

INSTITUT DE CIÈNCIA MOLECULAR

FOTOSENSIBILIZACIÓN Y FOTOTERAPIA CON
FUROCAMARINAS: UN ESTUDIO MECANO-CUÁNTICO

JUAN JOSÉ SERRANO PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Miguel Ángel Miranda Alonso
- Dr. Juan José Novoa Vide
- Dra. Christel M. Marian
- Dra. Amparo Pérez Ferriols
- Dr. Rosendo Pou Amérigo

Va ser dirigida per:

Dr. Luis Serrano Andrés

Dra. Manuela María Merchán Bonete

©Copyright: Servei de Publicacions
Juan José Serrano Pérez

Dipòsit legal: V-822-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7588-4

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
INSTITUTO DE CIENCIA MOLECULAR



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**Fotosensibilización y Fototerapia con Furocumarinas:
Un Estudio Mecano-Cuántico**

**Memoria de TESIS DOCTORAL presentada por
Juan José Serrano Pérez
Valencia 2009**

D. Luis Serrano Andrés y Dña. Manuela María Merchán Bonete, Profesor Titular y Catedrática, respectivamente, del Departamento de Química Física y del Instituto de Ciencia Molecular de la Universidad de Valencia, certifican que la memoria presentada por el licenciado Juan José Serrano Pérez con el título “**Fotosensibilización y Fototerapia con Furocumarinas: Un Estudio Mecano-Cuántico**” corresponde a su Tesis Doctoral y ha sido realizada bajo su dirección, autorizando mediante este escrito la presentación de la misma.

En Valencia, a...

Dr. Luis Serrano Andrés

Dra. Manuela M. Merchán Bonete

ÍNDICE

RESUMEN	7
REFLEXIONES	17
EXORDIO	25
A. DESCUBRIR LOS SECRETOS DE LA NATURALEZA	27
B. LA CIENCIA DE LA LUZ.....	30
C. ADN Y RADIACIÓN.....	41
1. INTRODUCCIÓN	45
1.1. DE PARACELSO A LA MEDICINA CIENTÍFICA	47
1.2. FOTOTERAPIA.....	52
1.3. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ELECTRÓNICA	65
1.3.1. <i>Química Cuántica</i>	65
1.3.2. <i>Métodos de cálculo</i>	77
1.3.3. <i>Conjuntos de base monoelectrónica</i>	89
1.4. ESPECTROSCOPIA MOLECULAR.....	94
1.4.1. <i>Consideraciones generales</i>	94
1.4.2. <i>Espectroscopia electrónica</i>	109
2. OBJETIVOS	117
3. METODOLOGÍA	121
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
4.1. ESTUDIO DE LA MOLÉCULA DE PSORALENO.....	133
4.1.1. <i>Fotofísica</i>	133
4.1.2. <i>Población del estado triplete</i>	144
4.1.3. <i>Interacción con el ADN</i>	151
4.2. ESTUDIO DE OTRAS FUROCUMARINAS	171
4.3. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA.....	188
4.4. ESTUDIO DE LOS DÍMEROS DE TIMINA.....	212
5. CONCLUSIONES	221
LISTA DE TABLAS	229
LISTA DE FIGURAS	231
SIGLAS MÁS FRECUENTES	237
BIBLIOGRAFÍA	239
ANEJO: ARTÍCULOS	259

Algún día, alguien pulsará un botón y enviará una señal a un satélite que, a su vez, iluminará cinco millones de pantallas desde Albania hasta Zanzíbar. Existe el hardware necesario, sólo hay que programarlo. Si exceptuamos un pequeño detalle. ¿Qué hay del software? ¿Qué pondremos en todas esas pantallas? ¿Quién lo escribirá? ¿Quién lo dirigirá? ¿Quién lo interpretará? Hay quien está intentando suplantar el factor humano, sustituir el cerebro y el corazón humanos por microchips. Gadgets mecánicos que pueden simular emociones, sueños, risas, lágrimas. Hasta ahora no lo han conseguido. Así que tranquilicémonos. No somos prescindibles. En realidad cuanto más crecen más imprescindibles nos hacemos. Puede que suyo sea el reino, pero nuestros son el poder y la gloria.

Billy Wilder

Hay libros tan íntimamente ligados a viejas imágenes, olores, sensaciones, que resulta imposible abrirlos de nuevo sin que, de golpe, reviva todo ese fragmento de pasado que acompañó su primera lectura. Si el solar de un hombre lo constituyen, sobre todo, la memoria y los recuerdos de infancia, ciertos libros, los que más huella dejaron o acompañaron momentos decisivos de sus años transcurridos, terminan adoptando ellos mismos, con el paso del tiempo, el carácter de bandera o de patria. Esto ocurre a menudo con ciertas páginas leídas en años fértiles, cuando la imaginación de un muchacho aún mantiene, por fortuna, difusas las fronteras entre realidad y ficción que después, tan cruelmente, delimitarán el mundo de los adultos razonables. Hermosos y nobles libros limpios de corazón, fieles no a lo que ven o hacen los hombres, sino a lo que los hombres sueñan.

Arturo Pérez-Reverte

RESUMEN

Throughout the XVI century physicians realised that Physics and Chemistry were very important in the art of healing. Modern Medicine relies on this knowledge in order to understand how changes are made in the body and how they would be caused or prevented. It was Paracelsus who first introduced chemical therapy in his book *Labyrinthus medicorum errantium* (1553). The impact of his ideas in those days is shown by the increasing number of followers of the new trend. Nowadays, Medicine is barely related to the classical discipline practised by Hippocrates or Galen.

As a starting hypothesis, it is stressed that a proper alteration of DNA would entail beneficial effects. This is the origin of the medical area which represents better the connection between Physics, Chemistry and Medicine: Phototherapy. It consists in the employment of electromagnetic radiation coupled with a drug (the photosensitizer). Among all the techniques, PUVA therapy, in which furocoumarins are used as photosensitizers, is one of the most promising strategies against a plethora of diseases. Understanding the photochemical mechanism of that type of photosensitization is crucial in order to put forward better drugs. Two possible mechanisms, which try to explain the phototherapeutic action, have been suggested: on the one hand, a furocoumarin in its lowest triplet excited state reacts with thymine in a [2+2]-photocycloaddition; on the other hand, the furocoumarin in its lowest triplet excited state transfers its energy to molecular oxygen, generating highly-reactive singlet oxygen.

Since macroscopic properties (in this case the photosensitizing ability) of a molecule are determined by its electronic structure, we have to resort to Quantum Mechanics, a theory whereby the state of a system is represented by a wave function, in order to study the photosensitizing effectiveness of furocoumarins. Quantum Mechanics and Relativity have been the most important scientific revolutions in History and two of the most amazing humankind's achievements. Furthermore, both theories are the source of the

overwhelming majority of the advances which we currently enjoy. The use of computers and high-level programs has allowed us to analyze chemical processes theoretically, looking for the whys and the wherefores. Basically, a theoretical model for any complex process is an approximate but well-defined mathematical procedure of simulation. When applied to Chemistry, the task is to use input information about the number and character of component particles (nuclei and electrons) to derive information and understand the resultant molecular behaviour.

The development of Quantum Mechanics was spreaded over by Erwin Schrödinger and Werner Heisenberg in the mid-1920s. The wave and particle aspects of matter are reconciled by the Schrödinger equation, $\hat{H}\Psi = E\Psi$. The Hamiltonian operator, \hat{H} , is the operator associated to the total energy of a physical system and is the sum of the kinetic energy and the potential energy operators associated with electrons and nuclei. This is an eigenvalue problem, in which wave functions Ψ are the eigenfunctions of \hat{H} and E stands for the corresponding eigenvalues (energies). The square of the modulus of the wave function is everywhere positive, and when normalized is interpreted as being the probability of finding the particle in a volume dV . The probability interpretation emphasizes one of the most important features of Quantum Mechanics: it is not always possible to predict with certainty the result of a measurement. Often a distribution of probabilities is the best that we can obtain. Another feature emerges when we solve the Schrödinger equation: physical quantities such as energy or momentum are restricted to certain discrete values instead of having a large continuous range, as we assume in Classical Mechanics.

The molecular orbital is the most fundamental quantity in contemporary Quantum Chemistry and most computational methods used today start by a calculation of the molecular orbitals of the system. It is in the simplest model occupied by zero, one or two electrons. In the case of two electrons occupying

the same orbital, the Pauli principle demands that they have opposite spin. Such an approach leads to a total wave function for the system, which is an antisymmetrized product of molecular spin orbitals, that is, the product of a spatial molecular orbital times a spin function.

The main challenge in Quantum Chemistry is that we cannot solve exactly the Schrödinger equation, except for one-electron systems, owing to the electron repulsion term present in the Hamiltonian. Quantum-chemical methods look for approximate solutions of the equation, employing computational numerical methods based on the variational principle or/and on perturbation theory.

If the $2n$ electrons in a closed-shell molecule are assigned to a set of n orthonormal molecular orbitals, $\psi_i \mid i=1, \dots, n$, the corresponding many-electron wave function of the system, Ψ , can be written as a Slater determinant: $\Psi = (n!)^{1/2} \det [(\psi_1\alpha)(\psi_1\beta)(\psi_2\alpha)]$. According to the variational principle, the molecular orbitals are varied to minimize the energy, calculated as the expectation value of the full Hamiltonian, $E = \langle \Psi \mid \hat{H} \mid \Psi \rangle$. This procedure leads to a set of coupled differential equations: the Hartree-Fock theory. In addition, it was in 1951 that Roothaan published his equations, considering that molecular orbitals were restricted to be linear combinations of a set of three-dimensional one-electron functions, $\phi_\mu \mid \mu=1, \dots, N$, with $N > n$. Thus ψ_i is a linear combination of these functions, ϕ_μ (basis set). Variation of the total energy was then carried out respect to the coefficients, $C_{\mu i}$, of such a linear combination. This leads to a set of algebraic equations which can be written in matrix form, $\underline{F} \underline{C} = \underline{S} \underline{C} \underline{E}$, where \underline{F} is the matrix representation of the Fock operator, \underline{C} is the matrix of coefficients, \underline{S} is the overlap matrix, and \underline{E} is the diagonal energy matrix. The Hartree-Fock SCF method assumes that various electrons move independently affecting each other only through the requirement of antisymmetry of the wave function. On the other hand, two electrons, repelling

each other by Coulomb repulsion, will be less likely to be found at the same point of space than at points separated from each other. In other words, an effect of the correlation of the motion of electrons should properly be included in the calculation. As a matter of fact, we have to go beyond the Hartree-Fock approximation to include such correlation effects. Whereas at the simplest (and less accurate) level, the wave function is represented by one or two Slater determinants, at the most complex level we represent the true wave function by a variationally determined superposition of all determinants in the N -particle Fock space:

$$|\Phi\rangle = C_0|\Psi_0\rangle + \sum_{ra} C_a^r |\Psi_a^r\rangle + \sum_{a<b;r<s} C_{ab}^{rs} |\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \dots$$

including one, doubly, triply, and higher excited determinants, replacing occupied orbitals by virtual ones.

We have a plethora of methods to deal with quantum-chemical problems in spite of being incapable of solving the Schrödinger equation exactly (for systems with more than one electron). A point worth bearing in mind is that none of these models is applicable under all circumstances. Actually, we should get the best method for our interests, depending on the size of the system and the properties we are analyzing, in order to find the right answer for the right reason.

In our case, the CASPT2//CASSCF methodology has been generally employed. At the CASSCF level we optimize both the many-electron-function coefficients of the aforesaid expansion and the coefficients included in the expansion of each molecular orbital. Essentially, we construct, for a given state, a multiconfigurational wave function which includes all configurations generated by a set of active orbitals and active electrons that fulfil spin and spatial symmetry requirements. This provides us the non-dynamic correlation due to states which are very close in energy. On the other hand, the CASPT2

method includes the remaining dynamic correlation due to short-range electronic interactions. This method can be seen as a conventional non-degenerate perturbation theory, that is, a single reference state considered, with the particularity that this zeroth-order wavefunction is multiconfigurational (CASSCF).

Quantum Mechanics provides the machinery to describe the states of the molecules, and the study of the transitions from one state to another falls in the realm of Spectroscopy. It is different to study a system in its ground state (the most favourable energetic situation) or in an excited state. Molecules, consisting of electrically charged nuclei and electrons, may interact with the oscillating electric and magnetic fields of light. Spectroscopic experiments demonstrate that energy can be absorbed or emitted by molecules (and atoms) in discrete amounts, corresponding to precise changes in energy of the molecule (or atom) concerned. As matter, light is a form of energy that exhibits both wave-like and particle-like properties. Absorption of the relevant frequencies from incident radiation raises molecules from lower to higher levels. Electrons in molecules occupy molecular orbitals with precise energy levels. Transitions from lower, filled orbitals to upper (higher energy) empty orbitals usually involve absorption of radiation in the UV and visible parts of the spectrum. Much smaller quantities of energy are linked to changes in the vibrational and rotational energy of the molecule.

A molecule in the excited state is often prone to react in an easier way than in the ground state. The excess energy of an excited species can alter its reactivity, and is particularly significant in the case of electronic excitation because of the energies involved. First, the energies are of the same order of magnitude as bond energies, so that electronic excitation can have a considerable effect on the bonds in a species. Secondly, the energies correspond roughly with typical activation energies for several reactions, and the excitation energy can help a species to surmount an activation barrier. Otherwise, the molecule in its

ground state is incapable of overcoming such a barrier. Likewise, the new electronic rearrangement may be the key of the reactivity since the molecule in an excited state may exhibit more nucleophilic or electrophilic properties than in its ground state.

The concept of potential energy surface (PES) comes from the Born-Oppenheimer approximation, based on the separation of electronic and nuclear motion owing to the large difference in mass between these particles, and assumes that the electrons follow the nuclei instantaneously during the motion of the latter. Therefore we can define an electronic Hamiltonian and a nuclear Hamiltonian. Solving the electronic Schrödinger equation provides us a description of the motion of electrons, whereas we consider the rotation, vibration, and translation of the molecule solving the nuclear counterpart. The solution of the electronic Schrödinger equation is the energy of a particular nuclear configuration. The value of this potential energy for every possible nuclear configuration is specifically the potential energy surface.

Modern theoretical photophysics and photochemistry are based on the study of the potential energy hypersurfaces of the electronic states given that they are the playground in which physical and chemical phenomena take place. Indeed, every photophysical and photochemical process is produced owing to the relations between the hypersurfaces of the electronic states which contribute to that process. For the specific case of close degeneracies between the surfaces, where ultrafast energy transfers take place, the Born-Oppenheimer approximation breaks down and we need special methods in order to localize, optimize and study the crossing structures. Since our aim is to explore the photochemical panorama of furocoumarins, a deep comprehension of the hypersurfaces of the low-lying electronic states is necessary to ascertain the pathway that follows the energy once absorbed by the chromophore. This knowledge is the key to understand the phototherapeutic mechanism of these drugs.

Quantum Mechanics provides the framework to understand natural phenomena, from Theoretical Physics (particles, strings) and Theoretical Chemistry (chemical reactions, intermolecular forces) to the most complex Theoretical Biology. Complexity increases as the simplicity of models decreases owing to the progressively larger number of variables that we should deal with and the difficulty in simulating the environment. The challenge lies in the ascertainment that life takes place into hierarchically-structured matter (macromolecules, cells, tissues, organs, and entities) and it requires the action of several physical properties of its constituent elements on the whole: the interactions among them and with the environment. Undoubtedly, the development and refinement of quantum-chemical methods (the software) and computers (the hardware) has made easier such a task, still unfinished and with fascinating challenges in the foreseeable future.

Y es que os juro que sois de lo que más quiero/sois el único equipaje que llevo en el corazón.

Carlos Goñi –Revólver–. Tu canción.

Aquél que dijo “más vale tener suerte que talento” conocía la esencia de la vida.

Match Point (2005). Escrita y dirigida por **Woody Allen**.

Anyone who is not shocked by quantum theory has not understood it.

Niels Bohr

REFLEXIONES

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral me he ido dando cuenta de que alguien se hace científico para entender *por qué* pasan las cosas, por qué las cosas son como son y no de otra manera.

De entre todas las áreas de la Química me fui decantando paulatinamente por la Química Física, ya que es la parte que intenta entender el porqué de las cosas como fin último. Asimismo, expresa que los mundos de la Física y la Química no están ni mucho menos claramente delimitados, como se pensaba en los siglos XVII y XVIII. En particular, quedé impactado por la Química Cuántica y sus aplicaciones, especialmente la Espectroscopia Molecular.

En la actualidad, los adelantos en Física Cuántica se plasman en importantes adelantos tecnológicos en Electrónica, Medicina, Óptica, Fotónica, Espectroscopia, etc... El avance científico, entendido como avance en la teoría, se halla inextricablemente unido al progreso tecnológico, entendido como desarrollo de aplicaciones prácticas. Si bien es cierto que la Mecánica Cuántica es muy abstracta y compleja, no viene mal recordar que, tecnológicamente, más del 25% del producto mundial bruto depende de nuestra comprensión de esta ciencia; donde haya un transistor, un láser, una resonancia magnética, ahí estará la presencia de la Mecánica Cuántica. Podemos decir que la Mecánica Cuántica y la Teoría de la Relatividad son nuestras mejores herramientas para entender los fenómenos de la Naturaleza. A pesar de este hecho irrefutable, la Física Cuántica es desconocida para el público en general. En un artículo escrito con motivo del centenario, en el año 2000, de la explicación de Max Planck de la distribución de la energía en la radiación del cuerpo negro, el acontecimiento que marcó el inicio de la Teoría Cuántica, Rolf Tarrach (ex presidente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) se preguntaba: *“En este mundo ahogado en la información, ¿cómo es [posible] que casi nadie sepa casi nada de la revolución científica del siglo XX más profunda y más determinante de nuestro mundo actual? Quizá sea un problema de formación, o acaso de dificultad, pero*

es una pena que la sociedad no disfrute más con algo tan relevante para nuestra actualidad tecnológica y, a la vez, tan irreal, tan sorprendente y provocador como el mundo de los fenómenos cuánticos”.

En esta línea, y siempre desde mi humilde punto de vista, la Química Teórica y la Química Experimental han de ir de la mano. Hay problemas que podemos resolver más fácilmente (y con mayor precisión) los químicos teóricos, y otros que pueden analizar con mayor sencillez y más garantías los experimentales. Pero, para entender los procesos químicos, hemos de analizarlos tanto desde el punto de vista teórico como experimental. Algo que se escucha a menudo es que “si experimentalmente me sale lo que quiero, y funciona, para qué quiero saber *por qué* funciona”. Esta visión es anacrónica, en el sentido de que podría atribuírsele a un “filósofo de la naturaleza” del siglo XVI. A la sazón no existía la “Química” como tal, pero sí se producían productos químicos: medicamentos, tintes, bronce, acero... Sin embargo, el marco teórico era prácticamente inexistente, lo cual impedía que se desarrollaran innovaciones en estos campos. Estos conocimientos eran transmitidos de generación en generación, eran recetas que pasaban de padres a hijos, y habían sido elaboradas por el método de ensayo y error. Sin embargo, merced al cambio en la concepción de los procesos químicos introducido en el siglo XVIII por Lavoisier y otros muchos, fue posible un avance espectacular en todos los ámbitos de la Química. Desde mediados del siglo XX, estamos viviendo una nueva revolución gracias al desarrollo de la Química Cuántica.

Personalmente, me gusta pensar que aporto un granito de arena minúsculo, pero uno al fin y al cabo, a la enorme montaña de conocimientos que ha ido levantando la Humanidad desde los albores de su raciocinio. Investigar supone un enorme placer ya que nos permite satisfacer nuestra infinita y natural curiosidad. Ya dijo en una ocasión el célebre matemático Henri Poincaré: *“Los científicos no estudian la naturaleza porque sea útil; la estudian porque les place, y les place porque es bella. Si la naturaleza no fuese bella, no valdría la*

pena conocerla, no valdría la pena vivir la vida". Investigar no es fácil. Requiere de una amplia formación, pero también de imaginación, de lógica y de paciencia. De una gran capacidad para conectar fenómenos que aparentemente no tienen nada que ver unos con otros. Creo que una de las mejores definiciones de qué es la investigación la formuló el médico húngaro Albert Szent-Györgi: *"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado"*. En definitiva, aunque investigando uno se mueve en ocasiones por arenas movedizas y terreno pantanoso, ya que muchas veces no se sabe a ciencia cierta si los esfuerzos van a cristalizar en algo productivo, esto es precisamente lo que hace tan seductora la vida del investigador: la incertidumbre.

