azobenceno. (B) Quinolona genérica con numeración de las posiciones para posibles sustituciones

El espectro de absorción del *trans*-azobenceno muestra dos bandas diferenciadas en la región UV/Vis: una, a 316 nm, que viene de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$; y otra a 443 nm, que corresponde a la transición prohibida $n \rightarrow \pi^*$. Por otro lado, el espectro de absorción del *cis*-azobenceno presenta una banda a 280 nm, que corresponde a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, y otra a 443 nm, que viene de la transición $n \rightarrow \pi^*$. Cabe destacar que la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ excita al azobenceno a su segundo estado excitado, S_2 , y la $n \rightarrow \pi^*$ lo excita al primer estado excitado, S_1 , (5).

Tanto la especie *cis* como la especie *trans* sufren isomerización por su excitación a ambos estados electrónicos S_1 y S_2 . Sin embargo, la suma de los rendimientos cuánticos ($\Phi_{trans \rightarrow cis} + \Phi_{cis \rightarrow trans}$) no es igual a uno, lo que indica que existen varios caminos para la isomerización. Al excitar la conformación *trans* al estado S_2 ($\pi \rightarrow \pi^*$), el sistema decae rápidamente por conversión interna al S_1 . Y la relajación posterior al estado fundamental puede ocurrir por el camino reactivo, acabando en la conformación *cis*, o por el camino no reactivo, volviendo de nuevo a la conformación de equilibrio *trans*, obteniéndose un rendimiento cuántico de $\Phi_{S_2} = 12\%$. Análogamente, tras la excitación del *trans*-azobenceno al estado oscuro S_1 ($n \rightarrow \pi^*$), se accede de nuevo a ambos caminos, con la diferencia de que el rendimiento cuántico de la fotoisomerización en este caso es superior que el obtenido con la excitación al S_2 , $\Phi_{S_1} = 28\%$. Existen diferentes teorías que explican esta diferencia de rendimientos y muchas coinciden en

que el exceso de energía vibracional del S_2 procedente de la relajación $S_2 \rightarrow S_1$ hace más accesible el camino de desactivación no reactivo, lo que reduce el rendimiento de la fotoisomerización. Cuando se habla de estado brillante, se hace referencia al que es más probable de poblar al excitar la molécula, mientras que los estados oscuros son aquellos cuya probabilidad de población es baja. En el caso del azobenceno, el estado brillante de menor energía es el estado S_2 , que es mucho más probable que el estado oscuro S_1 . Entonces, se asume la teoría de que el bajo rendimiento cuántico de la isomerización *trans*→*cis* viene provocado por el exceso de energía vibracional del S_2 procedente de la relajación $S_2 \rightarrow S_1$, lo que hace más accesible el camino de desactivación no reactivo; y, teniendo en cuenta que la excitación más probable es la que lleva al electrón al estado excitado S_2 , una forma de aumentar su rendimiento cuántico es reducir el *gap* S_2/S_1 , lo que se puede conseguir mediante la derivación del azobenceno (6).

La isomerización desde *cis*-azobenceno no ha sido tan estudiada como la que parte del *trans*-azobenceno, pero tiene lugar tanto por vía lumínica, como por vía térmica. Esto es así porque en lo que respecta a su potencial uso como *photoswitch* es preferible optar por la fotoisomerización en sentido *trans*→*cis* y la isomerización térmica en el sentido opuesto, ya que ambas bandas de absorción se solapan (6).

Las quinolonas son agentes antibacterianos ampliamente utilizados como remedio para algunas infecciones bacterianas. Estos compuestos inhiben la replicación del ADN de las bacterias, mediante su interacción con la ADN-girasa o la topoisomerasa IV, dos enzimas esenciales para la síntesis del ADN. Al inhibirlas, se produce una acumulación de rupturas en las cadenas de ADN bacteriano, lo cual impide la replicación y la transcripción, provocando finalmente la muerte de la bacteria. La Figura 1 (B) muestra la estructura general de las quinolonas utilizadas como antibióticos.

Modificando los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 6, 7 y 8, se puede controlar la eficacia y rango de acción de la quinolona. Así, dependiendo del tipo de bacteria que desee combatirse, se utilizarán especies diferentemente sustituidas (7).

El compuesto elegido como objeto de estudio en el presente trabajo, Figura 2, es un derivado de azobenceno que cambia de su conformación *trans* a su conformación *cis*, tras la irradiación de luz a 365 nm. De acuerdo con un estudio experimental (2), en la oscuridad la molécula se encuentra en su conformación *trans*, que corresponde con la forma inactiva del fotofármaco,

mientras que, con la absorción de luz a 365 nm, la quinolona pasa a su conformación *cis*, que es la que tiene actividad biológica como antibiótico. En este estudio experimental (2), además, se demuestra su buen funcionamiento como *photoswitch* antimicrobiano; por lo que con este trabajo se pretende estudiar su mecanismo de fotoisomerización con modelos computacionales. No obstante, este estudio forma parte de un proyecto más grande, donde también se estudiará el mecanismo de acción de este fotofármaco en el medio biológico.

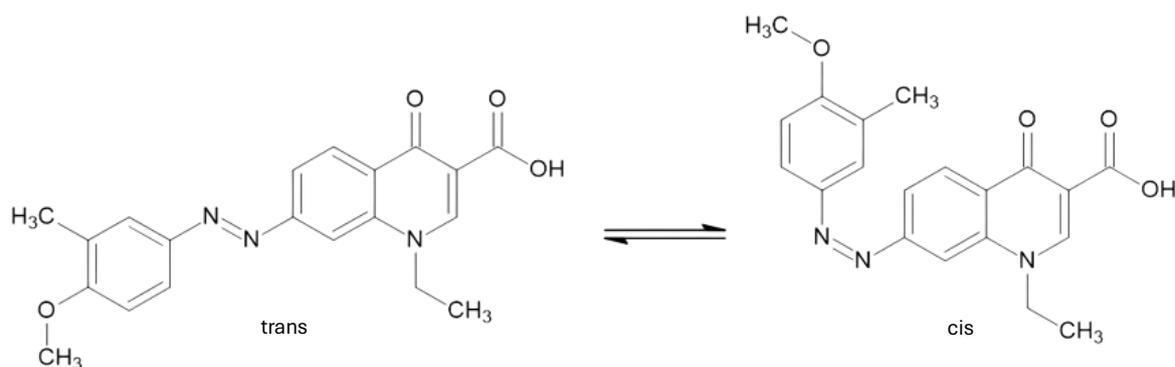


Figura 2. Equilibrio *trans-cis* de la azoquinolona de estudio

Así, los principales objetivos de este trabajo serán el estudio del espectro de absorción de la azoquinolona y la exploración de las diferentes regiones de la superficie de energía potencial de la molécula en el vacío, para comprender mejor su mecanismo de fotoisomerización y compararlo con el azobenceno.

3. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es el estudio de la fotofísica de la azoquinolona de la Figura 2 como antibiótico activado por luz, para comprobar que posee una fotofísica adecuada para ser utilizada como fotofármaco. Para lo cual, se plantean varios objetivos específicos: (i) Elección de un funcional DFT (*Density Functional Theory*) adecuado para llevar a cabo los cálculos cuánticos mediante comparación del espectro de absorción teórico de la molécula en agua con los datos experimentales. (ii) Estudio del efecto que tiene en el espectro de absorción el uso distintos métodos, estáticos y dinámicos; los cálculos en distintos medios, vacío y agua; la desprotonación de la azoquinolona, azoquinolona protonada y desprotonada; y la derivación del azobenceno, para formar la azoquinolona. (iii) Estudio del mecanismo de fotoisomerización de la azoquinolona y del azobenceno en el vacío, a través de la obtención de sus curvas de energía potencial. (iv) Comparación de los mecanismos de fotoisomerización de la azoquinolona y del azobenceno, para el análisis del efecto de la derivación.

Por otro lado, además de estos objetivos, se buscan otros objetivos transversales para el trabajo: (i) Familiarización con el uso remoto de ordenadores para la realización de cálculos cuánticos y clásicos. (ii) Toma de contacto con varios programas de modelización computacional (*Gaussian 16* (8), *Amber 20* (9)) y visualización (*Gaussview* (10), *Gmolden* (11), *VMD* (12)), así como con el sistema operativo Linux. (iii) Aprendizaje de los fundamentos teóricos en los que se basan los cálculos que se realizarán. (iv) Adquisición de habilidades para el mejor manejo de material bibliográfico.

4. Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos descritos en el apartado anterior se ha seguido el siguiente plan de trabajo: (i) Revisar la bibliografía relacionada con la motivación bioquímica del proyecto, así como la relativa al proceso de fotoisomerización de la azoquinolona de estudio y del azobenceno. (ii) Tener una primera toma de contacto y aprender las bases generales del sistema operativo Linux y de los programas de modelación y visualización de moléculas *Amber 20* (9), *VMD* (12), *Gaussian* (8) / *Gaussview* (10) y *Gmolden* (11), necesarios para la realización del proyecto. (iii) Optimizar la geometría de equilibrio de la azoquinolona de estudio y calcular su espectro de absorción de singletes en el vacío con cuatro funcionales diferentes, para comparar los resultados con la bibliografía y así poder elegir el funcional más adecuado; y analizar los resultados obtenidos (energías, fuerzas osciladoras y carácter de los orbitales de los estados en la región Frank Condon). (iv) Obtener el espectro de absorción de la azoquinolona con QM/MM (*Quantum Mechanichs/Molecular Mechanics*) y con QM/PCM (*Quantum Mechanichs/Polarizable Continuum Model*), con el fin de comparar los resultados con los de la bibliografía y con los obtenidos en estático. (v) Calcular las regiones relevantes de la superficie de energía potencial involucradas en la fotoisomerización, como el cruce de los estados $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$, y el de los estados $n\pi^*$ y GS (*Ground State*); y el estado de transición de la molécula entre las conformaciones *trans* y *cis*, para completar así el trazado de su curva de energía potencial. (vi) Realizar un estudio análogo al descrito para el mecanismo de fotoisomerización de la azoquinolona, para el azobenceno en el vacío.

5. Métodos teóricos

5.1. Ecuación de Schrödinger

La evolución temporal del estado de un sistema viene dada por la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo, sin embargo, para calcular las propiedades físicas de los sistemas estacionarios, que no dependen del tiempo, puede utilizarse un operador hamiltoniano, \hat{H} , que no dependa de este, y la parte de la función de onda que tampoco depende de él, obteniéndose la expresión de la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo:

$$\hat{H} \psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = E \psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad [1]$$

La ecuación [1] solo tiene solución analítica para sistemas de un solo electrón. Así, si se quiere estudiar un sistema con más electrones, es necesario recurrir a aproximaciones como la de Born Oppenheimer (14) que, aunque no permite resolver la ecuación de manera exacta, simplifica el problema. Esta aproximación asume que el término de la energía cinética nuclear es nulo, porque los núcleos tienen una masa suficientemente mayor a la de los electrones, como para poder despreciar su movimiento, de manera que las interacciones entre ellos, y por tanto la energía potencial entre núcleos, puede considerarse constante y la energía cinética nuclear se desprecia. Con esto, la ecuación de Schrödinger pasa a ser la ecuación de Schrödinger electrónica, cuya función de onda se puede escribir como combinación lineal de otras conocidas:

$$\psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = \sum_{\alpha} C_{\alpha} \cdot \Phi_{\alpha}(\mathbf{r}) \quad [2]$$

donde $\psi_e(\mathbf{r}; \mathbf{R})$ es la función de onda electrónica en función de las coordenadas electrónicas (\mathbf{r}) y la dependencia paramétrica de las coordenadas nucleares (\mathbf{R}); C_{α} son los coeficientes de la combinación lineal; y $\Phi_{\alpha}(\mathbf{r})$ son funciones que representan a los orbitales atómicos, y han sido parametrizadas para reproducir ciertas propiedades atómicas.

Teniendo en cuenta el teorema variacional, que postula que cualquier función de onda aproximada tiene siempre mayor o igual energía que la función de onda exacta, se tiene como objetivo la obtención de los coeficientes, C_{α} , que minimicen la energía del sistema:

$$\frac{\partial E_e}{\partial C_{\alpha}} = 0 \quad [3]$$

Existen varios métodos que resuelven la ecuación [3] como, por ejemplo, el método de Hartree-Fock (HF), que tiene como objetivo calcular la función de onda electrónica que proporcione la energía más baja para el sistema. Sin embargo, al no tener en cuenta la correlación entre electrones de espín opuesto, HF no puede proporcionar la energía exacta del sistema. Por tanto, se suele recurrir a otras aproximaciones, como la teoría del funcional de la densidad, para describir mejor la correlación electrónica.

5.2. Métodos DFT y TD-DFT

La teoría del funcional de la densidad (15) busca describir la estructura electrónica del sistema desde un enfoque basado en la densidad electrónica, en lugar de calcular la interacción entre todos los pares de electrones del sistema, como en HF. En DFT, la energía electrónica del sistema, E_e , se expresa como un funcional de la densidad electrónica, $\rho_e(\mathbf{r})$:

$$E_e = F[\rho_e(\mathbf{r})] \quad [4]$$

por lo que la energía total del sistema es función de las coordenadas de las partículas que lo componen.

En 1964, Hohenberg y Kohn asentaron las bases del DFT, mostrando que la energía es un funcional de la densidad y que, además, la densidad del sistema minimiza este funcional. El primer teorema de Hohenberg y Kohn, dice que cualquier propiedad del estado fundamental puede ser calculada a partir de la densidad electrónica (16). Además, la densidad electrónica, $\rho_e(\mathbf{r})$, ha de ser positiva:

$$\rho_e(\mathbf{r}) \geq 0 \quad [5]$$

y su integración en todo el espacio debe de proporcionar el número de electrones en el sistema, N :

$$\int \rho_e(\mathbf{r}) \, d\mathbf{r} = N \quad [6]$$

Por otro lado, de acuerdo con este teorema, la densidad electrónica también determina de manera unívoca el potencial externo al que están sometidos los electrones del sistema, siendo este la energía de interacción entre todos sus electrones y núcleos, o cualquier potencial ejercido sobre los electrones. Esta energía electrónica puede escribirse como:

$$E_e(\rho_e) = T_e(\rho_e) + E_{ee}(\rho_e) + E_{\text{ext}}(\rho_e) \quad [7]$$

donde $E_e(\rho_e)$ es la energía electrónica del sistema; $T_e(\rho_e)$, es la energía cinética electrónica; $E_{ee}(\rho_e)$, es la energía de interacción entre los electrones; $E_{ext}(\rho_e)$, es la energía de interacción de los electrones con otros agentes externos (partículas o campos) y, en el caso de moléculas aisladas en estado estacionario, es la interacción con los núcleos de la molécula; y todos ellos son función de la densidad electrónica.

El segundo teorema de Hohenberg y Kohn (16), postula que la densidad electrónica exacta del estado fundamental es aquella que minimiza la energía, al igual que asegura el teorema variacional:

$$\frac{\partial E_e(\rho_e)}{\partial \rho} = 0 \quad [8]$$

Sin embargo, no se conoce la relación entre la $E_e(\rho_e)$ y la densidad electrónica, ρ_e , por lo que no se puede obtener la energía de forma exacta. Por ello, se utiliza el método de Kohn-Sham, con el que se supone un sistema de referencia en el que los electrones no interaccionan y cuya densidad electrónica es igual a la del sistema real. Para ello, anulando $E_{ee}(\rho_e)$ de la ecuación [7], se obtiene la ecuación:

$$E_{e,ref}(\rho_e) = T_{e,ref}(\rho_e) + E_{ext,ref}(\rho_e) \quad [9]$$

que describe el sistema de referencia de electrones que no interaccionan, en el que la energía del sistema puede calcularse de manera exacta, $E_{e,ref}(\rho_e)$. Así, la diferencia energética entre el sistema real, $E_e(\rho_e)$, y el de referencia, $E_{e,ref}(\rho_e)$, es lo que se denomina energía de correlación e intercambio, E_{XC} :

$$E_{XC} = E_e(\rho_e) - E_{e,ref}(\rho_e) \quad [10]$$

E_{XC} incluye la energía que se ignora en el sistema de referencia (17). Actualmente, E_{XC} es desconocido y, por ello, se han desarrollado varios funcionales para aproximarlos, como B3LYP (18), BLYP o PBE, parametrizados para reproducir propiedades calculadas con métodos más exactos o experimentales.

Existe una versión dependiente del tiempo del DFT, denominada TD-DFT (*Time Dependent DFT*), que permite reformular las ecuaciones de manera que no solo se obtiene la energía del estado fundamental, sino que también pueden obtenerse las de los estados excitados, ya que se pueden estudiar los sistemas bajo la influencia de un campo electromagnético dependiente del tiempo, como el de la luz (19). Es el caso de la fotofísica de este proyecto, en el que la

radiación ultravioleta/visible-(UV/Vis) interacciona con los electrones de la molécula, excitándolos a estados electrónicos superiores (13).

5.3. Funciones de base

Las funciones de base describen matemáticamente los orbitales atómicos, cuya combinación lineal da lugar a los orbitales moleculares (14). Cuanto más grande sea la base, es decir, cuantas más funciones incluya, mejor será la descripción del sistema. Las bases más pequeñas contienen una única función por electrón, lo cual implica poca flexibilidad en el tamaño y en la forma de los orbitales. Esta flexibilidad se puede mejorar aumentando el número de funciones de base.

En este trabajo se ha utilizado la base de Dunning cc-pVDZ (20), que es una base de valencia doble zeta, VDZ, lo que significa que cada orbital atómico de valencia viene descrito por dos funciones; y polarizada, p, por lo cual, para cada átomo se introducen funciones de orbitales de momento angular superior al de la capa de valencia (en el ejemplo del N, se incorporan orbitales d). Con estas dos ampliaciones, se logra una mejor descripción de los orbitales moleculares, pues dan mayor flexibilidad en el tamaño y forma de los orbitales atómicos, respectivamente.