He tenido la suerte durante estos años de trabajar codo con codo con personas de una elevada condición humana y científica. Por ello quería agradecer esta Tesis a mis directores, Luis Serrano y Manuela Merchán. Ellos han sido los artífices de lo que aquí se expone. Me han llevado de la mano superando todas las dificultades y explicándome con infinita paciencia todas las dudas que me han ido surgiendo por el camino. De Luis destacaría principalmente su imaginación y sus recursos para resolver los problemas. Es una fuente inagotable de ideas originales y brillantes, intentando hallar siempre una explicación para cada cosa y siendo muy pedagógico en sus explicaciones. De Manoli siempre he admirado su pasión y la ilusión desbordante con que afronta cada proyecto y cada reto, contagiándote con su entusiasmo y su forma de ver las cosas. Y, por supuesto, con su capacidad de razonamiento y su brillantez a la hora de abordar los problemas más intrincados. En suma, les agradezco a ambos su apoyo y sus enseñanzas, y también el haberme brindado la oportunidad de continuar mi formación académica en congresos y escuelas de verano. Asimismo, quiero hacer extensivo mi agradecimiento a los miembros de nuestro grupo de investigación, QCEXVAL, especialmente a Gloria, Dani e Israel, con quienes he compartido muchas cosas a lo largo de estos años.

En el ámbito personal dedico muy especialmente esta Tesis a mi familia: mis padres, mi hermana y mis abuelos. Ellos me han enseñado, me han ayudado y me han formado como persona. A ellos les debo todo lo que soy y sin su cariño, apoyo y comprensión nada hubiera sido posible para mí. Y, por supuesto, también quiero incluir a nuestra perrita Zara.

También dedico esta Tesis a mis amigos Juan y Lola, con los que no sólo he compartido incontables momentos inolvidables, amén de nuestra común pasión por el Cine, sino que también tuvieron la paciencia de ayudarme en la corrección de parte del primer manuscrito de esta Tesis. Y quiero hacer extensivo mi agradecimiento a los amigos, profesores y condiscípulos con quienes me he ido relacionando (y, especialmente, con los que he mantenido el contacto) en el colegio San Pedro Pascual de Valencia, durante la carrera en la Facultat de Química de la Universitat de València y, más recientemente, en el despacho en el día a día, en el curso de doctorado de Química Teórica y Computacional celebrado en Girona en 2004, en escuelas de verano (la ESQC en Italia en 2005 y la Sostrup en Dinamarca en 2006), en la estancia de tres meses en Düsseldorf y en diversos congresos. No es necesario especificar nombres, pues los interesados saben que esta dedicatoria va dirigida a ellos.

In addition, I'd like to thank Prof. Christel M. Marian for the opportunity to stay in the Institute of Theoretical and Computational Chemistry in the Heinrich-Heine Universität in Düsseldorf (Germany). I extend my gratitude to all her staff. I enjoyed a lot those three months there because of their charm and kindness. In addition, I want to thank Dr. Jörg Tatchen all his explanations.

Por último, sólo me queda por decir que estoy completamente seguro de que habrá más de un error en este escrito, fruto de su extensión y de las múltiples revisiones llevadas a cabo. A este respecto, leí en cierta ocasión un artículo de Arturo Pérez-Reverte en la revista *XL Semanal*, y por eso me he decidido a extractarlo: “*Como saben ustedes, gazapo, además de conejo, significa mentira*

*o embuste; y también error que, a menudo no por ignorancia sino por inadvertencia, deja escapar quien escribe o habla. Cualquiera que trabaje con palabras impresas sabe a qué me refiero (...). Por lo general, todo gazapo como Dios manda permanece al acecho en un texto, no importa cuánto se revise y corrija, y sólo salta el día que, impresa la obra, el autor abre una página al azar y allí está el gazapo gordo y lustroso, arteramente camuflado durante meses o años de trabajo.”. Supongo que, como dice Joe E. Brown en el delirante y famoso diálogo con Jack Lemmon que pone fin a una de las películas más emblemáticas de Billy Wilder, *Con faldas y a lo loco* (*Some Like It Hot*, 1959), resulta que *nadie es perfecto*.*

He pasado los mejores años de mi vida estudiando arduosamente la ciencia médica y la química. Esta última sobre todo siempre ha ejercido una atracción irresistible sobre mí por el poder enorme e ilimitado que confiere su conocimiento. Los químicos, y lo digo con énfasis, podrían mandar si quisieran sobre los destinos de la humanidad. Déjenme explicar esto antes de seguir adelante. Se dice que la mente gobierna al mundo. Pero ¿qué gobierna la mente? El cuerpo. Y el cuerpo (sígueme con atención) está a merced del más omnipotente de todos los potentados, que es el Químico. Dadme química a mí, a Fosco, y cuando Shakespeare acaba de concebir Hamlet y se sienta para ejecutar su concepción yo, echando en su comida diaria unos granitos de polvos, reduciré su inteligencia influyendo sobre su cuerpo, hasta que su pluma escribiese la más abyecta tontería que jamás haya degradado papel alguno. En circunstancias similares hagamos revivir al ilustre Newton. Les garantizo que cuando vea caer la manzana, la comerá en lugar de descubrir el principio de gravitación. La cena de Nerón le transformará en el hombre más manso antes de que pueda digerirla; y el desayuno de Alejandro Magno le hará poner pies en polvorosa al ver al enemigo esta misma tarde. Doy mi sagrada palabra de honor de que la sociedad es dichosa porque los químicos modernos, por una buena suerte incomprensible, son los seres más inofensivos del género humano. En su mayoría son venerables padres de familia aledados con la admiración por el sonido de sus voces pedagógicas; visionarios que desperdician su vida en fantásticas imposibilidades o charlatanes cuya ambición no vuela más alto que donde ponemos los pies. Así, la sociedad permanece a salvo, y el ilimitado poder de la Química sigue siendo esclavo de los fines más superficiales y más insignificantes.

Wilkie Collins. *La dama de blanco* (1861).

EXORDIO

A. Descubrir los secretos de la Naturaleza

Las preguntas ¿de qué estamos hechos? o ¿por qué sucede lo que sucede? fueron formuladas probablemente por el primer homínido en cuyos ojos brilló el genio del ser humano. A lo largo de los siglos, la Humanidad ha procurado no sólo explicar los hechos observados, sino establecer teorías y modelos para predecir los fenómenos [1,2,3]. La *Ciencia* [4] es el conjunto de conocimientos obtenidos mediante la observación, la experimentación y el razonamiento, sistemáticamente estructurados dentro de un contexto matemático y de los que se deducen principios y leyes generales. Podemos afirmar que todo lo que sucede en la Naturaleza se puede explicar mediante las leyes de la Física y la Química [5,6,7,8,9], siendo muy sutil la línea de separación entre las mismas. La herramienta empleada para tal fin explicativo es la Matemática [10,11,12,13,14,15].

El concepto central en todas las ramas de la Física es el de **energía**, esto es, la capacidad de un cuerpo de realizar un trabajo, siendo el trabajo y el calor los agentes de transferencia de la energía [16,17,18,19,20,21,22,23]. El primer principio de la Termodinámica postula que en todo proceso físico **la energía se conserva**: no puede ser creada ni destruida, sólo puede transformarse. Hay muchos tipos de energía, que en realidad se reducen a tres y a sus combinaciones: la energía cinética E_C , la energía potencial U y la energía asociada a la masa. La conservación de la energía es la clave para entender procesos en los cuales la energía cinética y la energía potencial se interconvierten entre sí para satisfacer este Principio, como en el caso del movimiento de un péndulo. La *energía cinética* de un cuerpo es la energía que posee dicho cuerpo en virtud de su movimiento. En cambio, la *energía potencial* de un cuerpo es la energía que el cuerpo posee en virtud de su posición en un campo de fuerzas (región del espacio en la cual existe una fuerza en cada uno de

sus puntos) y su forma explícita depende de la interacción experimentada por dicho cuerpo [24,25].

En 1687, en su obra *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*, Isaac Newton sentó las bases de la Mecánica [16,17,18]: el movimiento de una partícula de masa m es descrito por las ecuaciones de movimiento $\vec{F}(\vec{r}, \vec{v}, t) = m \cdot \vec{a}$, donde $\vec{F}(\vec{r}, \vec{v}, t)$ es la fuerza que actúa sobre la partícula y cuya forma explícita depende del sistema en estudio. Para un sistema de partículas, existe un conjunto de ecuaciones para cada una de ellas, donde la fuerza dependerá o no del resto. Las fuerzas pueden ser externas (ejercidas por las partículas que no pertenecen al sistema sobre las que sí pertenecen al mismo) e internas (aquéllas que se ejercen mutuamente las partículas del sistema). En un sistema conservativo la fuerza es independiente de la velocidad y del tiempo, y se obtiene a partir de un potencial $U(\vec{r})$ de tal forma que $\vec{F}(\vec{r}) = -\vec{\nabla}U(\vec{r})$, por lo que la variación en la energía potencial de un sistema es el trabajo cambiado de signo realizado por todas las fuerzas conservativas que actúan sobre el sistema. Así, el trabajo realizado por una fuerza conservativa interna es igual a la disminución de energía potencial; y es igual al incremento de energía cinética si no hay fuerzas externas realizando trabajo sobre el sistema y la fuerza conservativa interna es la única fuerza que realiza trabajo, conservándose la energía mecánica total del sistema ($E_C + U$). Sin embargo, si existen fuerzas no conservativas, la energía mecánica del sistema disminuye al disipar energía en forma de calor. De este modo, si el trabajo de las fuerzas externas es nulo, el trabajo total realizado entre dos puntos A y B por todas las fuerzas es igual a la suma del trabajo realizado por todas las fuerzas internas conservativas, W_{AB}^C , más el trabajo realizado por todas las fuerzas internas no conservativas, W_{AB}^{NC} :

$$W_{AB} = \int_A^B \vec{F} d\vec{r} = \int_A^B m \frac{d\vec{v}}{dt} d\vec{r} = \Delta E_C = W_{AB}^{ext} + W_{AB}^C + W_{AB}^{NC} = 0 - \Delta U + W_{AB}^{NC} .$$

El paso de la Física Clásica a la Física Moderna se fraguó con la aparición de dos teorías [26]. Así, la Teoría Especial de la Relatividad (1905) se refiere a la comparación entre las medidas realizadas en diferentes sistemas de referencia inerciales que se mueven con velocidad constante unos respecto a otros [16,27]. Las leyes físicas son idénticas en todos los sistemas de referencia inerciales y la velocidad de la luz en el vacío es siempre constante, con independencia del movimiento del foco luminoso o del observador. Por otro lado, en contraposición con la visión determinista clásica (el estado del sistema se define especificando las fuerzas que actúan y las posiciones y momentos de las partículas), la Física Cuántica se basa en una visión estadística de la Naturaleza [16,19,28,29,30,31,32,33,34]: las partículas se *encuentran* en un estado cuántico descrito por una función de onda, cuyo módulo al cuadrado estima la probabilidad de encontrar a la partícula en el tiempo t en una cierta región del espacio. Los posibles resultados de la medida de una magnitud física son los valores propios de un operador hermítico asociado a esa magnitud¹. La ecuación de Schrödinger es la ecuación fundamental de la Mecánica Cuántica [35,36,37,38]:

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

Ecuación 1

Las funciones de onda Ψ son las funciones propias y las energías E son los valores propios del operador correspondiente a la energía del sistema (Hamiltoniano).

¹ Si el estado del sistema es uno de los estados propios del operador, el resultado de la medida será el valor propio asociado. Si la función de onda que describe el estado no es función propia, no es posible predecir el resultado de un experimento concreto, pero sí la distribución de probabilidad de los resultados de la medida.

B. La Ciencia de la Luz

En la Antigüedad, la luz, la electricidad y el magnetismo eran considerados como tres fenómenos independientes [1,39,40]. Los filósofos griegos consideraban la luz como una emisión de los cuerpos luminosos, aunque había cierta confusión sobre si el rayo de luz partía del ojo (teoría geométrica o extramisionista) o del cuerpo iluminado (teoría fisiológica o intramisionista). Con Euclides y otros autores griegos se formaliza y aplica la geometría a las leyes de la Óptica, independientemente de sus ideas sobre la naturaleza de la luz.

Siguiendo esta línea, Pierre de Fermat presentó, en 1657, el principio que hoy lleva su nombre, como una generalización de una observación realizada por Herón de Alejandría hacia el año 125 antes de la Era Común: el camino óptico a lo largo de una trayectoria real de luz es estacionario, es decir, un máximo o un mínimo. En otras palabras, la trayectoria efectiva entre dos puntos es aquella que se recorre en un tiempo mínimo [19,39].

Con los autores modernos se divide la consideración de la naturaleza de la luz en dos corrientes: aquéllos, como Descartes, Huygens y Hooke, que la consideraban un fenómeno ondulatorio, y aquéllos, como Newton, Descartes y Boyle, que consideraban la luz como formada por partículas luminosas emitidas por los cuerpos. Estos últimos bebieron de las divulgaciones de Pierre Gassendi, que en el siglo XVII propuso un modelo atómico de la materia y de la luz, tras leer la obra *De Rerum Natura*, de Lucrecio [41].

La autoridad de Newton motivó la preponderancia de la teoría corpuscular sobre la ondulatoria en un principio. Sin embargo, los experimentos sobre la medida de la velocidad de la luz desnivelaron la balanza hacia la teoría ondulatoria.

Teoría ondulatoria	Teoría corpuscular
<p>ca. 1660: Francesco Grimaldi estudia con detalle la difracción de la luz.</p> <p>Robert Hooke postula que el fenómeno de la refracción se explica mejor con la teoría ondulatoria.</p> <p>Erasmus Bartholin estudia el fenómeno de la doble refracción en el espato de Islandia.</p>	<p>S. XIV: Nicolás de Autrecourt, que adoptó el modelo del atomismo epicúreo, creyó que la luz era un movimiento de partículas con velocidad finita [40].</p>
<p>1801: Thomas Young explica los conceptos de interferencia constructiva y destructiva [42] y enuncia la <i>Ley General de la Interferencia de la Luz</i>.</p>	<p>1660: Se publica póstumamente la obra de Pierre Gassendi, quien propuso una teoría corpuscular de la luz.</p>
<p>1808: Etienne Louis Malus descubre la polarización de la luz.</p>	<p>1672: Explicación de Newton de la dispersión de la luz.</p>
<p>1818: Augustine Fresnel, utilizando el principio de Huygens y las ideas de Young, propone una teoría cuantitativa de la difracción.</p>	<p>1728: James Bradley descubre el fenómeno de la aberración estelar.</p>

Foucault demostró a mediados del siglo XIX que la velocidad de la luz en el agua era menor que en el aire, en franca contradicción con respecto a la teoría corpuscular. Esto suponía la existencia de un sustrato material como un fluido muy sutil denominado éter luminoso que llenaba el espacio vacío. El éter ya había sido propuesto por Huygens y se remontaba a las ideas griegas y medievales sobre la naturaleza de los cuerpos celestes. Igual que el sonido se propaga por el aire, la luz se propagaba por el éter, cuyas vibraciones constituían la luz.

Pero para entender la naturaleza de la luz los físicos tuvieron que empezar a relacionar los fenómenos ópticos con otras áreas. Desde antiguo el hombre conocía procesos relacionados con la electricidad y el magnetismo, pero fue en 1819 cuando Hans Christian Oersted demostró experimentalmente las acciones mutuas entre corrientes eléctricas e imanes, observando que una aguja

magnética se desviaba de su posición inicial al situarse en la proximidad de un conductor por el que circulaba una corriente eléctrica. Experiencias posteriores, realizadas por Faraday, Ampère y Henry, dieron origen al **Electromagnetismo** [43].

Una figura clave fue Michael Faraday, quien llevó a cabo descubrimientos experimentales fundamentales e introdujo conceptos, como las nociones de “líneas de fuerza” y de “campo electromagnético”, que resultaron claves en el desarrollo de la teoría electromagnética. Especialmente relevante fue el desarrollo del concepto de *campo* (región del espacio que cumple que en todos y cada uno de sus puntos existe una determinada propiedad), tanto en Mecánica como en Electromagnetismo. En el caso de un campo de fuerzas, actúa como un agente intermedio entre dos cuerpos, de modo que dichos cuerpos pueden ejercer una fuerza mutua sin estar en contacto directo a través de los campos generados por cada uno de ellos.

En 1864, James Clerk Maxwell postuló, en su obra *A dynamical theory of the electric field*, que la mejor manera de concebir las fuerzas eléctrica y magnética era como las dos caras de una misma moneda. Sus investigaciones le llevaron a afirmar que la luz era una perturbación en forma de ondas propagadas a través del campo electromagnético, unificando la Óptica y el Electromagnetismo, lo que ya había sido intuido por Faraday. Maxwell predijo la existencia de ondas electromagnéticas con frecuencias por debajo y por encima de las correspondientes al espectro de luz visible. El éter luminoso se convertía en el éter electromagnético.

Las ecuaciones de Maxwell relacionan los vectores de campo eléctrico y magnético, \vec{E} y \vec{B} , con sus fuentes (las cargas eléctricas, las corrientes y los campos variables). Maxwell demostró que estas ecuaciones podían combinarse para originar una ecuación de onda que debían satisfacer los vectores campo eléctrico y magnético, que tiene la forma $(\partial^2 E / \partial t^2 = [1/(\epsilon_0 \cdot \mu_0)] \partial^2 E / \partial x^2)$, y

cuya solución es $E = E_0 \cdot \text{sen}(\omega t - kx)$; y lo mismo para el campo magnético. También mostró que la velocidad de las ondas electromagnéticas en el vacío debía ser $c = 1/\sqrt{\mu_0 \epsilon_0}$, que vale aproximadamente $3 \cdot 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, igual que la velocidad de la luz. Por tanto, la luz es la superposición de dos campos oscilantes, uno eléctrico y otro magnético, de idéntica frecuencia y que se encuentran en fase, perpendiculares entre sí y con respecto a la dirección de propagación de la radiación.

El primer paso hacia una teoría *moderna* de la luz se dio en las postrimerías del siglo XIX. En 1887, Albert Michelson y Edward Morley decidieron medir la velocidad de la Tierra respecto al éter mediante un ingenioso experimento (con ayuda del interferómetro inventado por el primero) en el cual la velocidad de la luz respecto a la Tierra se comparaba entre dos haces luminosos, uno en la dirección del movimiento de la Tierra relativo al Sol y otro perpendicular a la dirección del movimiento terrestre. Dado que se suponía que la Tierra se movía a través del éter en su órbita alrededor del Sol, la velocidad de la luz medida en la dirección del movimiento de la Tierra a través del éter (cuando nos estuviéramos moviendo hacia la fuente luminosa) debería ser mayor que la velocidad de la luz en la dirección perpendicular. Sin embargo, nunca se pudo detectar la menor diferencia: el movimiento absoluto de la Tierra respecto al éter no pudo ser detectado [17,44].

En 1905, Albert Einstein publicó un artículo revolucionario: *Zur Elektrodynamik bewegter Körper*, el artículo de la Relatividad Especial [45]. En este artículo postulaba que el movimiento absoluto no podría detectarse por ningún tipo de experimento. Es decir, **el éter no existía**². La idea del éter era innecesaria con tal de abandonar la idea de un tiempo absoluto.

² Sin embargo, tan arraigado concepto tardó en desaparecer de la cultura popular. Verbigracia: Sir Arthur Conan Doyle nos narra en su cuento *La zona envenenada (The Poison Belt)*, publicado unos años después del artículo de Einstein, cómo los protagonistas de *El mundo perdido* se enfrentan al fin del mundo cuando la Tierra entra en la “zona venenosa del éter”.

Pero aún hacía falta estudiar el problema desde otra perspectiva. Una de las primeras indicaciones de que la evolución de la Física no había ni mucho menos llegado a su apogeo [1,28,40] surgió del estudio de la radiación del cuerpo negro. De acuerdo con las leyes en las que se creía en aquel tiempo, un cuerpo negro debería irradiar una gran cantidad de energía en la región de alta frecuencia del espectro (*catástrofe ultravioleta*).



Figura 1. Placa en memoria de Planck en la Humboldt-Universität (Berlín).

Considerando el campo electromagnético como un conjunto de osciladores de todas las frecuencias posibles, los osciladores de longitud de onda corta serían fuertemente excitados incluso a temperatura ambiente, con lo que los objetos fríos tendrían que irradiar en la región ultravioleta-visible y resplandecer en la oscuridad. Para evitar este resultado absurdo, Max Planck sugirió en 1900 que la radiación no podía ser emitida en cantidades arbitrarias, sino sólo en ciertos paquetes de energía o *cuantos*. Percatándose de que la Mecánica Clásica era insatisfactoria para explicar el fenómeno, Planck pensó en mantener a toda costa las dos primeras leyes de la Termodinámica, estando

dispuesto a sacrificar cualquiera de sus convicciones anteriores sobre las leyes físicas. Así, llegó a su célebre fórmula para la energía de cada cuanto de radiación: $\Delta E = h \cdot \nu$.

Las dudas de Planck acerca de la discontinuidad cuántica fueron disipadas por Einstein. En 1905 publicó otro artículo titulado *Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt* [45]. Supuso que la energía de la luz está distribuida espacialmente de forma discontinua, formada por partículas independientes llamadas fotones, de energía $E = h \cdot \nu$. Para apoyar su tesis (ya que no ignoraba que otros fenómenos físicos sólo se podían explicar entendiendo la luz como una onda continua) explicó teóricamente el efecto fotoeléctrico.

Sin embargo, para entender por fin qué era la luz había que recurrir a la Mecánica. Fue Leonhard Euler quien reconoció que la 2ª Ley de Newton expresada en forma de ecuación diferencial, $F_{x,y,z} = m(d^2x, y, z/dt^2)$, es un principio fundamental [46]. Basándose en sus ideas, Joseph-Louis Lagrange formuló sus ecuaciones de movimiento a partir de las expresiones analíticas de la energía expresadas en función de un sistema de coordenadas arbitrario (coordenadas generalizadas). Se basaba en la función Lagrangiana (diferencia entre energía cinética y energía potencial de un sistema). Las ecuaciones de Lagrange se derivan del *Principio de Mínima Acción*, enunciado en 1744 por Pierre Louis Moreau de Maupertuis: entre todos los caminos posibles, con los mismos estados inicial y final fijos, el camino que sigue el sistema es aquél que hace la acción (integral a lo largo del camino de la función Lagrangiana) mínima (formalismo variacional). Este principio pone de manifiesto la íntima correspondencia entre el movimiento de un cuerpo material y el movimiento de un rayo de luz, conectando la Mecánica con la Óptica. En cierto sentido, tanto el rayo de luz como el cuerpo material siguen el camino más “fácil” disponible. En 1834 W. Hamilton demostró que las ecuaciones de movimiento pueden ser

expresadas en términos de la *función Hamiltoniana*, H , que representa la energía total del sistema [47,48], y que da lugar a sus ecuaciones de movimiento en función de momentos y coordenadas generalizados.

En 1924, Louis de Broglie presentó su tesis doctoral *Recherches sur la Théorie des quanta*, donde extendió la dualidad onda-partícula de la luz a la materia, asociando a cada partícula material una longitud de onda. De Broglie estudió las analogías existentes entre la Mecánica Clásica y la Óptica Geométrica, relacionando el Principio de Mínima Acción con el Principio de Fermat. Consideró que el problema de que la partícula “eligiese” el camino de acción mínima podía resolverse del mismo modo que con la luz, atribuyendo a la partícula una onda asociada [19,28,29,30]: las ondas asociadas con la partícula explorarían todos los caminos posibles entre dos puntos, y sólo los correspondientes a la línea recta sufrirían interferencia constructiva. De Broglie mostró que las ondas que siguen la misma trayectoria que las partículas a las cuales están asociadas cumplen la relación: $\lambda = h/p$. La ecuación de De Broglie es compatible con la naturaleza corpuscular de la luz (fotones) y también tiene en cuenta la cuantización del momento angular que aparece en el modelo de Bohr de un átomo monoeléctrico y, por ende, modifica el concepto arcaico de un electrón puramente corpuscular orbitando alrededor de un núcleo.

En definitiva, la antigua polémica sobre la naturaleza de la luz se zanjó considerando que presenta una naturaleza dual: actúa como una onda cuando se desplaza por el espacio y actúa como un haz de partículas cuando interacciona con la materia. Enlazando con estas ideas, Richard Feynman sugirió que las partículas se desplazan de un sitio a otro a lo largo de cada trayectoria posible en el espacio-tiempo. En lo que respecta al movimiento de los objetos macroscópicos, sólo subsiste uno de los infinitos caminos posibles y éste es precisamente el que emerge de las leyes clásicas de Newton del movimiento. Para un cuerpo grande las desviaciones de la línea recta son infinitesimales. Análogamente, cuando observamos la reflexión de un rayo de luz sobre un

espejo, decimos que la trayectoria del rayo es tal que el ángulo de entrada es igual al ángulo de salida, porque éste es el camino de tiempo mínimo. Sin embargo, existen infinitos caminos de reflexión que van de un foco luminoso a un detector, tras reflejarse. Lo que ocurre es que, si bien hay reflexión a lo largo de todo el espejo, sólo los caminos próximos al camino de tiempo mínimo son relevantes, porque el resto se cancelan por interferencia. Asimismo, la luz no se desplaza en línea recta únicamente, lo que ocurre es que viaja preferentemente por los caminos próximos a la línea recta porque son los de tiempo mínimo [49].

La primera formulación de la Mecánica Cuántica moderna [1] se debe a Werner Heisenberg, y constituyó la *Mecánica Cuántica Matricial* (1925). Heisenberg publicó sus investigaciones en un innovador artículo: *Über quantentheoretische Umdeutung kine-matischer und mechanischer Beziehungen*. Por otro lado, en 1926, Erwin Schrödinger propuso una formulación equivalente, la *Mecánica Cuántica Ondulatoria*, en una serie memorable de artículos publicados bajo el título de *Quantisierung als Eigenwertproblem*, concibiendo que el comportamiento de un sistema físico se puede describir por medio de una función de estado que es solución de una ecuación. Dicha ecuación describe el comportamiento de los sistemas cuánticos de funciones de onda estacionarias y momentos de partículas, conforme la hipótesis dual de De Broglie. La teoría de Schrödinger enlaza con los fundamentos matemáticos de la Mecánica Analítica desarrollados por Lagrange y Hamilton.

Así, el fallo de la teoría ondulatoria de la luz es que no tenía en consideración las propiedades de la materia. En realidad, los fotones no se reflejan en la superficie de un cristal, sino que interaccionan con los electrones de la estructura del mismo [49]. Los fotones van de un electrón a otro, y la reflexión y la transmisión son fruto de que un electrón interacciona con un fotón, y como consecuencia de ello se emite un nuevo fotón.

Por tanto, junto al estudio de la naturaleza de la luz, resulta inevitable estudiar la interacción de la luz con la materia. La **Espectroscopia** estudia la energía absorbida o emitida por un átomo o molécula cuando interacciona con el campo electromagnético de la radiación. La naturaleza y los fenómenos derivados de dicha interacción dependerán del tipo de radiación empleada, pero principalmente de la estructura atómica y molecular.

Podemos considerar que Newton es el fundador de la Espectroscopia. Su genial intuición fue considerar que la luz no es homogénea, como se admitía hasta entonces, sino compuesta de tantos “rayos” coloreados como ángulos de refracción diferentes hubiera. Así, hacia 1672 llevó a cabo su famoso experimento de dispersión en el cual hizo pasar la luz blanca a través de un prisma de vidrio, formando un cierto ángulo con su superficie, con lo que la luz se descomponía en colores, produciendo un espectro. Recíprocamente, comprobó que al componer esos colores se recuperaba la luz blanca. Newton se refirió a esta experiencia como su *experimentum crucis* [42] y achacó el fenómeno a la naturaleza corpuscular de la luz: los corpúsculos eran poseedores de unos estados periódicos que llamó *fits* [41], fruto de su interacción con el éter.

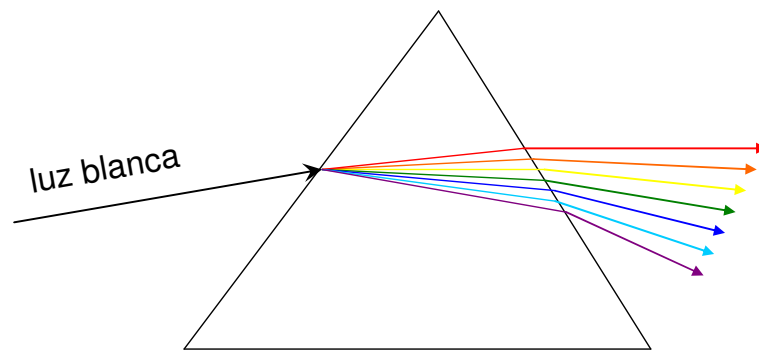


Figura 2. Dispersión de la luz por un prisma: la luz de longitud de onda más corta, al refractarse, se desvía más que la luz de longitud de onda más larga, ya que el índice de refracción depende de la longitud de onda. En su célebre experiencia, Newton empleó dos prismas observando el diferente ángulo de refracción según el color de la luz.

Newton concluyó que el grado en que eran refractados los rayos era una propiedad de los propios rayos y no de los prismas, los cuales no “teñían” los rayos de luz blanca para producir el espectro, sino que sólo los tamizaban de acuerdo con su refrangibilidad. A partir de Newton se abolió la diferencia entre color y luz, puesto que la luz contenía todos los colores, y la confusión entre color y claridad, que provocaba que los colores se clasificaran en función de un criterio acromático (la claridad), desde los tiempos de Aristóteles. Las experiencias de Newton motivaron que los colores fueran clasificados por su grado de refrangibilidad [50]. Además, sus trabajos permitieron explicar el fenómeno del arco iris, como fruto de la reflexión y la refracción de la luz al atravesar las gotas de agua [51].

En 1752, Thomas Melvill [1] hizo pasar por un prisma la luz emitida por una llama producida por sodio, y observó un espectro continuo surcado por una serie de líneas brillantes: fue la primera observación de un espectro de emisión. En 1802, Wollaston advirtió que en el espectro de la luz procedente del Sol aparecían unas pocas líneas oscuras. En 1814, Fraunhofer descubrió cerca de 600 de tales rayas oscuras, que a partir de entonces se conocieron como “líneas de Fraunhofer”. En 1859, Kirchhoff sugirió que un método muy preciso para analizar la composición de sustancias era a través del espectro que producían éstas al quemarlas con un mechero de Bunsen, y enunció sus *leyes de la espectroscopia* [52]: (i) un cuerpo incandescente emite un espectro continuo; (ii) un cuerpo gaseoso excitado emite un espectro de líneas brillantes; y (iii) cuando la luz pasa a través de un vapor produce líneas negras donde el vapor normalmente emite luz (líneas brillantes). Como fruto de sus investigaciones, Kirchhoff dedujo que en la atmósfera del Sol existía sodio, y así se hacía posible estudiar por vez primera la composición de los cuerpos celestes con sólo analizar la luz procedente de los mismos.

Finalmente, en 1913 Niels Bohr propuso su modelo atómico. Suponiendo que las órbitas eran estacionarias e introduciendo una expresión que

cuantizaba el momento angular de las mismas, obtuvo que su radio variaba de forma discontinua. Consideró que la energía liberada por un electrón al saltar de una órbita a otra se emitía en forma de fotones de frecuencia proporcional a la diferencia de energía entre las dos órbitas. En consecuencia, saltos electrónicos entre diferentes órbitas producen radiación de diferentes frecuencias. En definitiva, la Espectroscopia era una parte de la Física Cuántica.

C. ADN y radiación

El ADN, portador de la información genética [53,54,55,56], posee un esqueleto constituido por unidades repetitivas de desoxirribosa-fosfato. A cada molécula de desoxirribosa se puede unir una de estas cuatro bases: las bases púricas, adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas, timina (T) y citosina (C). La estructura tridimensional del ADN es una doble hélice, formada por dos hebras superenrolladas, dispuestas de tal forma que el esqueleto de azúcar-fosfato se encuentra en el exterior y las bases en el interior, formándose pares de bases específicos unidos por interacciones intermoleculares de puente de hidrógeno (A···T, G···C). La doble hélice presenta dos surcos, denominados *surco mayor* y *surco menor*, ya que los enlaces glicosídicos de un par de bases no están diametralmente opuestos entre sí.

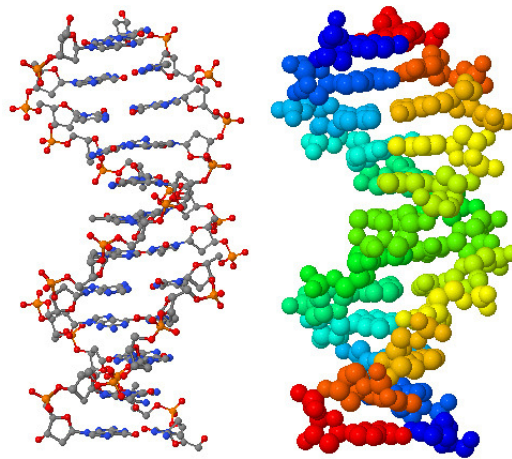


Figura 3. Estructura del ADN. Estos modelos han sido visualizados con el programa Jmol [57] a partir de una estructura obtenida por difracción de rayos X [58] almacenada en el *Protein Data Bank* [59].

El apilamiento de bases unas sobre otras está favorecido por las fuerzas de Van der Waals atractivas entre pares de bases adyacentes, y por el fenómeno de apilamiento o *stacking* (estabilización debida a interacciones entre anillos aromáticos apilados) [60]. Esta estructura es el origen de interesantes propiedades de transporte electrónico [56].

El ADN se replica para perpetuar la información genética. Aunque las bases de una hebra determinan las bases de la hebra complementaria, se puede producir un error en la *copia* del material genético, lo que da lugar a mutaciones³ [54,55]. Existen diversos agentes capaces de provocar cambios en la secuencia de bases: compuestos análogos a las mismas que pueden sustituirlas, compuestos que las modifican químicamente, compuestos que se intercalan entre pares de bases adyacentes... La radiación electromagnética produce efectos biológicos muy distintos según su frecuencia [61,62], pudiendo ser también un agente mutágeno. De hecho, la razón íntima de la fotocarcinogénesis se concreta en el daño que se le infringe al ADN al absorber la radiación ultravioleta [54,55,63], cuyo principal efecto consiste en unir covalentemente residuos adyacentes de pirimidinas a lo largo de una hebra. Este dímero de pirimidina (que suele ser de timina) no puede acomodarse en una doble hélice y, por tanto, la replicación y la expresión génica se bloquean hasta que desaparece la lesión. Dado que el mantenimiento de la integridad de la información genética es fundamental para la vida, todas las células poseen mecanismos para reparar el ADN dañado. Un ejemplo de lo que se conoce como *reparación directa* es la ruptura fotoquímica de estos dímeros: un enzima fotorreactivo denominado ADN fotoliasa utiliza la energía de la luz para, en estado excitado, escindir el dímero en sus bases originales⁴.

³ Una mutación puede consistir en un cambio en un único nucleótido, o en la inserción o eliminación de varios nucleótidos.

⁴ Los dímeros que no son reparados correctamente y las mutaciones resultantes pueden provocar cáncer de piel, y los individuos incapaces de repararlos sufren una grave enfermedad denominada *xeroderma pygmentosum*.

Los procesos de desexcitación no radiativos juegan aquí un papel esencial: estudios experimentales y teóricos de las nucleobases indican que el mecanismo ultrarrápido de conversión interna $S_1 \rightarrow S_0$ es el dominante en la desactivación de estas moléculas [64], lo que ayuda a prevenir mutaciones y garantiza cierta fotoestabilidad genómica.

Sin embargo, las alteraciones del ADN no siempre conllevan efectos negativos sobre el organismo, ya que también pueden resultar beneficiosas para la salud. En muchos tratamientos fototerapéuticos se pretende modificar el ADN merced a la acción de la radiación electromagnética en conjunción con un fármaco adecuado. Los fármacos pueden interactuar con el ADN de células con afecciones, alterando su estructura y sus funciones, mediante dos tipos de interacciones:

- (a) Interacciones covalentes: hidrólisis, reacciones redox, reacciones nucleofílicas o electrofílicas, etc...
- (b) Interacciones no covalentes [65]: interacciones electrostáticas externas con los grupos fosfato; unión a los surcos (por efectos hidrófobos, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno); e intercalación (el fármaco se introduce entre los pares de bases, estabilizándose por interacciones de *stacking*, de transferencia de carga, enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas).

P. Qué es la luz?

R. Es un fluido que nos saca de la obscuridad, y los Químicos no le conocen sino por sus efectos, aumentándolos ó disminuyéndolos sobre los cuerpos que operan, obrando sobre ellos, en particular sobre los ácidos, los óxídes metálicos, y también sobre los vegetales y animales.

P. Cómo obra la luz en los séres organizados?

R. Son bien patentes los efectos de ella en todas las plantas y frutos, pues á las que no tienen contacto con la luz les falta color y sabor, como á los animales, en particular los hombres, á quienes se les vuelve el color pálido y desagradable; las aguas destiladas en la obscuridad se llenan de filamentos mucosos, hasta cierto tiempo que se corrompen; los Jardineros saben bien proporcionar las plantas que necesitan los rayos de luz, y separar otras, como la escarola, el cardo...

Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica, dividido en tres secciones, por D. PEDRO GUTIERREZ BUENO, Regente de la Real Botica de S.M., primer Catedrático Exâminador del Real Colegio de Farmacia de esta Corte.

In conclusion, the treatment which I have described seems to have proved its value, and there is every reason to give it the place that it deserves in therapeutics, a place which it is at present still far from having obtained, doubtless owing to its strangeness and unintelligibility. In reality, its scientific basis is much better and more solid than that of many other methods of medical treatment.

N.R. Finsen, padre de la Fototerapia

1. Introducción

1.1. De Paracelso a la Medicina científica

Dado que todos los procesos que ocurren en la Naturaleza se pueden explicar mediante la Física y la Química, la Medicina ha bebido mucho de estas disciplinas para que se pudiera entender por qué suceden cambios en un organismo vivo y cómo evitarlos o provocarlos [17,62,63,66,67,68,69].

¿Cómo empezaron a usarse los compuestos químicos para combatir las enfermedades? Probablemente el origen de estas prácticas se pierda en la noche de los tiempos. Los pioneros en estas prácticas carecían de un marco teórico para explicar los fenómenos que estaban intentando provocar, pero consiguieron recopilar toda una serie de conocimientos prácticos, con el método de ensayo y error, que fueron transmitidos de generación en generación, y así estas técnicas medraron con el paso de los siglos. Fueron los alquimistas, con Jabir ibn-Hayyan a la cabeza, los que más empeño pusieron en introducir los remedios químicos en la Medicina [2]. El objetivo de la alquimia era transmutar los metales bajos en oro, y Jabir estaba convencido de que el proceso requería la presencia de un catalizador⁵, algo que ya se había aventurado en el siglo IV. Este catalizador era llamado *al-iksir* (elixir). El elixir no tardó en ser considerado un remedio capaz de curar muchas enfermedades, más tarde se convirtió en una panacea (capaz de curar *todas* las enfermedades) y, finalmente, se convirtió en el *elixir de la vida*, capaz de otorgar la eterna juventud. A partir del siglo XIII, el elixir de los árabes se convirtió en la “piedra filosofal”, a la cual no tardaron en atribuírsele propiedades medicinales en la Europa medieval. Así, los alquimistas empezaron a prescribir elixires para tratar diversas enfermedades.

En el siglo XVI se produjeron importantes cambios que pusieron en tela de juicio la doctrina galénica tradicional [1] y que relacionaban la alquimia con

⁵ Aunque se conocía que esta sustancia podía acelerar una reacción química sin ser alterada, el término como tal no fue definido de forma precisa hasta los trabajos de J.J. Berzelius en el siglo XIX.

la Medicina. Paracelso fue el principal impulsor de la Iatroquímica que, junto a otra corriente, la Iatrofísica, introdujo cambios en la concepción de la Medicina, pretendiendo la primera reducir los fenómenos del organismo a explicaciones químicas y, la segunda, a explicaciones físicas. Paracelso realizó un enorme esfuerzo por introducir la terapia química. Hasta ese momento, el uso de productos químicos en Medicina constituía la excepción y no la regla, usándose frecuentemente en dosis elevadas y tóxicas. Para Paracelso, un veneno actuaba como medicamento tras hacer surgir su naturaleza “oculta” beneficiosa mediante manipulación química. Sus ideas, recogidas en la obra *Labyrinthus medicorum errantium* (1553), influyeron de forma decisiva, aunque no sin gran controversia, en la Medicina posterior. De hecho, en el siglo XVI, la única cátedra de medicamentos químicos era la de *Remediis morborum secretis, et eorum usu* (*Remedios secretos de las enfermedades y su utilización*), que la Universidad de Valencia creó en 1591. Su titular fue el médico Llorenç Coçar, autor del *Dialogus veros medicinae fontes indicans* (*Diálogo que indica las verdaderas fuentes de la medicina*) en 1589, en el que destacó la importancia de la Química para el médico. Esta tendencia fue seguida por muchos científicos, como Oswald Croll, Johannes Hartmann, Tycho Brahe, Johann Tholde, Johann Rudolf Glauber y Francisco Sylvius.