Sin embargo, para el estudio del espectro de absorción de la especie desprotonada aniónica de la azoquinolona se utiliza la correspondiente base aumentada, aug-cc-pVDZ (21). Esta base contiene funciones difusas, es decir, con términos exponenciales pequeños que permiten describir sistemas con electrones relativamente alejados del núcleo, como es el caso del anión.

5.4. Dinámica molecular

La dinámica molecular clásica (22) se utiliza cuando se quiere simular la evolución temporal de sistemas de gran tamaño, como sistemas biológicos. En estos procesos el medio tiene un papel importante, por lo que en la simulación se suelen incluir entre 10^5 y 10^6 átomos. Además, suelen ser procesos muy lentos, por lo que las simulaciones deben durar cientos de nanosegundos o, incluso, microsegundos. Todo esto hace que se tenga que calcular el gradiente de energía durante la simulación varios millones de veces; es decir, hace falta un método muy eficiente y, a la vez, relativamente preciso.

En los sistemas pequeños existe una clara geometría de equilibrio localizada en un mínimo de energía, alrededor del cual se encuentra la molécula la mayor parte del tiempo. Sin embargo, los sistemas grandes, con muchos átomos, tienen varios mínimos de energía térmicamente accesibles, por lo que, es necesario conocer la distribución de probabilidad del sistema, que viene dada por la distribución de Boltzmann en la que se asume equilibrio térmico, para poder calcular el valor medio de la propiedad de interés. Para hallar estos mínimos en la superficie de energía potencial de los sistemas grandes se usa la dinámica molecular.

Cuando se calculan dinámicas moleculares, se resuelven ecuaciones del movimiento, que se derivan de la ecuación de Newton:

$$F_i = m_i \cdot a_i = m_i \cdot \frac{dv_i}{dt} = \frac{dp_i}{dt} \quad [11]$$

en la que F_i es la fuerza que experimenta una partícula, m_i es la masa de dicha partícula, y a_i , su aceleración; así mismo, la aceleración puede expresarse como la derivada de la velocidad respecto al tiempo, $\frac{dv_i}{dt}$; y el momento lineal de una partícula, p_i , es igual a su masa por su velocidad. Y de la suposición de que los sistemas de estudio son conservativos, es decir, que su energía potencial solo depende de la posición de los átomos, y no del tiempo:

$$F_i = -\frac{dV_i}{dq_i} \quad [12]$$

donde la fuerza de una partícula, F_i , se define como el gradiente negativo de la energía potencial de esta partícula respecto a sus coordenadas espaciales, $-\frac{dV_i}{dq_i}$. Así, combinando las expresiones [11] y [12], se obtienen la primera [13] y la segunda [14] ecuación del movimiento, las ecuaciones Hamiltonianas del movimiento, que proporcionan la evolución de los momentos lineales, p_i , con el tiempo, t , y la evolución de las coordenadas, q_i , con el tiempo, de cada átomo del sistema:

$$\frac{dp_i}{dt} = -\frac{dV_i}{dq_i} \quad [13]$$

$$\frac{dq_i}{dt} = \frac{dT_i}{dp_i} \quad [14]$$

donde V_i y T_i son la energía potencial y la energía cinética de cada átomo del sistema. Las ecuaciones [13] y [14] no tienen solución exacta, por lo que hay que resolverlas numéricamente. Una de las formas de resolverlas numéricamente es mediante la aplicación del algoritmo de Velocity Verlet, que calcula las coordenadas y los momentos lineales a un tiempo determinado a partir de la información a tiempos anteriores:

$$q(t + \Delta t) = q(t) + \Delta t \cdot v(t) - \frac{\Delta t^2}{2m} \frac{dV(t)}{dq} \quad [15]$$

$$v(t + \Delta t) = v(t) - \frac{\Delta t}{2} \left(\frac{dV(t + \Delta t)}{dq} + \frac{dV(t)}{dq} \right) \quad [16]$$

donde $(t + \Delta t)$ hace referencia al tiempo al que se quieren calcular las coordenadas y la velocidad de la partícula; (t) se refiere al tiempo al que se conoce esta información; Δt es el incremento entre el tiempo anterior y el de estudio; q son las coordenadas de la partícula; v es la velocidad de la partícula; m es la masa de esta; y V es su energía potencial.

Para resolver las ecuaciones del movimiento es necesario calcular la derivada de la energía potencial con respecto a las coordenadas, es decir, el gradiente de la energía potencial, $\frac{dV_i}{dq_i}$. La dinámica molecular se refiere a las ecuaciones de Hamilton, [13] y [14], independientemente de cómo se calcule este gradiente. No obstante, dependiendo de la forma en que se calcule, se diferencia entre: dinámica molecular clásica, si se utiliza un campo de fuerza (en inglés, *force field*); dinámica molecular *ab initio*, si se resuelve la ecuación de Schrödinger; y dinámica molecular QM/MM o QM/PCM, si se combinan ambas formas.

En el caso de la dinámica molecular clásica, se utiliza un campo de fuerza. Este viene definido por una ecuación relativamente simple que relaciona la energía potencial con las coordenadas internas de las partículas del sistema (geometría):

$$V_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{enlace}}} V_{\text{enlace}} + \sum_{i=1}^{N_{\text{ángulo}}} V_{\text{ángulo}} + \sum_{i=1}^{N_{\text{diedro}}} V_{\text{diedro}} + \sum_{i>j} V_{\text{no enlazante}} \quad [17]$$

$$V_{\text{total}} = \sum_{i=1}^{N_{\text{enlace}}} \frac{1}{2} k_b (r - r_o)^2 + \sum_{i=1}^{N_{\text{ángulo}}} \frac{1}{2} k_a (\theta - \theta_o)^2 + \sum_{i=1}^{N_{\text{diedro}}} k_t (1 + \cos(n\omega + \gamma)) \\ + \sum_{i>j} \frac{q_i \cdot q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} + 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad [18]$$

donde V_{total} es la energía potencial total. La energía potencial de enlace, V_{enlace} , y de ángulo, $V_{\text{ángulo}}$, vienen descritas por potenciales armónicos, en los que k_b y k_a son las constantes de fuerza; r es la distancia entre los átomos que interactúan; r_o es la distancia de equilibrio entre estos; θ es el ángulo entre los dos átomos; y θ_o , el ángulo de equilibrio entre ellos. La energía potencial de diedro, V_{diedro} , viene descrita por potenciales de Fourier, en los que k_t , n , y γ son los parámetros que definen la forma del potencial; donde k_t es la altura de la barrera energética del sistema; n , el número de mínimos en la curva de potencial; γ , el ángulo que

determina la posición de los mínimos; y ω es el ángulo diedro. Y la energía potencial no enlazante, $V_{\text{no enlazante}}$, en los *Fixed Charge Force Fields*, que son los campos de fuerza que no tienen en cuenta la polarizabilidad de las moléculas, tiene tres componentes: las interacciones de Coulomb, las de Van der Waals y las de repulsión; donde q_i y q_j son las cargas de los átomos que interactúan; ϵ es la permitividad del medio; r_{ij} es la distancia entre los dos átomos; ϵ_{ij} es el valor del mínimo de la curva; y σ_{ij} es la distancia entre estos, cuando el potencial es nulo. Esta ecuación [18] puede derivarse fácilmente para obtener $\frac{dV_i}{dq_i}$, resolver las ecuaciones del algoritmo de Verlet y, hallar la evolución temporal del sistema.

5.5. Métodos híbridos

El cálculo de sistemas grandes con sus entornos es posible gracias a la dinámica molecular (MD), como se describe en el apartado 5.4. Sin embargo, al utilizar este método de cálculo, se pierde mucha precisión en la región de interés, ya que no es capaz de describir los efectos cuánticos como la ruptura de los enlaces o los procesos fotofísicos.

Para resolver este problema, se pueden utilizar los métodos híbridos (23), QM/clásicos, con los que el sistema se divide en dos regiones: una interior, con el soluto de interés, que será tratada cuánticamente (región I (QM)); y una exterior, el medio, que será tratada clásicamente (región O (clásica)). El medio puede describirse tanto de manera implícita, mediante modelos continuos, como el PCM; como de manera explícita, mediante la incorporación de las moléculas del medio al sistema. Estos modelos permiten calcular la energía total del sistema, E , como la suma de la energía de ambas regiones, $E_I(\text{QM})$ y $E_O(\text{clásica})$, y la energía de interacción entre estas, $E_{I/O}$:

$$E = E_I(\text{QM}) + E_O(\text{clásica}) + E_{I/O} \quad [19]$$

En el modelo de disolvente implícito, PCM (24), el disolvente se considera como un continuo dieléctrico polarizable; en el que el medio y la región QM se polarizan mutuamente. En este caso, el segundo término de la ecuación [19] no existe; y el tercer término de esta ecuación, se calcula a partir de la ecuación de Poisson, que depende de la constante dieléctrica del continuo dieléctrico y de la distribución de cargas del medio. Sin embargo, para simplificar los cálculos, se sustituye el continuo dieléctrico infinito por una cavidad de tamaño y forma dependientes de la especie de la región QM, el *photoswitch* en este caso.