En el siglo XVII, los médicos y farmacéuticos franceses vinculados a la corte labraron un nicho social para la práctica de la medicina química en París. En el llamado *Jardín del Rey* se pretendía complementar la formación de los estudiantes de medicina y farmacia, haciendo hincapié en la utilidad médica de la Química.

En el siglo XVIII, un autor que influyó de forma decisiva en las teorías de los seres vivos fue G.W. Leibniz, para quien “*el organismo o la máquina natural es una máquina en la que cada parte es una máquina, de manera que la sutilidad de su artificio se extiende hasta el infinito..., mientras que las partes de nuestras máquinas artificiales no son máquinas*”. El organismo era concebido

así por Leibniz como una máquina hipercompleja. La Química continuó manteniendo fuertes conexiones con la Medicina y la Farmacia durante este siglo [1,70]. Muchos de los primeros cursos de Química fueron impartidos en las facultades de medicina o en instituciones dirigidas a la formación de boticarios. En la segunda mitad del siglo destaca la figura de Antoine Fourcroy, para quien la aplicación de la Química moderna podía llegar a producir una “revolución médica”. Fourcroy investigó, entre otros asuntos, las propiedades terapéuticas del oxígeno (al igual que el inglés Thomas Beddoes y otros, que crearon el “Instituto Pneumático” para investigar la actividad terapéutica de ciertos gases). En 1800 publicó su tratado *Système des connaissances chimiques*, y fue además el editor de una revista titulada *La médecine éclairée par les sciences physiques*, cuyo objetivo era, precisamente, fomentar la aplicación de todas las ciencias a la Medicina. Asimismo, Fourcroy redactó numerosos artículos para demostrar que la Farmacia era un arte dependiente de la Química, destacando que los progresos realizados en el análisis químico permitirían en el futuro conocer mejor la naturaleza de los productos terapéuticos.

En España, hacia 1791, el cirujano naval Juan Manuel de Aréjula, que había bebido de las enseñanzas de Fourcroy, ostentaba la cátedra de Química en el Colegio de Cirugía de Cádiz. En 1795 fue el encargado de pronunciar el discurso de apertura del año académico, y decidió hablar *Sobre la necesidad de la quimia en la teoría, y la práctica de la medicina*. “¡Pero qué cosa más grande! –exclamaba Aréjula en el clímax de su alocución- haber llegado el Químico a mostrar que los mismos principios próximos, que se hallan en el Animal, se encuentran igualmente en el Vegetal y que entre sí sólo se diferencian por la proporción de los principios remotos”. En el terreno de la Fisiología, la Química había desvelado la naturaleza de las funciones orgánicas como la respiración o la digestión. “¿Quién podía adivinar ha pocos años –volvía a maravillarse Aréjula, ahora en forma de pregunta retórica- que en la respiración sucede exactamente lo mismo que en la combustión del carbón, de

una bugia, del aceite y substancias semejantes? ¿Quién imaginaria que en nuestro pecho se executa en un todo la misma operación que en nuestros hogares, que el pulmón es el órgano secretorio del calórico y la sangre arterial el instrumento por donde se reparte en las diversas partes del animal? ”. Aréjula señalaba que ya no era posible concebir cómo un facultativo podía decidir entre un remedio u otro sin el conocimiento de las propiedades químicas [70].

A partir del siglo XIX podemos decir que la Medicina dejó de ser un “arte” para pasar a ser verdaderamente “científica”, especialmente a través de una de sus ramas: la Fisiología. Como dijo el gran fisiólogo, físico y matemático alemán Hermann von Helmholtz, *“los fisiólogos creían que era el principio vital el que producía los procesos de la vida, y que se rebajaba la dignidad y naturaleza de esta si alguien expresaba la creencia de que la sangre era conducida a través de las arterias por la acción mecánica del corazón, o que la respiración tenía lugar siguiendo las leyes habituales de la difusión de los gases. Por el contrario, la generación actual trabaja duramente para encontrar las causas reales de los procesos que tienen lugar en un cuerpo vivo. No suponen que exista ninguna diferencia entre las acciones químicas y las mecánicas en un cuerpo vivo y fuera de él”* [1]. Estudiando la producción de calor durante la contracción muscular, demostró que el calor no era producido por los propios tejidos. Cuantificando estos hechos fisiológicos, dedujo un equivalente mecánico del calor que incorporó en su gran memoria de 1847, *Über die Erhaltung der Kraft*. En realidad, acaba de descubrir un pilar de la Física: el Principio de la Conservación de la Energía. En este siglo se produjo un avance espectacular de los saberes médicos merced a que las ciencias fisico-químicas pusieron a su disposición las leyes imprescindibles para explicar todos los fenómenos que tienen lugar en un organismo. Tal fue la esencia y razón de ser de la *medicina científica*, una corriente que encontró en Claude Bernard a su más conspicuo paladín, autor del célebre *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* en 1865. Pasteur calificó esta obra como *“monumento en honor*

del método que ha constituido las ciencias físicas y químicas desde Galileo y Newton, y que Claude Bernard se esfuerza por introducir en la fisiología y en la patología”.

En España, Pedro Gutiérrez Bueno publicó un *Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica* [71] en el que señalaba que “*la mayor parte de los Médicos y Cirujanos del día hablan de la Química, como indispensable para el buen desempeño de su profesión, pues ella les enseña á conocer los instrumentos de que se valen para la curación de sus enfermos; y así es, que sin algun conocimiento de esta ciencia no pueden saber las alteraciones que sufren los medicamentos, y alimentos en su mixtion, caminando á ciegas en la prescripción de los diferentes compuestos que piden en sus fórmulas”.*

Con estos datos queda patente la importancia creciente de la Física y la Química en la Medicina a lo largo de la Historia. El objeto de la presente Tesis Doctoral es el estudio teórico de compuestos empleados como fármacos en Fototerapia [72], una disciplina médica que ha experimentado un notable auge desde los albores del siglo XX. Quizás esta terapia representa como ninguna otra la combinación entre la Física (radiación electromagnética) y la Química (el fármaco empleado o fotosensibilizador) para combatir enfermedades.

1.2. Fototerapia

La Fototerapia es uno de los campos de la Medicina que ha experimentado un mayor desarrollo en las últimas décadas, ampliándose cada vez más el rango de enfermedades que pueden ser tratadas de esta forma: enfermedades cutáneas (verbigracia: psoriasis y vitíligo), cáncer (tumor de piel, cabeza y cuello, y de las mucosas de la boca, esófago, estómago, vejiga y pulmón), tratamiento de infecciones (destrucción de microorganismos), enfermedades oculares (degeneración macular húmeda), etc... La fotomedicina terapéutica trata no sólo de suprimir enfermedades, sino también la prevención o modulación de los mecanismos patógenos que las originan [73].

Los beneficios de la luz solar son conocidos desde tiempos pretéritos, y se han conservado testimonios de autores que alababan sus efectos medicinales: Heródoto (600 AEC) se percató de los efectos beneficiosos de la luz solar sobre el crecimiento de los huesos, e Hipócrates (*ca.* 400 AEC) abogó por el uso de la helioterapia para tratar diversas enfermedades. Pero la introducción de la Fototerapia y su estudio mediante el método científico se atribuye a Niels Ryberg Finsen, considerado el padre de esta técnica y autor del libro *Phototherapy* (1901). Finsen llevó a cabo experimentos del efecto de la luz de diferente color en animales y descubrió la forma de aplicar luz filtrada en el tratamiento de enfermedades como el *lupus vulgaris* o la viruela. En 1903 fue galardonado con el Premio Nobel de Medicina y Fisiología “*in recognition of his contribution to the treatment of diseases, especially lupus vulgaris, with concentrated light radiation, whereby he has opened a new avenue for medical science*” [74]. Desde entonces han sido tratadas con relativo éxito diversas enfermedades merced a la acción de la luz (íctericia, raquitismo, psoriasis, etc...) a la par que se comprobaba que muchas enfermedades eran más graves en países poco soleados.



Figura 4. Estatua en honor de la Reina Alexandra, erigida en 1908 en el jardín del Royal London Hospital (Whitechapel), en el cual se constituyó un *Light Department* en los albores del siglo XX. Abajo se ve la inscripción de la estatua, en la cual se destaca la labor de la esposa de Eduardo VII en traer a Inglaterra el remedio de Finsen contra el lupus.

Hay diferentes áreas dentro de la Fototerapia: el cromóforo, que es el fragmento molecular básicamente responsable de la absorción, puede estar presente en el organismo (Fototerapia: cura de hiperbilirubinemia neonatal o fotorregeneración de vitamina D) o ser administrado externamente (Fotoquimioterapia). En este último caso se administra un fármaco al paciente, denominado fotosensibilizador, inocuo en la oscuridad pero activo tras la absorción de una radiación típicamente del rango del ultravioleta, visible o infrarrojo cercano.

Si bien los mecanismos fototerapéuticos no son del todo conocidos, se distingue entre procesos de fotosensibilización de *Tipo I, II y III*. Los *Tipos I y II* son mecanismos dependientes del oxígeno y tienen lugar cuando la luz, en presencia del fotosensibilizador y del oxígeno molecular, induce una reacción química en un sustrato [72,75,76]. En las reacciones de *Tipo I*, el compuesto fotoactivo en su estado triplete promueve una reacción de transferencia electrónica al oxígeno molecular, conduciendo a la formación de radicales $O_2^{\bullet-}$ o HO_2^{\bullet} . Las reacciones de *Tipo II* corresponden a una transferencia de energía desde el estado excitado triplete del fotosensibilizador al oxígeno molecular en su estado fundamental, $O_2 (^3\Sigma_g^-)$, presente en el medio celular, para generar oxígeno muy reactivo en su estado excitado singlete, $O_2 (^1\Delta_g)$. Este tipo de protocolo se denomina *Terapia Fotodinámica* (PDT, *Photodynamic Therapy*) [72,77,78]. Todos estos intermedios interactúan después con diversos componentes de la membrana celular dañando, consecuentemente, las células anómalas, lo cual conduce a una remisión de la lesión; pero también provoca, en ocasiones, fotosensibilización cutánea, mutación, errores en la reparación del material genético y carcinogénesis [72,75,79,80]. Por el contrario, el mecanismo *Tipo III* es independiente del oxígeno y se basa en la interacción del fotosensibilizador con las bases del ADN, lo cual interfiere en la actividad genética [81,82,83,84,85,86]. Desde mediados del siglo XX se han descrito las

propiedades fotosensibilizadoras de diversos compuestos [72,77,87,88,89]: porfirinas, porfíricos, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, naftalocianinas, acridinas, santeños, quinonas extendidas...

Entre los diferentes tipos de fotosensibilizadores destacan las furocumarinas, una familia de compuestos heterocíclicos con una actividad fototerapéutica reconocida [82,83,84,90,91,92,93,94,95], que incluye los tres mecanismos anteriormente descritos [96] y cuya molécula parental es el psoraleno (7-H-furo[3,2-g][1]benzopirano-2-ona, *vide* Figura 5). Un tratamiento específico denominado *terapia PUVA* (psoraleno + UVA, entre 400 y 200 nm⁶) ha sido diseñado para tratar diversas enfermedades como psoriasis o vitiligo [97,98,99,100]. El tratamiento con plantas que contienen furocumarinas es conocido desde antaño (en Egipto y la India se vienen utilizando desde 2000-1200 AEC) [92]. En Egipto, los médicos usaban extractos hervidos de hojas, semillas y raíces de *Ammi majus* para el tratamiento del leucoderma. En la antigua India, extractos de *Psoralea coryfolia* eran administrados oralmente en forma de infusión, seguido de exposición a la luz solar, con objeto de tratar el vitiligo. Este tratamiento fue certificado por los Hindúes en el antiguo sistema *Ayurvédico* de Medicina y aparece registrado en el libro sagrado de la India (*Atharva-Veda*) y en muchos otros manuscritos médicos antiguos que datan de antes del año 200. Ibn El Bitar, en su libro del siglo XIII, *Madafrat Al Adwiya*, también describió el tratamiento del vitiligo con *Ammi majus* y luz solar.

En 1834 Kalbruner aisló a partir del aceite de bergamota el componente activo de estas plantas, el 5-metoxipsoraleno (5-MOP) o bergapteno. Hacia 1930 se había demostrado que varias plantas de las familias *Rutaceae* y *Umbelliferae* contenían furocumarinas lineales (como el psoraleno) y furocumarinas angulares (como la angelicina), y las estructuras y síntesis de estos compuestos fueron

⁶ Éste es el rango comúnmente empleado, si bien la radiación UV-A (nomenclatura basada en sus efectos sobre la salud) abarca entre 390 y 315 nm; en este sentido, la radiación UV cercano (según la nomenclatura usual en Química), que abarca entre 390 y 200 nm, se acerca más al rango antes señalado.

objeto de una investigación exhaustiva (Thoms, Späth). En los años 40 del siglo XX, Abdel Monem El Mofty fue el primero en emplear 8-metoxipsoraleno (8-MOP) en el tratamiento del vitiligo, que acababa de ser aislado a partir del *Ammi majus* por el farmacólogo egipcio Fahmy y sus colaboradores. En la década siguiente el 8-MOP (también llamado xantotoxina) estuvo ya disponible comercialmente, y le siguió pronto el compuesto sintético TMP (trimetilpsoraleno) [83]. En 1953, Lerner, Denton y Fitzpatrick, y más tarde Parrish en 1974 [98], publicaron estudios del tratamiento de vitiligo y psoriasis, respectivamente, con 8-MOP junto a exposición a luz ultravioleta (320-400 nm). La efectividad de la terapia PUVA se basa en la inhibición de la replicación de ADN y en la muerte de las células con proliferación anómala.

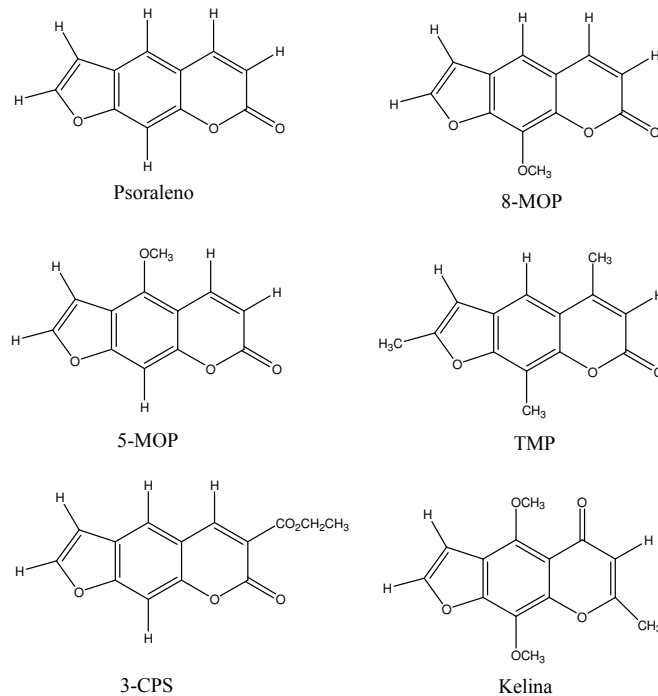


Figura 5. Familia de las furocumarinas.

Actualmente, el empleo de las furocumarinas, especialmente el 8-MOP, es habitual en diversos tratamientos médicos. Por ello, estos compuestos han sido extensamente estudiados, tanto en lo referente a su síntesis [101] como a sus propiedades físico-químicas, tanto desde la perspectiva experimental [102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120] como teórica [81,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131].

Experimentalmente, se ha hallado que el psoraleno presenta una débil y estructurada banda entre 360 y 270 nm (3.44 y 4.77 eV, respectivamente) con un máximo entre 360 y 310 nm (3.44-4.00 eV) en disolución acuosa y etanol [102,103]; además, se localiza otra banda puntiaguda a 248 nm (5.00 eV). El patrón de intensidad varía según la furocumarina y la posición del máximo depende del solvente, oscilando entre 305 nm (4.02 eV) y 340 nm (3.60 eV) [104,107,108,110,113,114,115,116]. Esta transición electrónica es la responsable de la absorción UV-A, origen de la acción fotosensibilizadora.

Respecto a las emisiones fluorescente (F) y fosforescente (P), se han detectado en el psoraleno en etanol a 409 nm (F , 3.03 eV) y 456 nm (P , 2.72 eV, T_0 –origen de banda) [102]; para el resto, los valores del máximo de emisión de fluorescencia varían entre 553 y 395 nm (2.22-2.77 eV), y el origen de banda de fosforescencia se sitúa entre 490 y 446.5 nm (2.53-2.74 eV) [104,107,108,110,111, 112,113,115,116,117].

El rendimiento cuántico Φ de fluorescencia medido es similar (en torno a 0.02) para el psoraleno ($\Phi_F = 0.019$, $\Phi_P = 0.13$ [104]), 5-MOP y 3-CPS, algo más alto para TMP, y menor para 8-MOP y kelina [104,108,113,115]. Junto con este parámetro, que indica que la fluorescencia del 8-MOP y la kelina está más eficientemente amortiguada, podemos emplear la razón de rendimientos cuánticos de fosforescencia/fluorescencia, Φ_P/Φ_F , como un indicador de cuán favorable es el proceso de cruce entre sistemas. Comparando datos en etanol a 77 K, la razón Φ_P/Φ_F va de 7.1 para el psoraleno, a 13.1 para 8-MOP, 11.9 para 5-MOP y 6.0 para TMP [104], indicando que la población relativa del estado

triplete es mayor en el 8-MOP. Kelina y 3-CPS, por otro lado, parece que dan lugar a rendimientos cuánticos de formación de triplete más altos que el resto de la familia en diferentes solventes [108,112,115,132].

A tenor de estos datos experimentales podemos concluir que el 8-MOP y la kelina, y quizás también el 3-CPS, son los fotosensibilizadores más relevantes, teniendo en cuenta que la población eficiente del estado T_1 es condición *sine qua non* para ejercer una apropiada acción fototerapéutica [84].

Se ha sugerido que la acción fotosensibilizadora de las furocumarinas se ejerce principalmente mediante el mecanismo de *Tipo III*, basado en la interacción entre el psoraleno en su estado excitado triplete más bajo y una base pirimidínica del ADN, en un proceso que se sugiere en tres pasos [133]:

- 1) La furocumarina se inserta entre bases pirimidínicas adyacentes en el ADN en ausencia de luz, formando un complejo que es estabilizado por apilamiento (*stacking*) y por fuerzas hidrofóbicas.
- 2) La absorción de un fotón induce la formación de monoadductos, mediante un mecanismo de fotocicloaddición [2+2], entre un doble enlace reactivo de la base pirimidínica y uno de los dos dobles enlaces reactivos de la furocumarina, uno en el anillo de furano, $C'_4 - C'_5$, y otro en el de pirona, $C_3 - C_4$ (*vide* Figura 6), formando el FMA (*furan-monoadduct*) y el PMA (*pyrone-monoadduct*), respectivamente⁷; la base más favorable para la interacción con el psoraleno es la timina, en concordancia con su predominancia en la formación de dímeros T<>T en ADN irradiado con luz UV [134,135,136]. Asimismo, se ha comprobado que irradiando soluciones acuosas conteniendo purinas y

⁷ Según la numeración tradicional, que es diferente a la numeración sugerida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

pirimidinas junto a psoralenos se produce una modificación en el espectro de fluorescencia de las segundas, mas no en las primeras [137].

3) El monoadducto, merced a la absorción de otro fotón, puede inducir a su otro doble enlace reactivo a interaccionar con una molécula de timina de la cadena opuesta de ADN, provocando la formación de un diaducto que entrecruza las dos hebras (*cross-link*), lo cual tiene importantes consecuencias, dado que se trata de una lesión importante del material genético que impide la replicación.