Por otro lado, en el modelo de disolvente explícito, MM, el segundo término de la ecuación [19] se calcula mediante un campo de fuerza; y el último término de esta ecuación, que hace referencia a la energía de la interacción I/O, se calcula según la expresión:

$$E^{\text{QM/MM}}(I/O) = E_{\text{enlazante}}^{\text{MM}}(I/O) + E_{\text{VdW}}^{\text{MM}}(I/O) + E^{\text{el}}(I/O) \quad [20]$$

donde los superíndices MM y QM/MM, hacen referencia al nivel de cálculo; el superíndice *el* denota al término electrostático; los subíndices (enlazante y VdW) hacen referencia al tipo de fuerzas que actúan entre los enlaces próximos a la frontera I/O; e I/O hace referencia a la interacción entre las regiones interna, I (*inner*) y externa, O (*outer*). Sin embargo, lo más complejo de estos métodos, QM/MM, es el modelado de la interacción entre ambas regiones, $E^{\text{el}}(I/O)$ en la ecuación [20]. Para el cálculo de dicha interacción pueden utilizarse tres tipos de esquemas: *classical*, *electrostatic* y *polarizable embedding*.

Para los cálculos del presente trabajo se ha usado el *electrostatic embedding* para el cálculo de la interacción electrostática, término $E^{\text{el}}(I/O)$ en la ecuación [20], que consiste en el uso de un hamiltoniano efectivo que incluye las cargas de la región externa:

$$\hat{H}^{\text{eff}}|\psi_I\rangle = (\hat{H}_I^0 + \hat{H}_{I/O})|\psi_I\rangle = E|\psi_I\rangle \quad [21]$$

$$\hat{H}_{I/O} = \hat{H}_{I/O}^{\text{el}} = \sum_i q_i^O(\mathbf{r}_i)\hat{V}^I(\mathbf{r}_i) \quad [22]$$

donde el hamiltoniano efectivo, \hat{H}^{eff} , que se define como la suma del hamiltoniano de la región QM, \hat{H}_I^0 , más el hamiltoniano de la región QM/MM, $\hat{H}_{I/O}$, actúa sobre la función de onda de la región QM, ψ_I ; y E se refiere a la energía de la región QM/MM. Por otro lado, en la ecuación [22], $\hat{H}_{I/O}^{\text{el}}$ es el hamiltoniano de la región QM/MM; q_i^O son las cargas de los átomos de la zona clásica, de coordenadas \mathbf{r}_i ; y $\hat{V}^I(\mathbf{r}_i)$, el potencial electrostático creado por la región interna. De esta forma, la función de onda de la región interna QM es polarizada por las cargas clásicas de la región externa, que no sufren polarización por la región QM.

6. Resultados y discusión

6.1. Detalles computacionales

6.1.1. Espectros de absorción

Para llevar a cabo los cálculos de dinámica molecular, lo primero que se ha hecho ha sido preparar el sistema. Para ello, se ha optimizado la geometría del estado fundamental de la

trans-azoquinolona en agua, con el funcional CAM-B3LYP (26) y la base difusa aug-cc-pVDZ (21), con el programa *Gaussian 16* (8). Después, se ha calculado el estado de protonación de esta a pH=7.4, para comprobar que se encuentra mayormente desprotonada. A continuación, se ha optimizado la especie desprotonada a CAM-B3LYP (26)/aug-cc-pVDZ (21) y se han calculado sus cargas electrostáticas a HF/6-31G*, se ha introducido la molécula en un octaedro de agua y se ha neutralizado el sistema con los iones de sodio y cloro necesarios mediante el algoritmo *tleap* de *Amber 20* (9).

Una vez preparado el sistema, se ha procedido a su minimización, para lo que se ha usado un máximo de 5000 ciclos, y 100 pasos. Las interacciones intermoleculares se calculan solamente dentro de una esfera con un radio (*cutoff*) de 12.00 Å.

Para calcular la dinámica, es necesario acondicionar el sistema en cuanto a su temperatura y presión. En el proceso de *heating*, se ha fijado una temperatura inicial de 0.00 K, y una temperatura final de 303.15 K, eligiéndose un termostato Langevin, que imita una situación en la que el sistema está inmerso en un baño térmico y experimenta colisiones aleatorias con otras partículas con una frecuencia de colisión de 1 ps^{-1} . En este proceso de *heating*, el *cutoff* ha sido de 12.00 Å también. El número de pasos en el *heating* ha sido de 500000, y el tamaño del paso (*time step*), 0.002 ps. El calentamiento se ha llevado a cabo en el conjunto termodinámico NVT, en el que el número de partículas, el volumen y la temperatura (una vez alcanzados los 303.15 K) es constante.

La producción, se ha llevado a cabo en el conjunto NPT, donde se controla la presión mediante un baróstato de Berendsen y la temperatura con el mismo termostato descrito anteriormente. Las interacciones no enlazantes se calculan con un *cutoff* de 12.00 Å. Además, el número de pasos en la producción ha sido de 60000000 y el *time step*, de 0.002 ps. El *time step* se ha podido fijar a un valor alto, porque se ha usado *SHAKE* (25) para congelar los enlaces que contienen algún átomo de hidrógeno. Además, se ha usado el programa *VMD* (12) para localizar a los átomos involucrados en el diedro del grupo azo, que se ha fijado a 180 °. Durante todo el protocolo de MD se han calculado las interacciones electrostáticas con el método de *Particle Mesh Ewald*, que es una variante del sumatorio Ewald.

Una vez terminada la simulación de dinámica molecular, se han escogido 100 geometrías equiespaciadas a lo largo de la dinámica y, de cada una, se calcula la energía de excitación del cromóforo en agua. Para describir el agua se han utilizado dos esquemas QM/clásicos:

electrostatic embedding QM/MM y QM/PCM. En el primero, las aguas se describen con un campo de fuerza MM, que polariza la densidad del cromóforo. En el segundo, las aguas explícitas se eliminan del sistema y se sustituyen por el modelo continuo PCM, donde existe una polarización mutua entre cromóforo y disolvente. Finalmente, las energías se convolucionan con funciones gaussianas para obtener los espectros dinámicos en agua MM y en agua PCM. El espectro de absorción también se ha calculado de manera estática en el vacío y en PCM, donde se han calculado las energías de excitación para la geometría optimizada.

La región QM en todos los cálculos del espectro de absorción (estáticos y dinámicos en agua MM y PCM) se han descrito mediante TD-DFT usando los funcionales B3LYP (18) y CAM-B3LYP (26) y la base aug-cc-pVDZ (21). Esta elección se ha hecho en base a un *benchmarking* de funcionales con cálculos estáticos que se explicará en la sección 6.2.

6.1.2. Curvas de energía potencial

Las superficies de energía potencial (en inglés, *Potential Energy Surfaces*, PES) de la fotoisomerización *trans-cis* del azobenceno y de la azoquinolona se han estudiado en el vacío con TD-DFT (CAM-B3LYP (26)/cc-pVDZ (20)) en *Gaussian 16* (8). El criterio para elegir el funcional CAM-B3LYP (26) se explica en el *Benchmarking* del apartado 6.2 y, en cuanto a la base de cálculo, se ha comprobado que los resultados de las energías de los diez primeros estados de excitación para la azoquinolona protonada no varían significativamente al cambiar de la base cc-pVDZ (20) a su correspondiente base aumentada aug-cc-pVDZ (21), como se ve en la Figura 3, por lo que se ha realizado el estudio con la base más pequeña, cc-pVDZ (20), para acelerar los cálculos.

En primer lugar, se ha excitado a la molécula desde el estado fundamental al S_2 en la región de Frank Condon. Desde ahí, se ha optimizado la geometría del estado excitado brillante, el S_2 , hasta encontrar un mínimo de energía o una intersección con el estado S_1 . Como, antes de llegar a un punto de degeneración con el S_1 , se ha llegado a un mínimo de energía del estado S_2 , se ha utilizado el programa *SHARC* (27), para minimizar la energía entre ambos estados y llegar a ese punto de corte S_2/S_1 . Desde aquí, se ha optimizado la geometría del estado S_1 , hasta llegar al punto de corte con el estado S_0 . A partir de este se ha calculado el estado de transición (TS) *trans-cis*. Y, por último, se ha realizado un cálculo de IRC (*Intrinsic Reaction Coordinate*), para conectar el TS calculado con las conformaciones *trans* y *cis* en el estado fundamental (14).