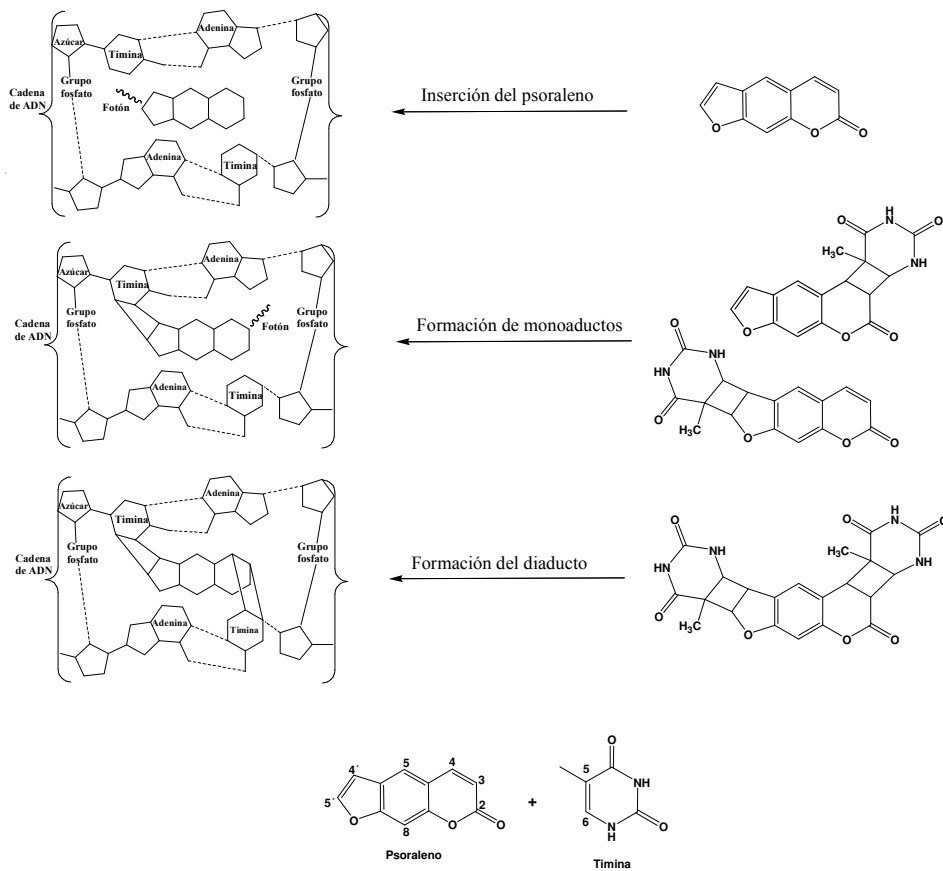


Figura 6. Mecanismo *Tipo III*: interacción psoraleno-timina en tres pasos. La terapia PUVa está basada en este tipo de interacción del fotosensibilizador (en este caso, la molécula de psoraleno) con el ADN.

Se ha demostrado que las furocumarinas son capaces de formar complejos moleculares cuando se añaden a una disolución acuosa de ácidos nucleicos [81], y la formación de mono- y diaductos ha sido analizada mediante estudios de elasticidad de mezclas psoraleno-ADN tras irradiación [138]. Asimismo, estos fotoaductos furocumarina-timina han sido caracterizados por cristalografía de rayos X para el 8-MOP [139] y espectros RMN de protón ^1H para los aductos formados por 8-MOP y TMP [140,141]. Además, también se han estudiado en profundidad los aductos formados por el 3-CPS [142,143,144].

Las regiones del ADN con la secuencia poli [dA-dT]-poli [dA-dT] parecen ser las más favorables para estas reacciones de fotocicloación [114]. De hecho, recientes estudios de mecánica molecular y dinámica molecular sugieren, en base a las conformaciones más favorables para la reacción fotoquímica, que el psoraleno fotorreacciona preferentemente en secuencias [AT]_n, y especialmente en regiones 5'-TpA [145]. Estos autores sugieren que la relativamente baja eficiencia en obtener el alineamiento geométrico correcto para la fotoadición, ya señalado en otros estudios [146], es debida a que hay dos mecanismos competitivos: por un lado la intercalación del psoraleno y por otro su unión al surco menor del ADN.

A pesar de que ambos dobles enlaces ($C_4' - C_5'$ y $C_3 - C_4$) son susceptibles de reaccionar con la timina, el primero parece ser el más fotorreactivo biológicamente [95]. El mecanismo fotoquímico subyacente y la contribución de los diferentes derivados del psoraleno no está claramente dilucidado. Los diaductos, por ejemplo, se dice que son formados solamente a partir del FMA, que es el único monoadocto capaz de formar *cross-links* a 360 nm [140,147] y, además, es el monoadocto que se forma preferentemente, aunque también se observa una cantidad significativa de PMA en muchos derivados [140,141,148]. Respecto al 8-MOP, el rendimiento de conversión de FMA a diadocto es aproximadamente cuatro veces mayor que el rendimiento de fotocicloación del 8-MOP al ADN [146], esto es, la formación del

monoadducto. Se cree que el estado triplete del monoadducto está implicado en la formación de los entrecruzamientos [149].

Como ya hemos indicado, la implicación de uno u otro monoadducto en el proceso de entrecruzamiento no está clara. Por irradiación a 365.5 nm (3.39 eV) se forman ambos monoadductos; mientras que el PMA no presenta fluorescencia, el FMA sí que es fluorescente [150,151,152]. Por otro lado, diversos estudios destacan el hecho de que el FMA, tras irradiación con luz UV de 253.7 nm (4.89 eV), se descompone en los reactivos originales [150]. Otros estudios señalan que la distribución de monoadductos en muestras de ADN difiere según la longitud de onda de la radiación empleada: 341.5 nm (3.63 eV) o 397.9 nm (3.12 eV): en el primer caso el producto principal es el diadducto, mientras que en el segundo lo es el FMA, aunque también se forma un pequeño pero definido número de diadductos [148]. Los monoadductos y los diadductos pueden romperse en sus monómeros originales tras irradiación con luz UV de longitud de onda corta [94,138].

Las furocumarinas también experimentan reacciones de fotocicloaddición-C₄ con ácidos grasos insaturados [80,96], lo que se traduce en efectos sobre la membrana celular. Por otro lado, se han obtenido resultados basados en observaciones microscópicas fluorescentes de células humanas de la mucosa oral que indican la asimilación de 5-MOP y 8-MOP por núcleos celulares [151].

Por lo que respecta al uso clínico de las furocumarinas, el 8-MOP se administra habitualmente por vía oral en el tratamiento del vitíligo [92] y de la psoriasis [98]. El 5-MOP también se emplea en la fotoquimioterapia de la psoriasis y, en comparación con el 8-MOP, muestra unos efectos secundarios menos severos y es mejor tolerado por los pacientes [84]. Por otro lado, la kelinina se emplea fundamentalmente en el tratamiento fotoquimioterapéutico del vitíligo [84]. Este compuesto no muestra efectos secundarios adversos prolongados ni eritema cutáneo, presumiblemente porque sólo forma monoadductos. El TMP se

usa igualmente para tratar la psoriasis y el vitiligo [113]. Por último, el 3-CPS ha sido probado en la fotoquimioterapia de la psoriasis [132] y sólo forma monoadductos con el ADN, en concreto FMA [142,144], igual que la kelinina [153], y por ello es considerado como una alternativa no carcinogénica al 8-MOP. Ello ha suscitado un enorme interés por dicho compuesto que se ha traducido en numerosos estudios sobre el mismo [116,142,143,144,154]. Cabe destacar que todas estas furocumarinas son capaces de formar monoadductos, pero sólo el psoraleno y el TMP muestran una tendencia muy favorable a formar diadductos. El 5-MOP y el 8-MOP también pueden formar diadductos, pero el proceso es menos favorable. En cambio, el 3-CPS y la kelinina no forman diadductos [75,155]. De hecho, algunos autores han destacado la escasa fotoactividad hacia el ADN mostrada por la kelinina [116]. La capacidad de formación de diadductos fue considerada en un principio como la clave de la actividad fototerapéutica de las furocumarinas, a pesar de que se cree que causan efectos secundarios adversos difícilmente reparables por los mecanismos de reparación del material genético, como carcinogénesis, mutagénesis e inmunosupresión [82,75]. Sólo las furocumarinas con grupos bifuncionales (es decir, con dos $C = C$ reactivos) como el psoraleno pueden formar diadductos y provocar estos efectos mutagénicos y letales.

No obstante, ciertas furocumarinas monofuncionales han resultado ser tan eficientes en los tratamientos como las bifuncionales, lo que sugiere que la inducción de lesiones en el ADN no puede ser considerada como el único mecanismo responsable de los efectos fototerapéuticos [84]. De hecho, estos compuestos, en estado triplete, también interaccionan con el oxígeno produciendo oxígeno singlete (mecanismo *Tipo II*) [75,79,132,156,157].

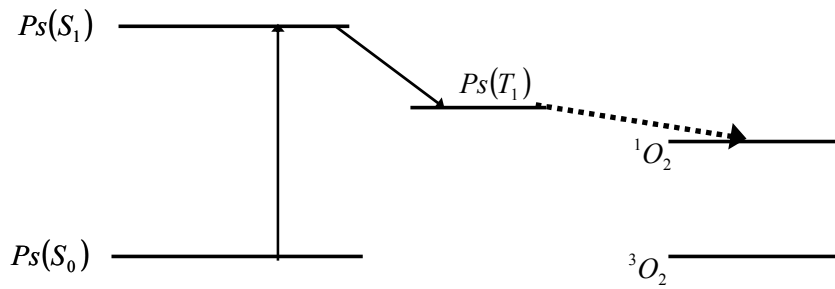


Figura 7. Mecanismo Tipo II: interacción psoraleno-oxígeno.

El oxígeno singlete, de naturaleza electrófila, reacciona con componentes de la membrana celular originando la muerte de la célula por apoptosis o “muerte celular programada” [53,72,158,159,160]. El psoraleno, por tanto, puede interactuar con el oxígeno molecular, y de hecho el oxígeno actúa como amortiguador [161,162,163] en la reacción fotoquímica entre psoraleno y timina [164], que resulta más lenta en su presencia. El psoraleno, el 8-MOP y el 3-CPS son considerados los más eficientes productores de oxígeno singlete [75,79,132,156,164,165].

Para explicar las propiedades fisico-químicas de estos compuestos debemos recurrir a la Mecánica Cuántica y elucidar la estructura electrónica de cada sistema. Dichas propiedades deseables son: que la molécula presente un estado triplete que se pueble eficientemente a partir del estado excitado singlete, que dicho estado presente una vida media lo suficientemente larga como para poder interactuar con el ADN o con el oxígeno molecular, que el fármaco sea inocuo en ausencia de radiación, que absorba a longitudes de onda largas (porque así la radiación incidente es dispersada en menor grado por los órganos y tejidos y podemos tratar zonas más internas del organismo), y que forme

monoadductos y no diaductos (para evitar los efectos carcinogénicos secundarios) [72,89].

Además, un buen fotosensibilizador debe ser ambifílico (con una parte hidrófila para poder ser administrado por vía intravenosa, pero también con una cierta hidrofobicidad para interactuar con el ADN), sintetizable con un grado de pureza adecuado y que sea eliminado rápidamente del organismo, para que no persista la fotosensibilización más de lo estrictamente necesario [72].

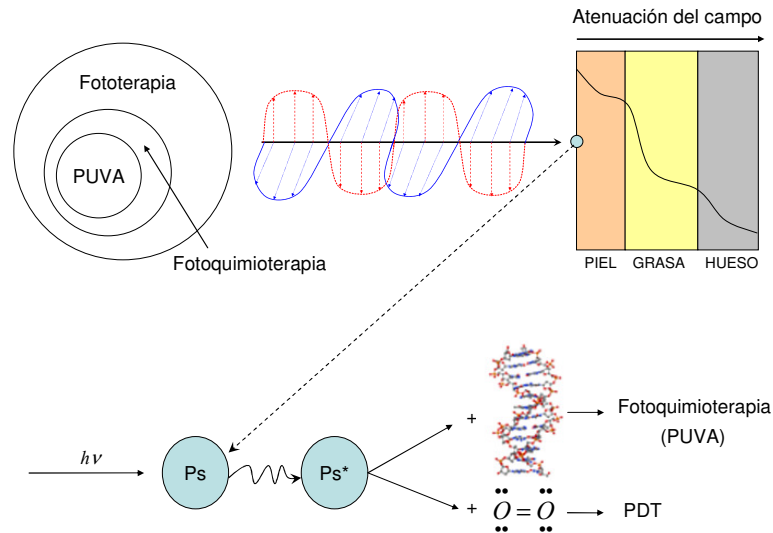


Figura 8. La fototerapia engloba *todos* los casos en los que la luz es empleada con fines terapéuticos. La fotoquimioterapia es un subconjunto de la misma (con la condición de emplear un fármaco exógeno), y la terapia PUVA es un caso particular de fotoquimioterapia, al igual que la PDT.

1.3. Estudio de la estructura electrónica

1.3.1. Química Cuántica

En primera instancia, la materia está compuesta por átomos, que se pueden agrupar formando moléculas. Los átomos constan de un núcleo (con protones y neutrones) y electrones. Sin embargo, el esquema es más complejo, ya que existen muchas partículas subatómicas relacionadas entre sí [19,16,28,40,44,166,167,168]. En líneas generales, las partículas elementales [169,170,171] se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios: por el tipo de interacción en la que participan (leptones y hadrones), por los productos de desintegración (mesones y bariones), y por el espín (bosones y fermiones). El *modelo estándar* establece que las partículas se dividen en fermiones (como el electrón), que constituyen la materia (y sus antipartículas, la antimateria); y bosones (como el fotón), que transmiten las fuerzas. Así, en los bosones se halla el origen de las fuerzas que actúan en la materia o, dicho de otro modo, de los campos a través de los cuales interaccionan los fermiones.

Los fermiones, de espín semientero, se caracterizan por cumplir el Principio de Antisimetría, $\Psi (\dots, x_i, \dots, x_j, \dots) = - \Psi (\dots, x_j, \dots, x_i, \dots)$, según el cual la función de onda asociada a un conjunto de partículas debe ser antisimétrica con respecto al intercambio de cualesquiera dos partículas, y tienden a estar todos en estados cuánticos diferentes, comportándose según la estadística de Fermi-Dirac; por el contrario, los bosones tienden a estar todos en el mismo estado de energía y se comportan según la estadística de Bose-Einstein [172].

Los electrones en un átomo no pueden ocupar cualquier lugar del espacio en torno al núcleo. A aquella región del espacio en la que existe una probabilidad finita de encontrar un electrón en un átomo o molécula se le da el

nombre de orbital, una función espacial de un electrón. Su forma se define como una superficie de densidad de probabilidad $|\psi|^2$ constante que encierra una gran parte de la probabilidad de encontrar al electrón y estima, por tanto, la densidad electrónica. Si el sistema está formado por una única partícula, la probabilidad de encontrarla en un elemento de volumen $dx \cdot dy \cdot dz$ en la posición (x, y, z) viene definida por $P = \iiint |\Psi(x, y, z)|^2 dx dy dz$.

El concepto de *orbital molecular* (MO, *molecular orbital*) es el más importante dentro del marco de la Química Cuántica contemporánea. Casi todo nuestro conocimiento sobre “lo que hacen los electrones en las moléculas” está basado en este concepto, y prácticamente todos los métodos computacionales empleados para el análisis de la estructura electrónica de las moléculas comienzan con un cálculo de los orbitales moleculares del sistema. En su modelo más simple el MO está ocupado por cero, uno o dos electrones [173]. Un orbital atómico viene definido por los valores de los números cuánticos n , l y m_l . Para cada una de las combinaciones permitidas de estos tres números cuánticos existe una función de onda que, en el caso de sistemas monoeléctricos, es solución de la ecuación de Schrödinger [25]. Los orbitales que pertenecen a una *capa* (designada por n) están agrupados en *subcapas* (designadas por l). Cada subcapa está a su vez formada por $2l+1$ orbitales individuales, designados por el número cuántico m_l . Pauli añadió el número cuántico, s , cuyos valores podían ser $+1/2$ y $-1/2$, que corresponden al momento angular de espín del electrón [166]. En 1925 formuló el *Principio de Exclusión*, que impone que dos electrones en un mismo átomo no pueden tener los cuatro números cuánticos iguales (lo que equivale a decir que en un mismo orbital no puede haber dos electrones con espines paralelos), y que es un caso particular del Principio de Antisimetría.

El espín no fue tenido en cuenta en las primeras formulaciones de la Mecánica Cuántica. Este efecto fue introducido por Paul Dirac en 1928, quien

teniendo en cuenta el efecto de la Relatividad Especial fundó la *Mecánica Cuántica Relativista*. Demostró matemáticamente por qué el electrón tenía espín 1/2. Esta teoría es esencial para entender fenómenos como el acoplamiento espín-órbita, muy importante en Espectroscopia. La ecuación de Dirac permite describir el movimiento relativista del electrón [173,174], obteniéndose valores de energía positivos correspondientes a los niveles energéticos del electrón, y valores negativos que representan los niveles energéticos del positrón, su antipartícula.

Un aspecto esencial de la Química Cuántica es el estudio de la estructura electrónica de la materia. En general, los métodos químico-cuánticos buscan, mediante procedimientos numéricos computacionales [35,46,175,176], soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger no relativista independiente del tiempo, $\hat{H}\psi = E\psi$, siendo el operador Hamiltoniano $\hat{H} = \hat{T}_e + \hat{T}_N + \hat{U}_{Ne} + \hat{U}_{ee} + \hat{U}_{NN}$, cuyos términos representan la energía cinética de los electrones, la energía cinética de los núcleos, la energía potencial de atracción núcleo-electrón, la energía potencial de repulsión electrón-electrón y la energía potencial de repulsión núcleo-núcleo, respectivamente.

El Hamiltoniano para N electrones y M núcleos es, en unidades atómicas [177]:

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{ia}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

Ecuación 2

El Hamiltoniano es un operador lineal y hermítico [31,177,178], lo cual implica que sus valores propios son reales y las funciones propias correspondientes a diferentes valores propios del operador son ortogonales. Siempre es posible diagonalizar la representación matricial \underline{Q} de un operador \hat{O}

mediante una transformación unitaria, $\underline{U}^\dagger \underline{OU} = \underline{\omega}$, siendo $\underline{U}^\dagger \underline{U} = \underline{1}$, expresándola así en la base de sus vectores propios y obteniendo también los valores propios, que son precisamente los elementos diagonales de la matriz $\underline{\omega}$ [177].

La principal dificultad para resolver la ecuación de Schrödinger proviene de la presencia en el Hamiltoniano del término de repulsión interelectrónica, r_{ij}^{-1} , que representa la repulsión entre los electrones i y j , la cual se hace infinita para $r_{ij} = 0$, lo cual impide un acercamiento excesivo de cualesquiera dos electrones. Por tanto, el movimiento de los electrones no es independiente, sino que está correlacionado. Este fenómeno se denomina ***correlación electrónica***. De esta forma, decir que el movimiento de los electrones está correlacionado equivale a plantear que la probabilidad de encontrar dos electrones en un mismo elemento de volumen es nula. Por ello se dice que cada electrón está rodeado por un hueco de Coulomb.

En muchos problemas químico-cuánticos podemos considerar que se cumple la *aproximación de Born-Oppenheimer*: los electrones en una molécula, más ligeros, se mueven en un campo de núcleos fijos, más pesados. Este formalismo nos permite definir un Hamiltoniano electrónico y un Hamiltoniano nuclear. La solución de la ecuación de Schrödinger electrónica

$$\hat{H}_{elec} \Psi_{elec} = \varepsilon_{elec} \Psi_{elec}$$

Ecuación 3

es una función de onda electrónica que describe el movimiento de los electrones y que depende directamente de las coordenadas electrónicas y paramétricamente de las coordenadas nucleares (para diferentes disposiciones de los núcleos, Ψ_{elec} es una función diferente de las coordenadas electrónicas). La energía total será la suma de la energía electrónica y la energía de repulsión nuclear (que es

constante para una disposición concreta de los núcleos). Una vez resuelto el problema electrónico, el siguiente paso es solucionar el problema nuclear: el movimiento de los núcleos bajo las mismas suposiciones tenidas en cuenta para formular el problema electrónico. Las soluciones de la ecuación de Schrödinger nuclear

$$\hat{H}_{nucl} \Phi_{nucl} = \varepsilon \Phi_{nucl}$$

Ecuación 4

son las funciones Φ_{nucl} , que describen la vibración, rotación y traslación de la molécula, y la aproximación de Born-Oppenheimer a la energía total, ε , que incluye las energías electrónica, traslacional, vibracional y rotacional. Estas

funciones están normalizadas: $\langle \Psi(\vec{r}) | \Psi(\vec{r}) \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} \Psi^*(\vec{r}) \Psi(\vec{r}) d\vec{r} = 1$. La función de

onda total es:

$$\Psi(\{\vec{r}_i\}, \{\bar{R}_A\}) = \Psi_{elec}(\{\vec{r}_i\}, \{\bar{R}_A\}) \cdot \Psi_{nucl}(\{\bar{R}_A\})$$

Ecuación 5

La energía total, $\varepsilon_{tot}(\{\bar{R}_A\})$, constituye una *hipersuperficie de energía potencial*, que describe el valor de la energía potencial para todas las configuraciones nucleares posibles. Por consiguiente, los núcleos se mueven sobre una superficie de energía potencial obtenida resolviendo el problema electrónico.