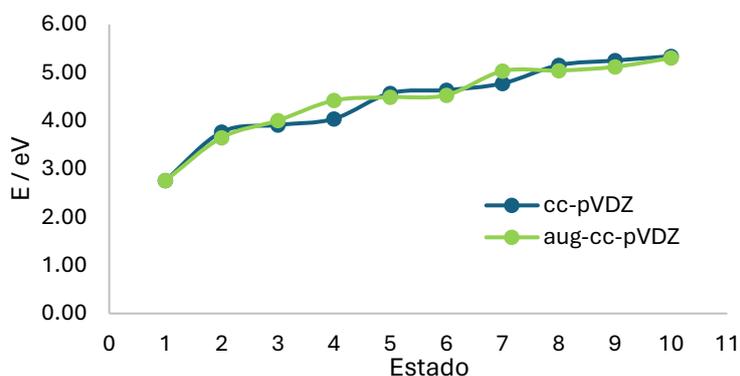


Figura 3. Energías de los estados excitados QM/Vacío en la azoquinolona neutra a CAM-B3LYP/cc-pVDZ y a CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ

6.2. Elección del funcional - *Benchmarking*

6.2.1. Espectro de absorción estático

Atendiendo a los resultados de un estudio teórico (13) que compara la exactitud de varios funcionales para el cálculo de estados excitados, se seleccionan cuatro funcionales (CAM-B3LYP (26), M06-2X (28), ω B97XD (29), B3LYP (18)) entre los que se elegirá el más apropiado para la realización de este proyecto.

La estructura de la azoquinolona desprotonada se optimiza en el estado fundamental de su conformación *trans* en agua (PCM), con cada uno de los funcionales, y la base aug-cc-pVDZ (21). A continuación, se obtiene el espectro de absorción de la molécula con cada funcional, calculando un *single point* (SP) desde la geometría del mínimo del GS (región Franck-Condon). Y, por último, se identifica el estado brillante más bajo en energía, es decir, el que tiene una mayor probabilidad de ser poblado a menor energía. Para esto, se analizan los resultados obtenidos para el valor de la fuerza del oscilador (f), que está relacionada con esta probabilidad.

En la Tabla 1 se recogen los datos obtenidos para este cálculo, y se ve cómo los funcionales CAM-B3LYP (26), M06-2X (28) y ω B97XD (29) coinciden en que el estado brillante de menor energía es el S_2 , dando valores de f cercanos a 1, frente a los valores próximos a 0 que se obtienen para el resto de los estados calculados. Sin embargo, se aprecia una gran discrepancia con los resultados obtenidos con el funcional B3LYP (18), para el que las fuerzas osciladoras resultan ser notablemente más bajas que las de los otros funcionales, y no hay ninguna que destaque frente al resto, sino que son dos, las de los estados S_3 y S_4 , las que tienen el mayor valor, similar entre sí (0.50 y 0.51, respectivamente). Además, se ve cómo la energía

de estos dos estados es muy similar (3.03 y 3.08 eV, respectivamente), por lo que, al encontrarse prácticamente degenerados, es posible que se trate de una intersección cónica.

Tras este primer estudio de *benchmarking*, se caracterizarán en más detalle los estados, explicándose cuáles son las transiciones más relevantes entre orbitales, con el funcional elegido para el trabajo.

Tabla 1. Energías QM/PCM de los estados excitados en la azoquinolona desprotonada con los 4 funcionales elegidos y aug-cc-pVDZ

Estado	B3LYP		CAM-B3LYP		M06-2X		ω B97XD	
	E / eV	f / Unid. Arb.	E / eV	f / Unid. Arb.	E / eV	f / Unid. Arb.	E / eV	f / Unid. Arb.
S ₁	2.60	0.00	2.81	0.00	2.58	0.00	2.80	0.00
S₂	2.68	0.12	3.54	1.21	3.62	1.21	3.58	1.22
S ₃	3.03	0.50	3.71	0.08	3.71	0.08	3.78	0.09
S₄	3.08	0.51	4.06	0.00	3.94	0.00	4.08	0.00
S ₅	3.31	0.08	4.33	0.22	4.33	0.26	4.35	0.23

Aunque se han calculado hasta diez estados excitados con cada funcional, tan solo se muestran los cinco primeros, ya que no se pretende irradiar a la molécula con luz con una energía tan alta como la necesaria para alcanzar estados excitados superiores, lo cual sería perjudicial para el organismo, por encontrarse en el rango del UV de onda corta. Además, para la elección del funcional más adecuado se analizan los resultados en PCM, para la especie desprotonada. Esto es así, porque los datos experimentales de referencia fueron obtenidos en disolución acuosa, a pH 9, al cual la azoquinolona se encuentra desprotonada.

6.2.2. Espectro de absorción dinámico

Se ha comprobado en el apartado 6.2.1 que los resultados con los funcionales M06-2X (28) y ω B97XD (29) son equivalentes a los obtenidos con CAM-B3LYP (26). Por tanto, para el estudio de los espectros de absorción dinámicos, se comparan los resultados a B3LYP (18) y a CAM-B3LYP (26), con los experimentales para elegir el funcional más apropiado de los dos para este sistema.

Con cada uno de los funcionales se calculan los espectros de absorción dinámicos, en agua explícita (QM/MM@MD) y en agua implícita (QM/PCM@MD). Es decir, se calculan los espectros teniendo en cuenta 100 geometrías que se toman de las dinámicas calculadas, sobre las que se hacen los cálculos de QM/MM y QM/PCM. Y estos se representan junto a los

resultados del espectro experimental y en estático, QM/PCM, como se ve en la Figura 4. Cabe destacar que además del espectro de absorción experimental (línea punteada naranja), se representa con una línea continua vertical su máximo de absorción, para facilitar su comparación con el cálculo en estático.

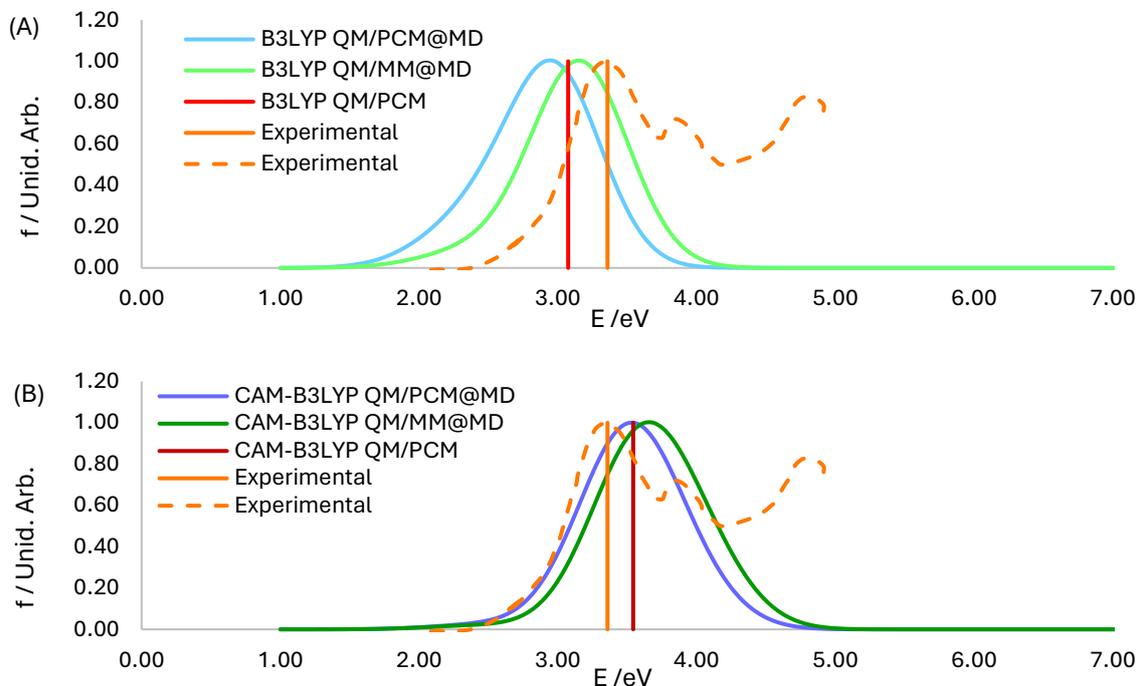


Figura 4. Espectros de absorción estático y dinámicos calculados para la especie desprotonada de la azoquinolona a (A) B3LYP/ aug-cc-pVDZ y (B) CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ en comparación con el espectro de absorción experimental

En las Tabla 2 y Tabla 3 se recogen los valores máximos de absorción de los espectros teóricos de la Figura 4 y sus errores con respecto a los resultados experimentales. En ella se observa cómo las energías relativas obtenidas con el funcional B3LYP (18) tienen un valor negativo para los tres métodos (QM/PCM@MD, QM/MM@MD, y QM/PCM), lo que quiere decir que los máximos de absorción calculados teóricamente con este funcional son menores al valor experimental, es decir, que experimentan *red-shift*. Sin embargo, las energías relativas obtenidas con el funcional CAM-B3LYP (26) tienen valores positivos para dichos métodos, lo que significa que los máximos de absorción calculados son mayores al valor experimental, es decir, que experimentan *blue-shift*.