Sin embargo, en ciertos procesos que implican *cruces* entre hipersuperficies, la aproximación de Born-Oppenheimer no es aplicable; por tanto, se requieren métodos especiales para la localización, optimización y estudio de las estructuras de cruce. Dado que la Fotofísica y la Fotoquímica

modernas se basan en los cruces (cruces evitados, intersecciones cónicas) entre las hipersuperficies de los estados implicados, debemos ir *más allá de Born-Oppenheimer* para analizar los procesos espectroscópicos no adiabáticos (cuando participan varias hipersuperficies).

Hasta ahora se ha soslayado la cuestión de la forma explícita de una función de onda. El producto de una función espacial (orbital) por una función de espín (α o β) se denomina espín-orbital. La función de onda antisimétrica más simple con la que podemos describir el estado fundamental de un sistema polielectrónico (de N electrones) es un determinante de Slater, que es un producto antisimetrizado y normalizado de espín-orbitales, de la forma:

$$\Psi(x_1, x_2, \dots, x_N) = (N!)^{-1/2} \begin{vmatrix} \chi_i(x_1) & \chi_j(x_1) & \dots & \chi_k(x_1) \\ \chi_i(x_2) & \chi_j(x_2) & \dots & \chi_k(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \chi_i(x_N) & \chi_j(x_N) & \dots & \chi_k(x_N) \end{vmatrix}$$

Ecuación 6

Este determinante de Slater tiene N electrones ocupando N espín-orbitales (que son ortonormales: $\langle \chi_i | \chi_j \rangle = \delta_{ij}$, definiendo el delta de Kronecker como: $\delta_{ij} = 1$ si $i = j$; $\delta_{ij} = 0$ si $i \neq j$), sin especificar qué electrón ocupa cada orbital (partículas indistinguibles). Los espín-orbitales están completamente determinados excepto por una transformación unitaria entre los mismos [179]: esto implica que podemos elegir un conjunto ortonormal de espín-orbitales para calcular más fácilmente los elementos matriciales del Hamiltoniano⁸.

⁸ Si llevamos a cabo una transformación lineal del conjunto $\{\chi_i\}$, $\chi'_i = \sum_j \chi_j A_{ji}$, siendo A_{ji} un elemento de la matriz \underline{A} de dimensión $N \times N$, cuyo determinante es no nulo, entonces $\Psi' = \det(\underline{A}) \Psi$, y dado que ambas funciones sólo difieren en una constante, representan la misma situación física. Además, como los espín-orbitales, χ_i , son linealmente independientes, podemos escoger una matriz de transformación \underline{A} de tal modo que los espín-orbitales resultantes sean ortonormales y, por ende, la función de onda esté normalizada.

Además, los espín-orbitales han de ser linealmente independientes (en caso contrario, el determinante es cero), el intercambio de dos filas (que equivale al intercambio de las coordenadas de dos electrones) cambia el signo del determinante (principio de antisimetría), y si dos columnas son iguales (esto es, dos electrones ocupan el mismo espín-orbital) el determinante es cero (principio de exclusión de Pauli).

Esta función de onda cumple con las restantes condiciones de aceptabilidad [31,174]: cuadráticamente integrable y por tanto normalizable, esto es, $\langle \Psi | \Psi \rangle = 1$, unívoca y continua (para que la probabilidad esté bien definida en cada punto del espacio), y pertenece al espacio vectorial de Hilbert⁹.

Utilizando un determinante de Slater como función de onda se cumple que la probabilidad de encontrar dos electrones con espines paralelos en el mismo punto del espacio es cero, mientras que dicha probabilidad es no nula para electrones de espín opuesto, ya que la probabilidad de encontrar simultáneamente dos electrones en dos puntos distintos del espacio es igual al producto de ambas probabilidades (sucesos independientes) [180], lo cual no tiene sentido físico. Por tanto, dentro de la descripción unideterminantal de la función de onda, el movimiento de electrones con espines paralelos está correlacionado, pero el movimiento de electrones con espines opuestos no lo está. Físicamente, al utilizar una función tipo determinante de Slater estamos utilizando un modelo de electrones independientes, despreciando el hueco de Coulomb. Pero, como el movimiento de dos electrones con espines paralelos sí está correlacionado, se dice que existe un hueco de Fermi alrededor de cada electrón, lo cual es consecuencia directa del principio de antisimetría [181].

Si la función de onda para un sistema de N electrones es el determinante de Slater $\Psi_0 = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_a \chi_b \dots \chi_N\rangle$, construido a partir de N espín-orbitales

⁹ Espacio vectorial lineal que puede tener un número infinito de dimensiones y definido, en general, para funciones complejas. El estado de un sistema en Mecánica Cuántica se representa por un vector en un espacio de Hilbert.

ortonormales $\chi_a | a = 1, \dots, N$, la energía electrónica viene dada por la expresión

$$E_0 = \frac{\int d\tau \Psi_0^* \hat{H} \Psi_0}{\int d\tau \Psi_0^* \Psi_0} = \frac{\langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle}{\langle \Psi_0 | \Psi_0 \rangle}. \text{ Para conocer el valor de } E_0 \text{ se han de evaluar}$$

los elementos matriciales del Hamiltoniano, considerado éste como suma de operadores monoeléctricos y dielectrónicos, utilizando las *reglas de Slater* [177]:

$$E_0 = \langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle = \sum_a^N \langle a | \hat{h} | a \rangle + \frac{1}{2} \sum_a^N \sum_b^N (\langle ab | ab \rangle - \langle ab | ba \rangle)$$

Ecuación 7

Cada espín-orbital ocupado χ_a contribuye con un término $\langle a | \hat{h} | a \rangle$ a la energía, que expresa la energía cinética y de atracción nuclear promedio de un electrón descrito por dicho espín-orbital. Cada par de espín-orbitales ocupados (χ_a, χ_b) contribuyen con dos términos: la integral dielectrónica $\langle ab | ab \rangle$, que es la integral coulombiana y representa la repulsión clásica entre las densidades de probabilidad $|\chi_a(x_1)|^2$ y $|\chi_b(x_2)|^2$; y la integral dielectrónica $\langle ab | ba \rangle$, que es la integral de intercambio y proviene del requerimiento de antisimetría de la función de onda polielectrónica, y puede ser positiva o cero (si los dos electrones tienen espines paralelos), lo cual justifica que un estado triplete tenga menor energía que un estado singlete con la misma configuración electrónica. Es posible clasificar los estados atendiendo a la multiplicidad de espín (singletes, dobletes, tripletes, etc...) porque el operador Hamiltoniano no depende de las coordenadas de espín y, por consiguiente, conmuta con los operadores \hat{S}^2 y \hat{S}_z , que a su vez conmutan entre sí. Esto implica que los tres operadores poseen un conjunto completo de funciones propias comunes.

En Química Cuántica existen varios tipos de métodos aproximados, basados en el método variacional y/o en la teoría de perturbaciones¹⁰ [29,31,177], para soslayar la dificultad que presenta el término de repulsión electrón-electrón presente en el operador Hamiltoniano para la solución de la ecuación de Schrödinger.

El método variacional [177] se basa en el principio variacional, que consiste en que, habiendo definido una función de prueba Φ (normalizada y que se anula en los límites del sistema) tal que

$$\varepsilon(\Phi) = \frac{\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle}$$

Ecuación 8

la energía $\varepsilon(\Phi)$ es estacionaria con respecto a cualquier variación en Φ . Ello nos lleva a que $\varepsilon(\Phi) \geq \varepsilon_0$: dada cualquier función de onda que satisfaga las condiciones de contorno del problema, el valor esperado de la energía calculado con esta función es mayor o igual que el valor de la energía exacta (ε_0) del estado fundamental.

El método de variaciones lineales [177] consiste en que la función de prueba es combinación lineal de funciones conocidas (conjunto de base):

$$\Phi = \sum_i c_i \psi_i$$

Ecuación 9

¹⁰ También existen métodos mixtos que no se pueden adscribir a una aproximación concreta (CC, DFT, MCPT...), tal y como veremos más adelante.

donde c_i son los coeficientes de la expansión. Cuanto mayor sea el número de coeficientes en la combinación lineal, menor será la energía variacional y, por ende, tanto más próxima a la energía exacta.

Si el conjunto de base es ortonormal, la condición de normalización para la función de prueba resulta: $\langle \Phi | \Phi \rangle = \sum_i \sum_j c_i c_j \langle \psi_i | \psi_j \rangle = \sum_i c_i^2 = 1$. Se cumple igualmente la relación: $\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle = \sum_i \sum_j c_i c_j H_{ij}$. El objetivo es aplicar la

condición de estacionario a $\langle H \rangle$, esto es, $\partial / \partial c_k (\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle) = 0$, siendo $k = 1, \dots, N$, con la restricción de la condición de normalización. El problema de hallar un punto estacionario de una función sujeta a una restricción, cuyas variables no son todas independientes (precisamente por la condición de normalización), se resuelve aplicando el método de multiplicadores indeterminados de Lagrange [11,161,177], que consiste en construir una función cuyos puntos singulares tengan lugar al mismo valor de los coeficientes, y en el caso del valor esperado de la energía esta función es: $L(c_1, \dots, c_N, E) = \langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle - E(\langle \Phi | \Phi \rangle - 1)$.

Por tanto, $\partial L / \partial c_k = 0$, con $k = 1, \dots, N-1$. Y como el multiplicador indeterminado E lo escogemos según nuestra conveniencia, imponemos que $\partial L / \partial c_N = 0$, y resolvemos la ecuación resultante. Por tanto, el procedimiento consiste en proponer varias funciones de prueba, calcular el valor esperado de la energía para cada una de ellas, escoger aquella de energía menor y concluir que es la mejor función que se puede obtener de entre los tipos de función de prueba consideradas.

Así, desarrollando la expresión del valor esperado de la energía:

$$\langle \Phi | \hat{H} | \Phi \rangle / \langle \Phi | \Phi \rangle = \langle c_A \psi_A + \dots | \hat{H} | c_A \psi_A + \dots \rangle / \langle c_A \psi_A + \dots | c_A \psi_A + \dots \rangle$$

y derivándola con respecto a los coeficientes e igualando a cero (para asegurar la condición de punto estacionario), obtenemos un sistema de ecuaciones homogéneas (*ecuaciones seculares*). Para que este sistema tenga una solución diferente de la trivial, el determinante de los coeficientes debe ser nulo, de acuerdo con el teorema de Rouché-Frobeniüs [36]. Imponiendo esta igualdad, y considerando la condición de normalización, obtenemos las energías de los orbitales y los propios orbitales moleculares Φ_i como combinación lineal de orbitales atómicos (ψ_A, ψ_B, \dots), lo que se conoce como aproximación **MO-LCAO** (*molecular orbitals as linear combination of atomic orbitals*). El método variacional puede extenderse también a los valores propios que estén por encima del estado fundamental (estados excitados), si empleamos el método de variaciones lineales (teorema de McDonald).

Por otro lado, la teoría de perturbaciones [29,177,183] se basa en aplicar un parámetro de perturbación al Hamiltoniano y relacionar las funciones propias y los valores propios desconocidos del sistema perturbado, con las funciones propias y los valores propios conocidos del sistema sin perturbar ($\hat{H}^{(0)}\Psi_n^{(0)} = E_n^{(0)}\Psi_n^{(0)}$). Es decir, $\hat{H} = \hat{H}^{(0)} + \lambda \cdot \hat{H}'$, y se va variando el parámetro λ desde 0 (sistema sin perturbar) hasta 1 (sistema perturbado), cumpliéndose necesariamente que $\hat{H}' \ll \hat{H}^{(0)}$.

Los niveles energéticos y sus funciones propias se obtienen mediante desarrollos en serie de Taylor, añadiendo correcciones de 1^{er}, 2^o orden..., esto es,

$$E_i = E_i + \sum_{n=1}^{\infty} (1/n!) \left(\partial^n E_i / \partial \lambda^n \right)_{\lambda=0} \cdot \lambda^n = E_i^{(0)} + E_i^{(1)} + E_i^{(2)} + \dots, \text{ y por otro lado,}$$

$$\Psi_i = \Psi_i + \sum_{n=1}^{\infty} (1/n!) \left(\partial^n \Psi_i / \partial \lambda^n \right)_{\lambda=0} \cdot \lambda^n = \Psi_i^{(0)} + \Psi_i^{(1)} + \Psi_i^{(2)} + \dots. \text{ La corrección}$$

de orden n a la energía se expresa como $E_i^{(n)} = \langle \Psi_i^{(0)} | \hat{H}' | \Psi_i^{(n-1)} \rangle$. Cabe destacar que con correcciones de orden n a la función de onda se pueden calcular correcciones de orden $n + 1$ a la energía.

Resumiendo, en la aproximación MO-LCAO los orbitales moleculares se pueden considerar como una mezcla de los orbitales atómicos de los átomos que constituyen la molécula [25,182]. Al formarse una molécula, se combinan los orbitales atómicos de cada átomo que presentan la misma simetría. Al solaparse los orbitales se puede sumar o restar la densidad electrónica en las áreas de solapamiento, dando lugar, respectivamente, a orbitales moleculares enlazantes o antienlazantes, que según su simetría serán σ , π o n ¹¹. Tradicionalmente, los orbitales más importantes en la reactividad química son el HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*), el orbital ocupado de más alta energía, y el LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), el orbital vacío de más baja energía, ya que, en el modelo orbital más simple, si la molécula capta un electrón será más favorable energéticamente situarlo en el LUMO, y si lo pierde, será más favorable que sea del HOMO.

¹¹ Nomenclatura según el comportamiento del orbital respecto a la rotación respecto al eje principal de simetría. Sin embargo, en general, los orbitales se clasifican según las representaciones irreducibles del grupo puntual al cual pertenece la molécula.

1.3.2. Métodos de cálculo

La Química Cuántica se ha consagrado en las últimas décadas como una valiosa herramienta para poder desentrañar los misterios de la Naturaleza. Actualmente, hay una extensa variedad de métodos químico-cuánticos, cada uno de los cuales desarrollado para resolver una serie de problemas específicos. En realidad, no tiene sentido preguntarse cuál es el *mejor*, sino cuál es el más *adecuado* para un problema concreto [173,177,174,183,184,185]. Nos centraremos en los métodos *ab initio*, que emplean el Hamiltoniano correcto sin hacer uso de otros datos que no sean las constantes físicas fundamentales. El método Hartree-Fock (HF) [177,186] es el más simple. Con este método obtenemos los mejores espín-orbitales de tal modo que el determinante resultante hace estacionaria la energía. La flexibilidad variacional en la función de onda estriba en la elección de los espín-orbitales. Minimizando el correspondiente valor promedio del Hamiltoniano podemos obtener la ecuación Hartree-Fock¹²:

$$\hat{f}|\chi_a\rangle = \varepsilon_a|\chi_a\rangle$$

Ecuación 10

donde \hat{f} es un operador monoelectrónico denominado operador de Fock, en el cual existe un término que representa el potencial promedio que experimenta cada electrón debido a la presencia de los otros electrones. El término ε es la energía de los espín-orbitales. La esencia de la aproximación HF es sustituir el

¹² Como el determinante de una matriz es invariante frente a una transformación unitaria, diferentes conjuntos de espín-orbitales hacen estacionaria la energía, y el conjunto que da lugar a una representación diagonal de la matriz de valores propios, obteniéndose esta ecuación, se denomina *conjunto canónico*, que forma una base para una representación irreducible del grupo puntual de la molécula.

complicado problema polielectrónico por un problema monolectrónico en el cual la repulsión interelectrónica se trata de forma promedio. La ecuación HF es no lineal, dado que el operador de Fock depende de sus funciones propias, y hemos de resolverla iterativamente mediante el método SCF (*self-consistent field*).

La solución de la ecuación HF proporciona un conjunto de espín-orbitales ortonormales χ_k con energías orbitales ε_k . Los N espín-orbitales de menor energía son los ocupados. El determinante de Slater formado a partir de estos orbitales es la función de onda HF del estado fundamental. El resto de espín-orbitales son los virtuales. Los espín-orbitales ocupados, $\chi_a \mid a = 1, \dots, N$, forman un conjunto ortonormal y expanden el espacio de Fock. Los espín-orbitales restantes (no ocupados), que junto con los espín-orbitales ocupados forman un conjunto ortonormal completo, los denotaremos por $\chi_r \mid r = N+1, \dots, \infty$, y corresponden al subespacio complementario de Fock.

Según empleemos espín-orbitales restringidos o no restringidos, hablaremos respectivamente de *Restricted Hartree-Fock* (RHF) o *Unrestricted Hartree-Fock* (UHF). En el primer caso tenemos el mismo orbital espacial para las dos funciones de espín, mientras que en el segundo caso, a través de una ruptura de simetría, se permite que los espín-orbitales correspondientes a funciones de espín diferentes tengan distribuciones espaciales distintas. El método RHF es *size-consistent*¹³, pero presenta un comportamiento incorrecto a largas distancias (para sistemas que disocian en productos capa abierta, esto es, con electrones desapareados), lo cual implica un tratamiento erróneo de la disociación; verbigracia, en la molécula de H_2 se obliga a los dos electrones a tener la misma distribución espacial mientras se alarga la distancia de enlace, cuando en realidad los fragmentos separados las tendrán localizadas en regiones muy diferentes [181], pero el método UHF sí permite la disociación correcta

¹³ La energía del conjunto de dos sistemas no interaccionantes no coincide con la suma de las energías individuales.

(aunque tiene el problema de presentar contaminación de espín, esto es, las soluciones no son funciones propias de espín). Sin embargo, la mejor opción para obtener la disociación correcta es emplear los métodos multiconfiguracionales autoconsistentes MCSCF (*multi-configurational self-consistent field*).

Para mejorar los resultados a nivel Hartree-Fock hemos de incluir el efecto de la correlación electrónica. La función de onda Hartree-Fock sólo tiene en cuenta los orbitales moleculares ocupados y es uniconfiguracional. Por tanto, aunque en ocasiones puede ser una buena aproximación para el estudio del estado fundamental, adolece de falta de precisión y es inadecuada para tratar, por ejemplo, estados excitados. Así, debemos incluir más de una configuración¹⁴ en la expansión de la función de onda polielectrónica, por otro. Así, la función de onda exacta para cualquier estado del sistema se puede escribir como:

$$|\Phi\rangle = C_0|\Psi_0\rangle + \sum_{ra} C_a^r |\Psi_a^r\rangle + \sum_{a<b;r<s} C_{ab}^{rs} |\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \dots$$

Ecuación 11

En esta ecuación tenemos en cuenta, sucesivamente, el determinante del estado fundamental, la suma de los determinantes uniexcitados (promoción $a \rightarrow r$), la suma de los determinantes biexcitados (promociones $a \rightarrow r$ y $b \rightarrow s$), etc... Si bien el conjunto infinito de determinantes $|\Psi_i\rangle$ es un conjunto completo para la expansión de cualquier función de onda polielectrónica, en la práctica solemos truncar esta expansión N -electrónica por motivos computacionales. Igualmente, cada una de las funciones de onda polielectrónicas $|\Psi_i\rangle$ está constituida por espín-orbitales, $\chi_i = \psi_i \cdot s$, cuya función espacial u orbital molecular es a su vez

¹⁴ Distribución de los electrones del sistema en espín-orbitales que es función propia del operador espín electrónico total al cuadrado. Se denominan CSFs (*Configuration State Functions*): combinaciones lineales apropiadas de determinantes.

una combinación lineal de funciones de base u orbitales atómicos dentro de la aproximación MO-LCAO: $\psi_i(\vec{r}) = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \phi_{\mu}(\vec{r})$. En la práctica también truncamos esta expansión monoeléctronica. Ambos truncamientos constituyen la fuente de imprecisión más importante en los cálculos químico-cuánticos *ab initio*. La función $\phi_{\mu}(\vec{r})$ es una función de base (generalmente, una función contraída), y es a su vez combinación lineal de un conjunto de primitivas, $\phi_{\mu} = \sum_k g_k d_{k\mu}$. Obviamente, se podría obtener la solución exacta de la ecuación de Schrödinger si el conjunto de funciones de base fuese completo y si se consideraran todos los determinantes posibles que se pueden obtener a partir de todas las ocupaciones posibles de los correspondientes orbitales moleculares. La Ecuación 11 representa una expansión CI (*configuration interaction*). Con CI se optimizan variacionalmente los coeficientes de la expansión de la función de onda polielectronica, dados los orbitales HF; esto es, se construye la representación matricial del operador Hamiltoniano, que ha de ser diagonalizada para obtener la energía de correlación y los coeficientes de la expansión (siendo estacionaria la energía).

$$H = \begin{pmatrix} \langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle & 0 & \langle \Psi_0 | \hat{H} | D \rangle & 0 & 0 & \dots & \dots \\ & \langle S | \hat{H} | S \rangle & \langle S | \hat{H} | D \rangle & \langle S | \hat{H} | T \rangle & 0 & \dots & \dots \\ & & \langle D | \hat{H} | D \rangle & \langle D | \hat{H} | T \rangle & \dots & \dots & \dots \\ & & & \langle T | \hat{H} | T \rangle & \dots & \dots & \dots \\ & & & & \vdots & \vdots & \vdots \end{pmatrix}$$

La energía de correlación E_{corr} se define como $E_{corr} = \epsilon_0 - E_0$, siendo el minuendo el valor propio más bajo de la matriz Hamiltoniana (es la energía exacta no relativista del estado fundamental del sistema

dentro de la aproximación de Born-Oppenheimer), y el sustraendo es la energía HF, obtenidos ambos en el límite en que la base se aproxima a la completitud (se alcanzaría empleando un conjunto de base infinito).

Un cálculo *full-CI* (FCI) consiste en calcular la función de onda con todos los determinantes posibles de la función polielectrónica (*vide* Ecuación 11), empleando en la práctica un conjunto de funciones de base finito; obtenemos la solución exacta dentro del subespacio abarcado por dicho conjunto de base.

Por lo general, se suele tomar como estado de referencia, $|\Psi_0\rangle$, la configuración Hartree-Fock. De acuerdo con las reglas de Slater [177], sólo los determinantes que difieran en al menos dos orbitales tendrán un elemento matricial común no nulo. Esto resulta del hecho de que el operador Hamiltoniano no contiene más que operadores unipartícula y bipartícula, de ahí que se suele truncar la expansión CI de la Ecuación 11 a segundo orden, dando lugar al método CISD, que incluye excitaciones simples y dobles sobre $|\Psi_0\rangle$.

Según el número de configuraciones inicialmente consideradas, los diferentes métodos empleados en Química Cuántica se pueden clasificar en [183]:

- ✓ Métodos uniconfiguracionales. Normalmente están basados en una referencia Hartree-Fock, la cual determina los orbitales moleculares. Para el tratamiento de la correlación electrónica se utilizan técnicas CI, CC (*coupled-cluster*) o MP (*Møller-Plesset*), siendo esta última la técnica perturbativa más usual. En general, la aplicación de los mismos queda limitada al caso de que una sola función de referencia sea adecuada para la descripción del proceso químico en estudio (por ejemplo, una transición espectroscópica no se suele describir por una única excitación entre

orbitales, sino por muchas, y una sola función de referencia no sería adecuada).

- ✓ Métodos multiconfiguracionales. Parte de la correlación se incluye ya en la referencia (correlación estática, cuasidegeneraciones...), la cual suele ser una función MCSCF, y ésta determina los orbitales moleculares. Los efectos restantes de correlación electrónica se tratan mediante aproximaciones MRCI (*multi-reference CI*), MRCC (*multi-reference CC*) o MRPT (*multi-reference perturbation theory*). Su uso es imprescindible cuando se trata de estudiar sistemas en los que dos o más configuraciones son igualmente relevantes.

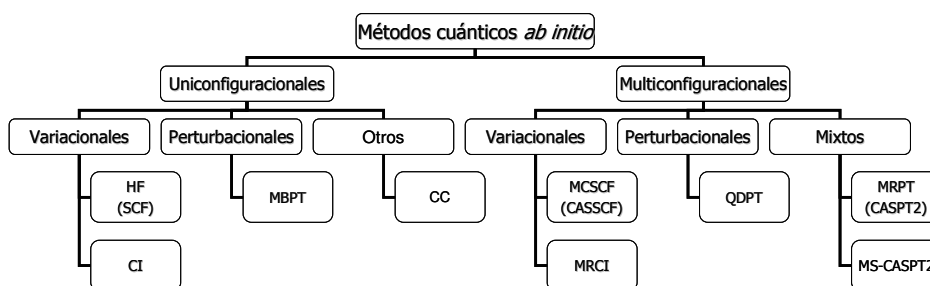


Figura 9. Métodos cuánticos *ab initio*.

Para el estudio teórico de estados excitados el protocolo **CASPT2//CASSCF** [173,183] ha demostrado una gran solvencia [187,188,189]. Partimos de una función de referencia **CASSCF** (*complete active space self-consistent field*) [190,191,192,193], que tiene la forma de la Ecuación 11 optimizándose simultáneamente los coeficientes de la expansión y los coeficientes de los orbitales moleculares, considerándose sus variaciones como rotaciones en un espacio vectorial ortonormalizado. Es un caso particular de los

métodos MCSCF. Se seleccionan unos orbitales y electrones “activos”, de importancia en el sistema químico, y se construye la función multiconfiguracional con todas las configuraciones posibles que pueden generarse con estos electrones y orbitales, teniendo el mismo espín y los mismos valores propios de simetría espacial que el estado tratado. En el espacio configuracional expandido por los orbitales activos, la función CASSCF es completa (se corresponde con un espacio FCI), constituyendo el espacio CAS-CI, en el cual los orbitales activos presentan una ocupación que varía entre 0 y 2. El resto de orbitales se denominan inactivos (doblemente ocupados) y secundarios (vacíos).

Con el método CASSCF introducimos la correlación estática debida a efectos de cuasidegeneraciones energéticas entre estados. El resto de la correlación, no incluida, se denomina correlación dinámica y tiene en cuenta interacciones electrónicas de corto alcance.

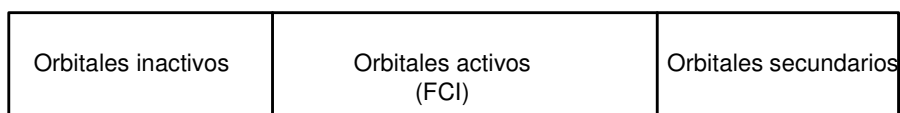


Figura 10. Método CASSCF.

Las técnicas concretas para llevar a cabo la optimización de los parámetros variacionales de la función MCSCF pueden ser de primer orden (basadas en el cálculo de la energía y de su primera derivada respecto de los parámetros variacionales) y de segundo orden (basadas en una expansión de la energía a segundo orden, considerándose las primeras y las segundas derivadas). La aproximación Newton-Raphson [11,173] de segundo orden, donde la energía se expande en serie de Taylor en los parámetros variacionales, es el método más prominente [183].

La energía CASSCF es invariante frente a rotaciones entre orbitales inactivos o entre orbitales secundarios. Los valores de energía obtenidos no son, en general, precisos, si bien esperamos mejores valores para los momentos de transición, que no resultan muy afectados por la correlación dinámica.

El cálculo MCSCF de estados excitados es muy complicado si el estado de interés no es el más bajo de su correspondiente representación irreducible. Para tratar muchos estados, el procedimiento más seguro es emplear la técnica **SA-CASSCF** (*State-Average CASSCF*). Se define un funcional de energía que

es promedio entre varios estados: $E_{promedio} = \sum_{i=1}^M \omega_i E_i$, donde ω_i son los factores

de peso relativo para cada estado. El resultado de un cálculo SA-CASSCF es un único conjunto de orbitales promedio y un número de funciones de onda CI igual al número de raíces usadas en el cálculo. Este tipo de cálculos permite evitar el problema del intercambio o salto de raíces (*root flipping*). Las funciones de onda obtenidas mediante un cálculo SA-CASSCF son ortogonales entre sí, mientras que las funciones obtenidas mediante cálculos CASSCF por separado no lo son. En este caso se dificulta el cálculo de los momentos de transición. Para tal fin se emplea el método **CASSI** (*CAS State Interaction*) [194], que emplea una transformación biortonormal para calcular estados de diferente simetría (y obtenidos, por consiguiente, en cálculos diferentes) con el mismo espacio activo.

Por otro lado, el método **RASSCF** (*restricted-active space self-consistent field*) [173], constituye una extensión del método CASSCF en el cual se adicionan al espacio activo dos nuevos subespacios en los que se restringe el número de huecos y partículas, optimizándose el conjunto de orbitales implicados. Entre los orbitales activos hay tres subespacios: RAS1, RAS2 y RAS3. En RAS1 tenemos orbitales con un número máximo de huecos definido por el usuario, en RAS2 tenemos el equivalente al espacio CAS-CI (con orbitales activos entre los que están permitidas todas las excitaciones posibles) y

en RAS3 tenemos orbitales con un número máximo de electrones definido por el usuario.

Orbitales inactivos	RAS1 (Huecos)	RAS2 (FCI)	RAS3 (Partículas)	Orbitales secundarios
---------------------	------------------	---------------	----------------------	-----------------------

Figura 11. Método RASSCF.

El método RASSCF permite incluir un mayor número de orbitales y electrones activos en la expansión multiconfiguracional. Se suele emplear para optimizar geometrías y para seleccionar un espacio activo adecuado para cálculos CASSCF posteriores.

Para recuperar la correlación dinámica empleamos el método **CASPT2** (*complete active space perturbation theory to second order*) [195,196,197]. Este método queda enmarcado dentro de una teoría de perturbaciones no degenerada convencional: se considera una sola función de referencia (de orden cero) que es multiconfiguracional (una función CASSCF). Se corrige la función de onda a primer orden y, por consiguiente, la energía a segundo orden.

El espacio configuracional en el cual la función de onda se expande puede dividirse en cuatro subespacios: V_0 (espacio unidimensional expandido por la función de referencia $|0\rangle$ del estado considerado); V_K (espacio ortogonal a $|0\rangle$ en el subespacio restringido *full CI* utilizado para generar la función CAS); V_{SD} (espacio formado por configuraciones simplemente y doblemente excitadas respecto a la función de referencia CASSCF) y $V_{TQ\dots}$ (espacio que contiene el resto de excitaciones de orden superior). El espacio de todas las funciones implicadas en la corrección de primer orden a la función de onda en la teoría de perturbaciones de Rayleigh-Schrödinger, que son aquéllas que interaccionan con la función de orden cero a través del Hamiltoniano, constituye el espacio de

interacción de primer orden (las funciones en el espacio V_{SD}). Debido a la naturaleza uni- y bipartícula del operador Hamiltoniano, $\hat{H} = \hat{H}_i + \hat{H}_{ij}$ (suma de operadores monoeléctricos y dielectrónicos), el espacio de interacción de primer orden consta de funciones generadas mediante uni- y biexcitaciones a partir de la función de onda de orden cero. A su vez, los orbitales se dividen en: congelados (doblemente ocupados; no se correlacionan ni aparecen explícitamente), inactivos (doblemente ocupados en la función de referencia), activos (con cualquier número de ocupación en la función de referencia) y secundarios (no ocupados en la función de referencia).

La función corregida a primer orden y normalizada viene dada por $|\Psi\rangle = C_0|0\rangle + C_1|1\rangle$, denominando $|1\rangle$ a la función de primer orden normalizada, y donde $C_0^2 + C_1^2 = 1$. El término C_0^2 corresponde al peso de la función de referencia CASSCF en la función $|\Psi\rangle$ y se utiliza como un criterio de calidad del tratamiento de perturbaciones realizado. El peso de la referencia debería ser cercano a la unidad, pero su valor depende del número de electrones correlacionados [183]. En la práctica, la descripción CASPT2 para los estados excitados debe tener, aproximadamente, el mismo peso que para el estado fundamental, como garantía de que el tratamiento perturbativo se ha llevado a cabo de forma equilibrada. Sin embargo, pueden aparecer estados intrusos, esto es, estados con un peso relativamente alto en la función de onda de primer orden, lo cual invalida el tratamiento perturbativo al no cumplirse que $\hat{H}' \lll \hat{H}$. Estos estados pertenecen al subespacio V_{SD} y tienen una energía de orden cero similar a la energía de referencia, E_0 . Cuando estos estados presentan una contribución a la energía de segundo orden mayor o igual a 0.1 *au* podemos incluir los orbitales implicados en estos estados en el espacio activo para tratarlos variacionalmente. Sin embargo, en el tratamiento de estados excitados el peso de la referencia puede ser bajo con respecto al estado fundamental, existiendo muchas contribuciones de poca importancia, de tal modo que hay

muchos orbitales responsables de la situación (estados intrusos que interaccionan débilmente con la referencia), y en este caso particular se puede emplear la técnica *level-shift* (LS-CASPT2) [198,199], que consiste en la adición de un parámetro de desplazamiento al Hamiltoniano de orden cero. Con objeto de evitar singularidades (puntos donde la función se hace infinita), se suele utilizar en la actualidad la técnica *imaginary level-shift* [200].

El método CASPT2 puede ser, según el espacio activo elegido, *size-consistent*, pero no es estrictamente *size-extensive*¹⁵ [173], aunque lo es en la práctica. La precisión esperable es de 0.1-0.3 eV. El método CASPT2 ha demostrado una reconocida solvencia en la elucidación de la espectroscopia de sistemas orgánicos e inorgánicos, incluidas muchas biomoléculas, con una relación calidad/coste computacional muy ventajosa [187,188,201,202,203,204].

Otros métodos complementarios a los *ab initio* en la Química Cuántica moderna son los basados en el DFT [183]. La aproximación clave es modelizar la correlación electrónica mediante funcionales generales de la densidad electrónica (densidad de probabilidad de encontrar un electrón en un punto del espacio multiplicada por el número de electrones), sin calcular una función de onda.

El DFT está basado en los teoremas de Hohenberg y Kohn [183,184]: (i) cualquier observable de un estado estacionario fundamental no degenerado puede ser calculado a partir de la densidad electrónica de este estado fundamental; esto es, cualquier observable puede escribirse como un funcional de la densidad electrónica del estado fundamental y (ii) la densidad electrónica de un estado fundamental no degenerado puede calcularse determinando aquella densidad que minimice la energía del estado fundamental. La formulación de Kohn-Sham establece que la ecuación a resolver es

$$\left(-\frac{1}{2}\nabla_i^2 + V_{eff}(\vec{r})\right)|\Psi_i\rangle = \varepsilon_i|\Psi_i\rangle, \text{ siendo la densidad } \rho(\vec{r}) = \sum_{i=1}^N |\Psi_i(\vec{r})|^2, \text{ y}$$

¹⁵ Que implica un correcto escalado, tal y como lo hace la energía, con el número de partículas.

$V_{eff}(\vec{r})$ es el potencial de un sistema de electrones no interaccionantes, de tal forma que la densidad construida a partir de los orbitales de Kohn-Sham es la misma que la densidad del sistema real.

El principal problema es que la expresión exacta que relaciona la energía con la densidad electrónica no es conocida, y es necesario recurrir a derivaciones aproximadas que contienen parámetros ajustables. Por ello proliferan los funcionales, como por ejemplo el funcional híbrido de Becke3-Lee-Yang-Parr (B3LYP) [205], donde se incluye parcialmente el intercambio exacto procedente de un cálculo HF. Ello implica que para sistemas en los que el DFT proporciona resultados erróneos no hay forma sistemática de mejorarlos (a diferencia de los métodos *ab initio*, en los cuales el problema suele radicar en el truncamiento de las expansiones mono- y polielectrónica).

La aproximación TD-DFT (*time-dependent density functional theory*) [184,206] incluye los efectos de las perturbaciones dependientes del tiempo y puede generalizarse para el cálculo de estados electrónicos excitados, aunque suele presentar errores importantes en situaciones en las que el estado fundamental no queda perfectamente definido por la función HF, como biradicales, intersecciones cónicas, disociaciones, o en estados de transferencia de carga, estados multiconfiguracionales o estados con gran acumulación de carga negativa.

Un método muy en boga en la actualidad es el método DFT/MRCI [207], que se basa en una expansión MRCI con funciones de onda multiconfiguracionales, utilizando orbitales de Kohn-Sham a la hora de construir las CSFs, y modificando los elementos matriciales del Hamiltoniano con parámetros empíricos.

1.3.3. Conjuntos de base monoeléctronica

Nuestro objetivo es representar los orbitales moleculares de la forma más exacta posible como combinación lineal de funciones matemáticas (aproximación MO-LCAO). La introducción de una base en los cálculos químico-cuánticos ha permitido que los métodos *ab initio* sean operativos [177,183]. Ello transforma los enormes problemas numéricos del método Hartree-Fock en un conjunto de ecuaciones algebraicas que se resuelven mediante técnicas matriciales, al transformarse las ecuaciones Hartree-Fock en las ecuaciones de Roothaan, $\underline{FC} = \underline{SC}\underline{\epsilon}$; son la transcripción de las ecuaciones HF cuando se ha definido una base de orbitales atómicos para expandir los orbitales espaciales [177,179].

Conjunto de base polielectronica

$$|\Phi\rangle = C_0|\Psi_0\rangle + \sum_{ra} C_a^r |\Psi_a^r\rangle + \sum_{a<b;r<s} C_{ab}^{rs} |\Psi_{ab}^{rs}\rangle + \dots$$

Conjunto de base monoeléctronica

$$|\Psi_i\rangle = |\chi_i \chi_j \dots \chi_N\rangle \quad \chi_i = \psi_i \bar{\omega} \quad |\bar{\omega} = \alpha, \beta$$

$$\psi_i(\vec{r}) = \sum_{\mu=1}^K C_{\mu i} \phi_{\mu}(\vec{r}) \quad \phi_{\mu}(\vec{r}) = \sum_K d_{K\mu} g_K$$

Figura 12. Expansión polielectronica (CI) y monoeléctronica (conjunto de base). La función de onda total, Φ , se expresa como combinación lineal de las funciones de onda polielectronicas Ψ_0, Ψ_a^r , etc... A su vez, cada una de estas funciones es un producto antisimetrizado y normalizado de espín-orbitales, χ_i . Cada espín orbital está constituido por una función de onda monoeléctronica, ψ_i , y una función de espín, $\bar{\omega}$. Cada función monoeléctronica es combinación lineal de una serie de funciones de base, ϕ_{μ} , que suelen ser funciones gaussianas contraídas, CGTFs, esto es, combinaciones lineales de un conjunto de funciones primitivas, g_K .

Las funciones gaussianas (GTFs, *Gaussian-Type Functions*, $g \propto e^{-\alpha \cdot r^2}$), son las funciones de base comúnmente empleadas [30,177]. Si bien no describen correctamente el comportamiento del electrón tanto cerca como lejos del núcleo, son muy eficientes desde el punto de vista computacional. Se puede mejorar su comportamiento empleando *funciones gaussianas contraídas* (CGTFs), que son combinaciones lineales de GTFs: $\phi_\mu = \sum_K d_{K\mu} g_K$, siendo $\{\phi_\mu\}$ el conjunto de funciones contraídas y $\{g_K\}$ el conjunto de primitivas normalizadas (PGTFs). El coeficiente de contracción es $d_{K\mu}$.

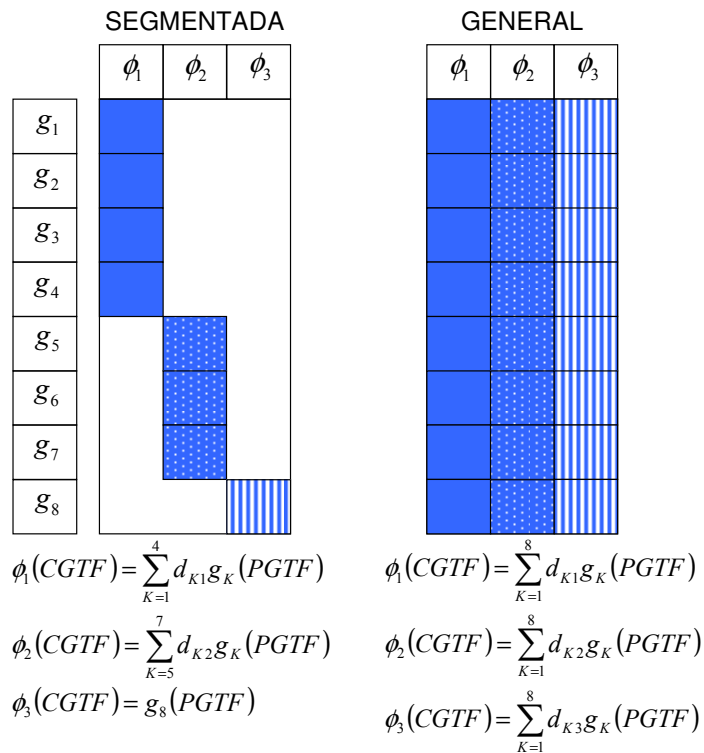


Figura 13. En la *contracción segmentada*, no todas las primitivas contribuyen a todas las funciones contraídas. En la *contracción general*, todas las funciones primitivas forman parte de todas las funciones contraídas, con lo que la base es más flexible y constituye un verdadero conjunto de orbitales atómicos.

Para construir un conjunto de CGTFs hemos de (i) optimizar las primitivas –seleccionar los exponentes variacionalmente- y (ii) optimizar los coeficientes de contracción. La *contracción* implica combinar el conjunto entero de funciones de base, PGTFs, y transformarlo en un pequeño conjunto de funciones formando combinaciones lineales fijas, cuyos coeficientes se escogen por medio de diferentes criterios [174,208].