Por otro lado, atendiendo a las energías relativas en valor absoluto, se aprecia cómo, aunque con el modelo de disolvente de agua explícita, el resultado que más se acerca al experimental es el calculado a B3LYP (18) ($0.24 \text{ eV} < 0.33 \text{ eV}$), los resultados calculados a CAM-B3LYP (26) se aproximan más al valor experimental en los espectros dinámico ($0.19 \text{ eV} < 0.45 \text{ eV}$) y

estático ($0.19 \text{ eV} < 0.28 \text{ eV}$) con agua implícita como disolvente (QM/PCM@MD y QM/PCM).

Por tanto, que se elige el funcional CAM-B3LYP (26) para la realización del resto del trabajo.

Tabla 2. Energías del máximo de los espectros de absorción experimental, QM/PCM@MD, QM/MM@MD y QM/PCM en la especie desprotonada de la azoquinolona a B3LYP/ aug-cc-pVDZ, relativos al valor experimental.

	B3LYP			
	Experimental	QM/PCM@MD	QM/MM@MD	QM/PCM
E (abs) / eV	3.36	2.91	3.12	3.08
E (rel) / eV	0.00	-0.45	-0.24	-0.28

Tabla 3. Energías del máximo de los espectros de absorción experimental, QM/PCM@MD, QM/MM@MD y QM/PCM en la especie desprotonada de la azoquinolona a CAM-B3LYP/ aug-cc-pVDZ, relativos al valor experimental

	CAM-B3LYP			
	Experimental	QM/PCM@MD	QM/MM@MD	QM/PCM
E (abs) / eV	3.36	3.55	3.69	3.54
E (rel) / eV	0.00	0.19	0.33	0.19

6.3. Caracterización de los estados excitados

A continuación, se caracterizan los diez primeros estados excitados de la especie desprotonada de la azoquinolona en agua implícita. Para ello, se toman los orbitales involucrados en la transición más importante en cada uno de los estados y se analiza su carácter. Los orbitales n son orbitales con la densidad electrónica a lo largo del enlace azo, con dos lóbulos perpendiculares al enlace, contenidos en el plano principal de la molécula. Por otro lado, los orbitales π son orbitales formados por la superposición lateral de dos orbitales atómicos p , que se encuentran perpendiculares al eje internuclear $N=N$. Y, por último, los orbitales π^* son orbitales moleculares antienlazantes que se forman por la superposición fuera de fase de dos orbitales atómicos p . Al igual que los orbitales π , estos se encuentran perpendiculares al eje internuclear $N=N$ y al plano de la molécula, pero tienen mayor energía que los orbitales π y están desocupados en el estado fundamental. La explicación de la posición de los orbitales en la molécula se hace en referencia a los átomos de nitrógeno del grupo azo, como ejemplo, ya que en el resto de enlaces ocurre de la misma forma. En la Figura 5 (A), se ve el esquema de los orbitales involucrados en las transiciones de los primeros diez estados excitados sobre un eje cualitativo de energía. Así mismo, en la Tabla 4 se presentan todos los resultados obtenidos para las diez primeras excitaciones de la molécula que se han calculado con el funcional CAM-B3LYP (26). Se observa una clara diferencia en el valor de la fuerza osciladora del estado electrónico S_2 frente al resto, ya que esta toma un valor de f

cercano a 1 (1.21 eV), por lo que se considera el estado brillante de menor energía de la molécula, mientras que el resto de los estados toman valores de f prácticamente iguales a 0, por lo que se denominan estados oscuros.

Tabla 4. Estados excitados QM/PCM en la azoquinolona desprotonada a CAM-B3LYP / aug-cc-pVDZ

Estado	E / eV	f / Unid. Arb.	Orbitales
S ₁	2.81	0.00	$n_3\pi_1^*$
S₂	3.54	1.21	$\pi_2\pi_1^*$
S ₃	3.71	0.08	$\pi_1\pi_1^*$
S ₄	4.06	0.00	$n_1\pi_1^*$
S ₅	4.33	0.22	$\pi_1\pi_2^*$
S ₆	4.51	0.06	$\pi_3\pi_1^*$
S ₇	4.76	0.16	$n_2\pi_1^*$
S ₈	4.87	0.00	$n_1\pi_1^*$
S ₉	4.99	0.07	$\pi_4\pi_1^*$
S ₁₀	5.10	0.22	$\pi_2\pi_2^*$

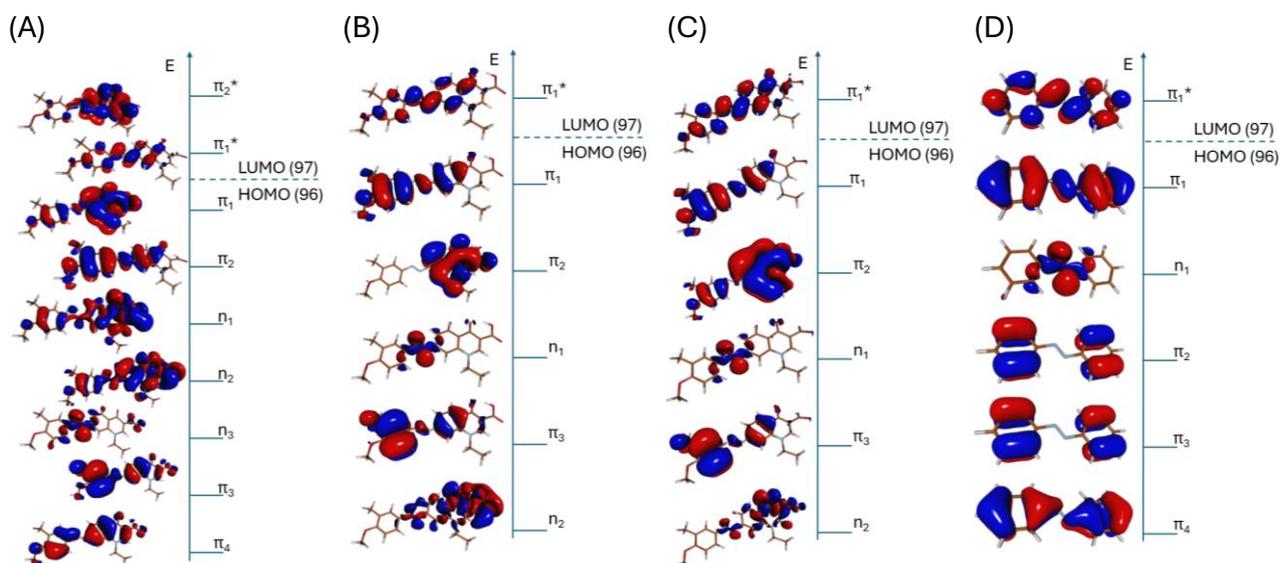


Figura 5. (A) Orbitales involucrados en los estados excitados de la azoquinolona desprotonada en agua (QM/PCM) a CAM-B3LYP / aug-cc-pVDZ. (B) Orbitales involucrados en los estados excitados de la azoquinolona protonada en vacío (QM/vacío) a CAM-B3LYP / aug-cc-pVDZ. (C) Orbitales involucrados en los estados excitados de la azoquinolona protonada en agua (QM/PCM) a CAM-B3LYP / aug-cc-pVDZ. (D) Orbitales involucrados en los estados excitados del azobenceno en vacío (QM/vacío) a CAM-B3LYP / aug-cc-pVDZ

Así, como se esperaba por analogía con la fotofísica del azobenceno (4), el estado brillante de la molécula es el S₂, con una transición $\pi\pi^*$, mientras que el S₁, se trata de una transición $n\pi^*$, como puede verse en la Figura 5 (A). No existe prácticamente mezcla de orbitales, por lo que su caracterización es sencilla. Cabe mencionar que, cuando el solapamiento entre orbitales es elevado, como es el caso del $\pi\pi^*$, el momento dipolar de transición también lo es, lo que

resulta en una la fuerza del oscilador elevada; y esto es lo que ocurre en el estado S_2 . Por el contrario, el solapamiento $n\pi^*$ es bajo, lo que conlleva a una fuerza del oscilador baja y, por ello, el estado S_1 es oscuro.

6.4. Efecto del disolvente

A continuación, se ha estudiado el efecto del disolvente mediante la comparación de los espectros de absorción estáticos de la molécula protonada (neutra) en vacío, y en agua con el modelo PCM de disolvente.

Como se puede ver en la Figura 5 (B) y (C), y en la columna de “Orbitales” de la Tabla 5, el carácter de los orbitales involucrados en la excitación de cada estado no varía al ir de vacío a disolución acuosa. Además, también puede verse en la Tabla 5, que los valores de las fuerzas osciladoras en todos los estados son prácticamente iguales. En cuanto a las energías de los estados, se observa una tendencia con energías ligeramente mayores en los estados de la molécula en el vacío, a partir del estado S_2 ($3.65 \text{ eV} > 3.51 \text{ eV}$), es decir, el agua induce un *red-shift* de estos estados. Esto se debe a que el momento dipolar de los estados excitados es mayor que el del fundamental. Por tanto, al ir al agua, se ven más estabilizados por el dipolo del disolvente que el estado fundamental, lo que hace que las energías de estos estados sean más bajas en agua.

Tabla 5. Energías de los estados excitados QM/Vacío y QM/PCM en la azoquinolona neutra a CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ

Estado	Medio	E / eV	f / Unid. Arb.	Orbitales
S_1	Vacío	2.76	0.00	$n_1\pi_1^*$
	PCM	2.78	0.00	$n_1\pi_1^*$
S_2	Vacío	3.65	1.06	$\pi_1\pi_1^*$
	PCM	3.51	1.18	$\pi_1\pi_1^*$
S_3	Vacío	4.01	0.07	$\pi_2\pi_1^*$
	PCM	3.96	0.09	$\pi_2\pi_1^*$
S_4	Vacío	4.42	0.00	$n_2\pi_1^*$
	PCM	4.20	0.00	$n_2\pi_1^*$
S_5	Vacío	4.49	0.03	$\pi_3\pi_1^*$
	PCM	4.44	0.03	$\pi_3\pi_1^*$

En conclusión, el efecto del disolvente, solvatocromismo, se caracteriza por la mayor estabilización de los estados excitados al pasar de vacío a agua, de acuerdo con el momento

dipolar del disolvente. Esto se traduce en una disminución de la energía del estado brillante S_2 , lo cual es positivo desde el punto de vista farmacológico, porque la energía necesaria para la dicha excitación se aleja de la región UV; y en un ligero aumento de la del estado S_1 , lo que hace que el *gap* energético S_1/S_2 disminuya, aumentando así el rendimiento cuántico de fotoisomerización *trans*→*cis*, al evitar caminos no reactivos.

6.5. Efecto de la desprotonación

En este apartado se estudian los espectros de absorción de la azoquinolona protonada (neutra) y desprotonada (anión) en agua. Con esta comparación se ve que la desprotonación en la azoquinolona tampoco provoca grandes cambios en los orbitales involucrados en las primeras excitaciones de la molécula, como se ve en la Figura 5 (A) y (C). De hecho, el carácter de casi todos los estados excitados coincide en ambas especies, aunque la numeración relativa de los orbitales cambie, como se puede ver en la Tabla 6 y en la Figura 5 (A) y (C).

Tabla 6. Estados excitados QM/PCM en la azoquinolona neutra (Q) y a la especie desprotonada de esta (Q⁻) a CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ

Estado	Especie	E / eV	f / Unid. Arb.	Orbitales
S ₁	Q	2.78	0.00	$\pi_1\pi_1^*$
	Q ⁻	2.81	0.00	$\pi_3\pi_1^*$
S ₂	Q	3.51	1.18	$\pi_1\pi_1^*$
	Q ⁻	3.54	1.21	$\pi_2\pi_1^*$
S ₃	Q	3.96	0.09	$\pi_2\pi_1^*$
	Q ⁻	3.71	0.08	$\pi_1\pi_1^*$
S ₄	Q	4.20	0.00	$\pi_2\pi_1^*$
	Q ⁻	4.06	0.00	$\pi_1\pi_1^*$
S ₅	Q	4.44	0.03	$\pi_3\pi_1^*$
	Q ⁻	4.33	0.22	$\pi_1\pi_2^*$

En cuanto a la fuerza del oscilador, se observa en la Tabla 6 que el estado brillante de menor energía coincide de nuevo con el estado S_2 , con valores para ambas especies muy similares a 1 (1.18 y 1.21). Atendiendo a la energía de cada estado en sus dos formas comparadas, se aprecia cómo para los estados S_1 y S_2 hay una diferencia de tan solo 0.03 eV entre ambas especies, siendo ligeramente mayor la aniónica. Por ello, el *gap* S_1/S_2 se mantiene al desprotonar la azoquinolona, con lo que se esperan rendimientos cuánticos similares para ambas especies.

De los resultados recogidos en la Tabla 6 se puede concluir que la desprotonación no supone variaciones determinantes en el espectro de absorción de la azoquinolona, por lo que su efecto es menos notable que el producido por el disolvente, visto en el apartado 0.

6.6. Efecto de la derivación del azobenceno

El último efecto sobre el espectro de absorción de la azoquinolona que se estudia es el de la derivación. Para ello, se toma el espectro medido en el vacío del azobenceno, y el correspondiente de la azoquinolona. Al analizar la última columna de la Tabla 7, se aprecia cómo el carácter de los orbitales involucrados en cada excitación no varía sustancialmente del azobenceno a la azoquinolona, como se muestra en la Figura 5 (B) y (D). Analizando cualitativamente los valores recogidos en la Tabla 7 que toman las fuerzas osciladoras en ambas especies, se saca la misma conclusión para ambas, que es que el estado brillante (con el valor de f más alto) de menor energía es el S_2 .

Tabla 7. Energías de los estados excitados QM/PCM en la azoquinolona neutra (Q) y en el azobenceno (AB) a CAM-B3LYP/aug-cc-pVDZ

Estado	Especie	E / eV	f / Unid. Arb.	Orbitales
S ₁	Q	2.76	0.00	$\pi_1\pi_1^*$
	AB	2.75	0.00	$\pi_1\pi_1^*$
S ₂	Q	3.65	1.06	$\pi_1\pi_1^*$
	AB	4.07	0.79	$\pi_1\pi_1^*$
S ₃	Q	4.01	0.07	$\pi_2\pi_1^*$
	AB	4.69	0.03	$\pi_2\pi_1^*$
S ₄	Q	4.42	0.00	$\pi_2\pi_1^*$
	AB	4.70	0.00	$\pi_3\pi_1^*$
S ₅	Q	4.49	0.03	$\pi_3\pi_1^*$
	AB	5.37	0.00	$\pi_4\pi_1^*$

Por otro lado, analizando las energías de los estados excitados, se observa que el estado S_2 disminuye su energía al pasar del azobenceno (4.07 eV) a la azoquinolona (3.65 eV), es decir, que experimenta un *red-shift*, lo cual es beneficioso por alejarse de la región UV en las energías de excitación. Además, el S_1 aumenta ligeramente su energía del azobenceno (2.75 eV) a la azoquinolona (2.76 eV), con lo que contribuye a la disminución del *gap* S_1/S_2 , aumentando seguramente el rendimiento de la isomerización, al no haber tanto exceso de energía que permita poblar otros caminos de reacción.

6.7. Mecanismo de fotoisomerización del azobenceno y la azoquinolona

En la Figura 6 (A) se muestra el camino de fotoisomerización *trans*→*cis* del azobenceno en el vacío, tras la excitación al estado excitado brillante, $\pi\pi^*$, a CAM-B3LYP (26)/cc-pVDZ (20). Análogamente, en la Figura 6 (B), se muestra el camino de fotoisomerización *trans*→*cis* de la azoquinolona en el vacío, al mismo nivel de teoría.

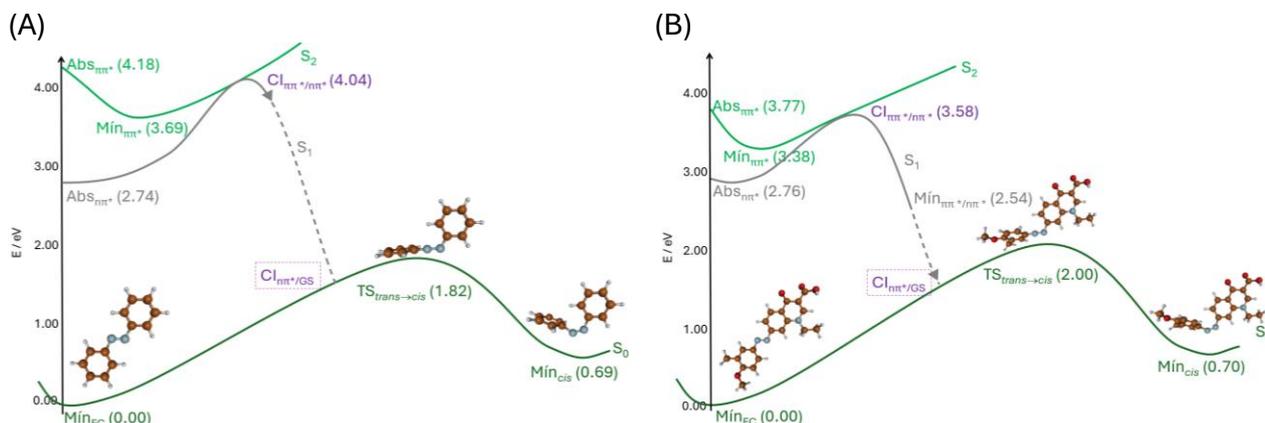


Figura 6. (A) Superficie de energía potencial de la fotoisomerización *trans-cis* del azobenceno en vacío a CAM-B3LYP/cc-pVDZ. (B) Superficie de energía potencial de la fotoisomerización *trans-cis* de la azoquinolona en vacío a CAM-B3LYP/cc-pVDZ

Tras la excitación del estado excitado $\pi\pi^*$ cabía esperar dos caminos posibles de relajación de este estado: a un mínimo de energía o, directamente, al punto de cruce con el estado $\pi\pi^*$. En el caso de ambas moléculas se da la primera situación, en la que la molécula se relaja desde su excitación con la geometría de la región FC a un mínimo local de energía del $\pi\pi^*$, para luego subir a la intersección con el $\pi\pi^*$.

Sin embargo, aunque ambas moléculas siguen un perfil de energía potencial análogo, se puede observar cómo la diferencia entre las energías de los estados S_2 y S_1 en la región FC, 1.44 eV en el caso del azobenceno, y 1.01 eV en el de la azoquinolona, disminuye tras la derivación del azobenceno, como se vio en el apartado 6.6, en el que se discutía el efecto de la derivación. En este caso, el cambio más significativo se ve en la energía del $\pi\pi^*$, que disminuye de 4.18 eV, en el azobenceno, a 3.77 eV, en la azoquinolona; y la energía del estado $\pi\pi^*$ en la geometría de la región FC, tras la absorción, aumenta ligeramente del azobenceno (2.74 eV) a la azoquinolona (2.76 eV), lo cual contribuye a la disminución de este *gap*. Por otro lado, también se observan cambios en la diferencia de energía entre el mínimo del $\pi\pi^*$ y la intersección de los estados $\pi\pi^*$ y $\pi\pi^*$, de 0.35 eV, en el azobenceno, a 0.20 eV, en la azoquinolona; por lo que la fotoisomerización es menos costosa en el caso de la azoquinolona.

Tras llegar al punto de intersección entre los estados $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$, se espera que la energía del estado $n\pi^*$ decrezca hasta un punto de degeneración con el GS, antes de llegar al TS. Sin embargo, con los cálculos realizados durante este trabajo no se ha conseguido un valor que cumpla con dicha premisa, por lo que en la Figura 6 (A) y (B) se representa el camino que debe de seguir el estado $n\pi^*$ con una línea punteada, a partir de la intersección $\pi\pi^*/n\pi^*$, por no saberse con certeza cuál es el punto en el que corta con el GS. No obstante, de acuerdo con la bibliografía, se sabe que los derivados del azobenceno en este punto adoptan geometrías cercanas a las del estado de transición (4).

En conclusión, como se ha visto que la derivación del azobenceno a la azoquinolona reduce la energía de excitación del S_2 y el *gap* entre el mínimo del $\pi\pi^*$ y la intersección $\pi\pi^*/n\pi^*$, se espera que su rendimiento cuántico sea mayor que para el azobenceno.

7. Conclusiones

En este trabajo se ha estudiado un compuesto derivado del azobenceno con propiedades fotofísicas potencialmente idóneas para su aplicación como antibiótico activado por luz.

Así, se han realizado simulaciones de dinámica clásica, cálculos estáticos cuánticos y cálculos estáticos con métodos híbridos QM/Clásicos, para hallar los espectros de absorción de las diferentes especies, en varios medios, y analizar cómo la variación de las condiciones del sistema influye en los resultados, alterando el rendimiento cuántico de la fotoisomerización. Con el análisis de los resultados obtenidos se ha llegado a las siguientes conclusiones: (i) En cuanto al funcional elegido para el cálculo de los espectros de absorción, DFT, CAM-B3LYP (26), M06-2X (28) y ω B97XD (29) dan resultados muy similares, mientras que B3LYP (18) se aleja mucho de los resultados experimentales, por lo que CAM-B3LYP (26) es el elegido como óptimo para estos cálculos. (ii) Al pasar de vacío a agua, es decir, al aumentar la polaridad del medio, se estabiliza el estado S_2 , reduciéndose su energía, ya que el estado excitado tiene un mayor dipolo que el estado fundamental, por lo que el *gap* S_2/S_1 es menor también. (iii) La desprotonación de la azoquinolona no altera la energía de los estados excitados, es decir, la desprotonación de la molécula no tiene efectos significativos sobre el espectro de absorción de la molécula. (iv) La azoquinolona presenta un estado S_2 con menor energía que el del azobenceno, por lo que la longitud de onda necesaria para activar a la azoquinolona es mayor que la necesaria para activar al azobenceno. Esto supone un *red-shift*

y, por lo tanto, una luz más alejada de la región UV, lo cual es ventajoso desde el punto de vista clínico. Además, la azoquinolona muestra un estado S_1 de mayor energía que el del azobenceno, lo que lleva a la reducción del *gap* energético S_2/S_1 , aumentando así el rendimiento cuántico de la fotoisomerización, al reducir el número de caminos de desactivación accesibles. (v) En cuanto a las PES de ambas especies estudiadas en el vacío, se determina que son análogas, siguiendo ambas la misma sucesión de pasos, aunque se ve el efecto de la derivación, con la reducción del *gap* S_2/S_1 en la región FC y entre el mínimo $\pi\pi^*$ y el cruce $\pi\pi^*/n\pi^*$, por lo que se espera un mayor rendimiento cuántico en la fotoisomerización de la azoquinolona.

Con lo estudiado, se podría predecir que la azoquinolona es más conveniente que el azobenceno como fotofármaco, aunque los cálculos realizados no son suficientemente determinantes. Por último, como se mencionaba en la introducción, este estudio forma parte de un proyecto más grande, en el que se modelizará la fotoisomerización de este potencial antibiótico en el medio biológico, con el objetivo de estudiar su efecto en la excitación y en el desarrollo de la reacción.

8. Bibliografía

- (1) Hutchings, M. I. *et al.* (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80.
- (2) Velema, W. A. *et al.* (2013). Optical control of antibacterial activity. *Nature chemistry*, 5(11), 924-928.
- (3) REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: *Diccionario de la lengua española*, 23.^a ed., [versión 23.7 en línea]. <<https://dle.rae.es>> [31/03/2024].
- (4) Beharry, A. A. *et al.* (2011). Azobenzene photoswitches for biomolecules. *Chemical Society Reviews*, 40(8), 4422-4437.
- (5) Vetráková, L. U. *et al.* (2017). The absorption spectrum of cis-azobenzene. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 16, 1749-1756.
- (6) Bandara, H. D. *et al.* (2012). Photoisomerization in different classes of azobenzene. *Chemical Society Reviews*, 41(5), 1809-1825.
- (7) Alos, J. I. (2009). Quinolonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(5), 290-297.
- (8) Frisch, M. J. *et al.* (2016). *Gaussian 16*, Revision C.01. Inc., Wallingford CT.
- (9) Case, D. A. *et al.* (2020). *Amber 2020*. University of California, San Francisco.
- (10) Roy D. *et al.* (2019). *Gaussview Version 6*. Semichem Inc. Shawnee Mission KS.

- (11) Schaftenaar, G. et al. (2017). Molden 2.0: quantum chemistry meets proteins. *Journal of computer-aided molecular design*, 31, 789-800.
- (12) Humphrey, W. et al. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33-38.
- (13) Laurent, A. D. et al. (2013). TD-DFT benchmarks: a review. *International Journal of Quantum Chemistry*, 113(17), 2019-2039.
- (14) Rusca, J. B. et al. (2002). *Química cuántica. Fundamentos y aplicaciones computacionales*.
- (15) Koch, W. et al. (2015). *A chemist's guide to density functional theory*. John Wiley & Sons.
- (16) Hohenberg, P. et al. (1964). Inhomogeneous electron gas. *Physical review*, 136(3B), B864.
- (17) Jensen, F. (2017). *Introduction to computational chemistry*. John Wiley & Sons.
- (18) Becke, A. D. (1993). Density-functional thermochemistry. iii. the role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98, 5648.
- (19) Marques, M. A. et al. (Eds.). (2006). *Time-dependent density functional theory* (Vol. 706). Springer Science & Business Media.
- (20) Dunning Jr, T. H. (1989). Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of chemical physics*, 90(2), 1007-1023.
- (21) Yousaf, K. E. et al. (2009). Optimized complementary auxiliary basis sets for explicitly correlated methods: aug-cc-pVnZ orbital basis sets. *Chemical Physics Letters*, 476(4-6), 303-307.
- (22) Adcock, S. A. et al. (2006). Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*, 106(5), 1589-1615.
- (23) Senn, H. M. et al. (2009). QM/MM methods for biomolecular systems. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(7), 1198-1229.
- (24) Caricato, M. et al. (2006). Formation and relaxation of excited states in solution: A new time dependent polarizable continuum model based on time dependent density functional theory. *The Journal of chemical physics*, 124(12).
- (25) Ryckaert, J. P. et al. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of computational physics*, 23(3), 327-341.
- (26) Yanai, T. et al. (2004). A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chemical physics letters*, 393(1-3), 51-57.
- (27) Mai, S. et al. (2018). Nonadiabatic dynamics: The SHARC approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 8(6), e1370.
- (28) Zhao, Y. et al. (2008). The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical chemistry accounts*, 120, 215-241.
- (29) Chai, J. D. et al. (2008). Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10(44), 6615-6620.