Una vez hemos decidido qué tipo de función vamos a emplear (usualmente, una CGTF) y dónde va a estar localizada (la mayoría de las veces, en la posición del núcleo), queda por determinar el número de funciones que se va a emplear: una única función de base por orbital atómico ocupado (base mínima) o dos, tres... (conjuntos doble, triple...- ζ). Asimismo, podemos duplicar, triplicar..., las funciones de la capa de valencia, empleando una base mínima para el *core* (conjuntos *split-valence* como la base 6-31G). También podemos añadir funciones de polarización (gaussianas con un momento angular superior al de la capa de valencia, para describir los cambios que ocurren en la densidad electrónica de un átomo cuando entra a formar parte de una molécula; por ejemplo, la base 6-31G*).

En Química Cuántica se emplean principalmente tres tipos de funciones de base [209,210]: bases de Pople, bases *correlation-consistent* de Dunning y los ANOs. Las bases de Pople presentan contracción segmentada [177,211,212,213]. Se optimizan simultáneamente exponentes y coeficientes, lo que aumenta la flexibilidad, aunque se emplean métodos no correlacionados. Para tratar correctamente la correlación necesitamos como mínimo conjuntos de base de calidad doble- ζ de valencia o *split-valence* con funciones de polarización. Para estos cálculos, los requerimientos del conjunto de base son diferentes (y más exigentes), dado que debemos proveer un *espacio orbital virtual* capaz de recuperar una gran parte de la energía de correlación. Con frecuencia es suficiente correlacionar sólo los electrones de valencia. Para

cálculos que incluyan la correlación electrónica, se suelen emplear las bases de Dunning o los ANOs.

Las bases *correlation-consistent* (cc-pVXZ, donde X indica si son doble, triple...- ζ) son bases de contracción segmentada e incluyen funciones de polarización. Las bases *cc* emplean menos primitivas que los ANOs. Cada base contraída parte de un conjunto diferente de primitivas, y los exponentes de las funciones de polarización se optimizan mediante cálculos con correlación [211,212].

Los orbitales naturales atómicos (**ANOs**, *Atomic Natural Orbitals*) se optimizan con métodos que incluyen la correlación electrónica. Los orbitales naturales son las funciones propias de la matriz de densidad reducida de primer orden del sistema. Las bases de ANOs dan lugar a expansiones CI más rápidamente convergentes que cualquier otra base, y además permiten obtener una precisión dada con un menor número de configuraciones. El número de ocupación del orbital es una referencia de su importancia en la función de onda, por lo cual podemos adoptar este hecho como criterio discriminador. El esquema original [214,215] se centra en que los coeficientes de los ANOs obtenidos en un cálculo correlacionado del estado fundamental del átomo constituyen los coeficientes de las funciones de base, de acuerdo con un esquema de contracción general. Se simplifica enormemente el análisis de los orbitales moleculares, al corresponderse una función de base con un orbital atómico. Además, este método de obtención nos permite diseñar bases de cualquier tamaño con un único cálculo con el conjunto de primitivas y se obtienen directamente conjuntos contraídos de funciones de polarización. Dado que siempre usamos el mismo conjunto de primitivas para todas las contracciones, *un conjunto de base menor siempre es un subconjunto de un conjunto de base mayor*. Podemos, por tanto, aumentar nuestro conjunto de base, mejorarlo, sin cambiar de espacio vectorial. Una mejora del esquema original [216] se basa en incluir matrices correspondientes al estado fundamental del átomo, estado excitado, catión

monovalente, anión monovalente y presencia de campo eléctrico. Esta última matriz permite el tratamiento de la polarización de la nube electrónica (con lo que ya incluimos las funciones de polarización en el mismo diseño original del conjunto de base). Este promedio hace que sean bases muy válidas para cálculos moleculares al permitir el tratamiento equilibrado de diversos estados. Además, su extensión a problemas más complejos, en los que haga falta incorporar el efecto de otras estructuras, es muy sencillo, ya que basta con incluir en el promedio de matrices de densidad aquéllas que corresponden a los estados que deseamos considerar.

Un error que aparece en cálculos químico-cuánticos de dímeros y agregados moleculares es el BSSE (*basis set superposition error*) [211]: si la base de un átomo es variacionalmente deficiente en zonas internas, un método variacional recupera mucha energía corrigiendo esa zona deficiente con las bases de los átomos vecinos, con lo que se acortan las distancias de enlace y aumentan las energías de enlace. La supermolécula posee una base más extensa que los monómeros por separado, y como consecuencia se altera la hipersuperficie de energía potencial. El método de corrección del BSSE más popular es el de *counterpoise* [217,218], que sigue un esquema de compensación de error que asume que el BSSE se minimiza si la energía de las moléculas interaccionantes se determina mediante el uso de todas las funciones de base disponibles en el complejo molecular. De esta forma, la energía de interacción se calcula como la diferencia entre la energía del complejo y las de los fragmentos, calculándose estas últimas con el conjunto de base ampliado resultante de incluir para cada fragmento las funciones de base del resto de monómeros sin núcleos ni electrones (*ghost functions*).

1.4. Espectroscopia Molecular

1.4.1. Consideraciones generales

La Espectroscopia es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. El análisis espectroscópico puede cristalizar en información muy útil acerca de la materia irradiada, y es una herramienta habitual y muy útil en todas las ramas de la Química [64,163,219,220,221,222,223,224,225,226,227]. La comprensión de los fenómenos espectroscópicos aplicados a la Química, explicados mediante la teoría de orbitales moleculares [228], ha permitido que en la actualidad disfrutemos de la gran cantidad de técnicas y aplicaciones que constituye la Espectroscopia Molecular. En esta Tesis Doctoral nos limitaremos al análisis de procesos monofotónicos empleando métodos químico-cuánticos [188,189,229].

Considerando un cierto número de niveles de energía molecular cuantizada, para pasar de un nivel menos energético a otro con mayor energía se requiere un aporte de energía externo, que puede llegar a través de la interacción con una radiación electromagnética de la adecuada frecuencia. Si el sistema ha de pasar de un estado con mayor energía a otro con menor energía, se emite la energía sobrante, en principio, como una radiación de frecuencia determinada por la misma condición. La diferencia de energía entre dos estados cumple la relación $\Delta E = h \cdot \nu$ (condición de resonancia). El estado de energía más bajo de un átomo o molécula es su estado fundamental (el más estable). Los estados de energía superiores se denominan estados excitados. Un sistema físico en un estado excitado puede disipar ese exceso de energía por tres tipos de procesos que, en general, no son mutuamente excluyentes: una transición radiativa, que transcurre con emisión de luz; una transición no radiativa entre diferentes

estados de la molécula, de forma que la energía se disipa en forma de calor, o de una molécula a otra (*quenching*); y, finalmente, una reacción química.

Al analizar los estados, ciñéndonos al modelo orbital, es imprescindible estudiar las transiciones entre orbitales que dan lugar a dichos estados. Los orbitales se pueden clasificar en *core*, *valencia* y *Rydberg*. A su vez, los orbitales de valencia pueden ser enlazantes y antienlazantes (deslocalizados por toda la molécula), o pares solitarios localizados en un átomo [183,219,228]. Mientras que un estado excitado de valencia se puede entender como una promoción de un electrón de un orbital molecular ocupado de la molécula a un orbital molecular virtual de la misma molécula, el estado Rydberg es el resultado de excitar un electrón desde un orbital ocupado de la molécula y situarlo en un orbital de carácter puramente atómico, de número cuántico n creciente, cuya naturaleza difusa sitúa la carga lejos del resto de los electrones de la molécula, de tal forma que el electrón en el orbital Rydberg “sentirá” a la molécula como un catión que actúa como una carga puntual. También existen los llamados estados de transferencia de carga [206], en los que un electrón en un orbital molecular ocupado de una molécula es transferido a un orbital molecular virtual de otra molécula distinta (o de la misma si es intramolecular).

Según el rango de energías considerado las zonas del espectro reciben diferentes denominaciones:



Figura 14. Espectro electromagnético.

Tabla I. Regiones del espectro de interés químico y fenómenos moleculares asociados.

Zona	Fenómeno molecular	Energía (eV)	Longitud de onda
Rayos X	Excitación de electrones internos	120 eV – 240 keV	10 nm – 6×10^{-3} nm
Ultravioleta-Visible (UV-VIS)	Redistribución de electrones externos (transición electrónica)	UV: 3.2 – 120 VIS: 1.7 – 3.2	UV: 390 nm – 10 nm VIS: 780 nm – 390 nm
Infrarrojo (IR)	Cambio de configuración (transición vibracional)	10^{-3} – 1.7	1 mm – 780 nm
Microondas (MO)	Cambio de orientación (transición rotacional)	4×10^{-5} – 10^{-3}	30 cm – 1 mm

Al estudiar la interacción radiación-materia emplearemos un tratamiento semiclásico, en el cual la materia se trata cuánticamente (con niveles rotacionales, vibracionales y electrónicos), mientras que la radiación electromagnética se trata clásicamente como una onda. Cada estado electrónico engloba distintos estados vibracionales, más próximos en energía y asociados a la energía de las vibraciones interatómicas. Y cada estado vibracional, a su vez, engloba distintos estados rotacionales, lógicamente aún más próximos en energía unos de otros, que provienen de la rotación de las moléculas alrededor de sus centros de gravedad. Al interactuar la radiación con la materia, los cuantos de energía se distribuyen entre los distintos grados de libertad o movimientos que ésta posee (traslacionales, rotacionales, vibracionales, electrónicos y nucleares, citados en orden de energía creciente) [230].

Debido a las cargas parciales de los átomos generadas por diferencias de electronegatividad, muchas moléculas son polares, lo que implica que tienen un momento dipolar eléctrico no nulo. Un dipolo eléctrico está formado por dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ separadas una distancia r . Esta distribución de cargas se representa mediante un vector, el **momento dipolar eléctrico**, $\vec{d} = q \cdot \vec{r}$, dirigido por convenio desde la carga negativa a la positiva.

En el tratamiento semiclásico [64,219,220] la emisión y la absorción se deben a la existencia de un potencial dependiente de la interacción entre la molécula (en primera aproximación, por su vector dipolo eléctrico \vec{d}) y la radiación electromagnética (por su vector campo eléctrico \vec{E}): $U = -\vec{d} \cdot \vec{E}$. Ambos vectores oscilan en el tiempo y en el espacio. Este potencial estacionario campo-dipolo se considera, desde el punto de vista cuántico, como una perturbación ($\hat{H}'(t) = -\hat{d}\vec{E}(t)$). Si las dos magnitudes tienen la misma frecuencia, la transferencia de energía entre ambas es máxima (resonancia) [16,17] y la amplitud aumenta drásticamente (la energía es directamente proporcional al cuadrado de la amplitud). Podemos definir el operador dipolo eléctrico como: $\hat{d} = \vec{i}\hat{d}_x + \vec{j}\hat{d}_y + \vec{k}\hat{d}_z$, siendo cada componente igual a la suma de los productos de la carga por la componente cartesiana correspondiente ($A = x, y, z$): $\hat{d}_A = \sum_i q_i A_i$.

La intensidad de banda es proporcional a la probabilidad por unidad de tiempo de que tenga lugar una transición entre dos estados determinados. Definimos así el momento dipolar de transición d_{mn} entre los estados n y m , cuyo cuadrado estima la probabilidad de la transición (proporcional a la intensidad de la banda) $n \rightarrow m$:

$$d_{mn} = \langle \Psi_m | \hat{d} | \Psi_n \rangle \equiv TDM$$

Ecuación 12

Es decir, la intensidad o probabilidad de transición $|n\rangle \rightarrow |m\rangle$ es proporcional al cuadrado del elemento de la matriz de transición $\langle m | \hat{d} | n \rangle^2$ (*Regla de Oro de Fermi*). Si el momento dipolar de transición es cero, la transición monofotónica está formalmente prohibida. Por tanto, encontrar las condiciones que hacen estos elementos matriciales distintos de cero es equivalente a definir las reglas de selección para las transiciones. Así, un valor nulo de la integral $\int \psi_m^* \hat{d}_{el} \psi_n d\tau_{el}$, lo cual se puede predecir mediante la Teoría de Grupos [219,221,231,232,233,234], representa una transición prohibida por dipolo eléctrico. La transición es permitida si y sólo si el producto directo de las representaciones irreducibles de los componentes, $\Gamma(\psi_m) \otimes \Gamma(\hat{d}_{el}) \otimes \Gamma(\psi_n)$, es igual a la representación irreducible totalmente simétrica del grupo puntual al cual pertenece la molécula. Esto sólo puede ocurrir si el producto directo de las representaciones de dos funciones del integrando es igual, o contiene, a la representación de la tercera función [64]. Además, dado que el momento dipolar es un vector, bastará con ver qué componente del resultado del producto directo es la representación totalmente simétrica para determinar si esa transición estará polarizada en el eje x , y o z [221]. En una molécula plana (grupo puntual C_s), que esté en el plano XY , las transiciones permitidas serán aquellas en las que el producto directo definido anteriormente sea igual a A' . En este caso, las luces x -polarizada e y -polarizada pertenecen a la representación A' , mientras que la luz z -polarizada pertenece a la representación A'' .

Por tanto, se cumple que:

$$(A') \otimes \begin{pmatrix} A' \\ A'' \end{pmatrix} \otimes (A') = \begin{pmatrix} A' \\ A'' \end{pmatrix} \quad (A') \otimes \begin{pmatrix} A' \\ A'' \end{pmatrix} \otimes (A'') = \begin{pmatrix} A' \\ A'' \end{pmatrix}$$

Es decir, si excitamos desde el estado fundamental A' los estados accesibles son A' en el caso de luz x -polarizada o y -polarizada, mientras que son A'' en el caso de luz z -polarizada.

Por otro lado, el momento dipolar se define como $\hat{d}_n = \langle \psi_n | \vec{d} | \psi_n \rangle$. Interesa la dirección tanto del momento dipolar (indica la distribución de carga en la molécula en el estado considerado) como del momento dipolar de transición (indica la polarización de la transición espectroscópica, esto es, la dirección de desplazamiento de la carga a causa de la excitación).

Las transiciones prohibidas sí que pueden observarse experimentalmente en ciertas condiciones (aunque suelen ser débiles). Esto es debido a que al definir las reglas de selección estamos haciendo uso de diversas aproximaciones, bien en la resolución de la ecuación de Schrödinger, bien en el tratamiento de la interacción radiación-materia. Verbigracia: en una molécula pueden existir otros tipos de redes de cargas puntuales aparte de los dipolos, como cuadrupolos y octupolos (un multipolo de orden n es una red de cargas puntuales con un momento n -polar, pero sin un momento inferior). De este modo existen transiciones de cuadrupolo eléctrico, mucho más débiles que las de dipolo eléctrico porque, a diferencia de éste, no dependen intrínsecamente del campo eléctrico, sino de la variación del campo a lo largo de toda la extensión de la molécula; al ser ésta mucho menor que la longitud de onda, la variación del campo es muy leve.

De acuerdo con las reglas de selección para transiciones electrónicas entre los estados del sistema [219], y si se cumple la aproximación de Born-Oppenheimer, el TDM es proporcional a la magnitud del solapamiento entre los

estados vibracionales de los correspondientes estados electrónicos fundamental y excitado, $\langle v_m | v_n \rangle$, lo que se conoce como *Principio de Franck-Condon*.

Formalmente, el momento dipolar de transición cumple que $TDM = \langle \Psi_m(q, Q) | \hat{d}_{el} + \hat{d}_N | \Psi_n(q, Q) \rangle$, siendo q las coordenadas electrónicas y Q las coordenadas nucleares, y su expresión mediante expansión en serie de Taylor en torno al punto Q_0 es conocida como *expansión Herzberg-Teller*:

$$TDM = TDM(Q_0) \langle v_m(Q) | v_n(Q) \rangle + \sum_k \left(\frac{\partial TDM(Q)}{\partial Q_k} \right)_{Q_0} \langle v_m(Q) | Q_k | v_n(Q) \rangle + \dots$$

Ecuación 13

siendo habitual truncar la expansión en el primer término (aproximación de Condon) cuando calculamos el momento dipolar de transición. Cuando este término es nulo, el resto de coeficientes del desarrollo cobra importancia y pueden calcularse intensidades de bandas prohibidas. Esta aproximación es válida mientras lo sea la aproximación de Born-Oppenheimer. Si no se cumple dicha aproximación, surge el fenómeno de acoplamiento vibrónico [235] entre estados electrónicos, lo cual implica que un nivel vibracional dado de un estado electrónico puede mezclarse con niveles vibracionales de estados electrónicos de más alta energía, lo que da lugar a otras aproximaciones [236].

Asimismo, también existe el acoplamiento espín-órbita que permite, por ejemplo, explicar los fenómenos de la fosforescencia y del cruce entre sistemas. Por último, hay que señalar que hemos considerado la interacción de la molécula con la componente eléctrica de la radiación, pero también hay interacción con la componente magnética (aunque es más débil porque $|\vec{B}| = |\vec{E}|/c$). De esta forma, se infiere que pueden existir transiciones de dipolo magnético, si bien serán mucho más débiles que las de dipolo eléctrico.

Una vez explicado cómo interacciona la luz con la materia, hay que destacar que existen tres formas de interacción:

- ✓ *Absorción:* $A + h\nu \rightarrow A^* \rightarrow$ la molécula absorbe un fotón y pasa a un estado excitado.
- ✓ *Emisión estimulada:* $A^* + h\nu \rightarrow A + 2h\nu \rightarrow$ la molécula, en estado excitado, absorbe un fotón y como consecuencia emite dos fotones.
- ✓ *Emisión espontánea:* $A^* \rightarrow A + h\nu \rightarrow$ la molécula, en estado excitado, emite un fotón sin intervención previa de la radiación.

La absorción y la emisión estimulada se derivan del tratamiento semiclásico de la interacción y de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo [219], mientras que para explicar la emisión espontánea hemos de recurrir a la Electrodinámica Cuántica. La forma más habitual de tratar la interacción radiación-materia es considerar la luz como una perturbación, $\hat{H}'(t)$, del sistema en estado fundamental. Partimos de un átomo o molécula en estado estacionario y con una energía definida, cuyo Hamiltoniano es \hat{H}^0 , que se expone a la radiación electromagnética durante un tiempo limitado, y después se encuentra en algún otro estado estacionario. Durante el intervalo de tiempo en el que actúa la perturbación tenemos que la ecuación a resolver para caracterizar los fenómenos espectroscópicos es:

$$\frac{i\hbar}{2\pi} \frac{\partial \Psi}{\partial t} = [\hat{H}^0 + \hat{H}'(t)]\Psi$$

Ecuación 14

Siguiendo este razonamiento, se llega a que en un sistema en el que la materia y la radiación están en equilibrio, la probabilidad de transición desde el estado $|n\rangle$ al estado $|m\rangle$ es proporcional al número de moléculas que se hallan en el estado $|n\rangle$ y al número de fotones con frecuencia ν_{mn} , y viene dada por el coeficiente de Einstein para la absorción:

$$B_{n \rightarrow m} = \left(\frac{8\pi^3}{3h^2} \right) |\langle m | \hat{d} | n \rangle|^2$$

Ecuación 15

Por otro lado, la probabilidad de emisión espontánea desde m hasta n es independiente de la presencia o no de radiación; por tanto, es proporcional al número de moléculas en el estado superior y a un nuevo coeficiente, A_{mn} (coeficiente de Einstein para la emisión espontánea).

Los estados excitados de una molécula, fruto de estas transiciones, se pueden etiquetar de forma enumerativa por orden creciente de energía según la multiplicidad de espín (singlete, S , y triplete, T). Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética (ABS) puebla mayoritariamente un estado excitado de la misma multiplicidad que el estado fundamental (por ejemplo, singlete). En realidad, pasa a un estado vibracional excitado de un estado electrónico excitado.

A continuación, se desexcita no radiativamente, emitiendo calor, mediante relajación vibracional intramolecular (IVR, *intramolecular vibrational relaxation*) hacia la conformación de menor energía potencial del estado electrónico excitado. Seguidamente pasa a otro estado electrónico excitado mediante conversión interna no radiativa (IC, *internal conversion*), y así hasta llegar al primer estado excitado singlete, S_1 . A partir de este punto, la molécula puede emitir radiación (fluorescencia, F) y regresar al estado fundamental. Por otro lado, también es posible que se produzca una transición no radiativa entre

estados electrónicos de diferente multiplicidad o cruce entre sistemas (ISC, *intersystem-crossing*). Por conversión interna la molécula llega al primer estado excitado triplete, T_1 , y desde ese estado la molécula puede emitir radiación (fosforescencia, P).

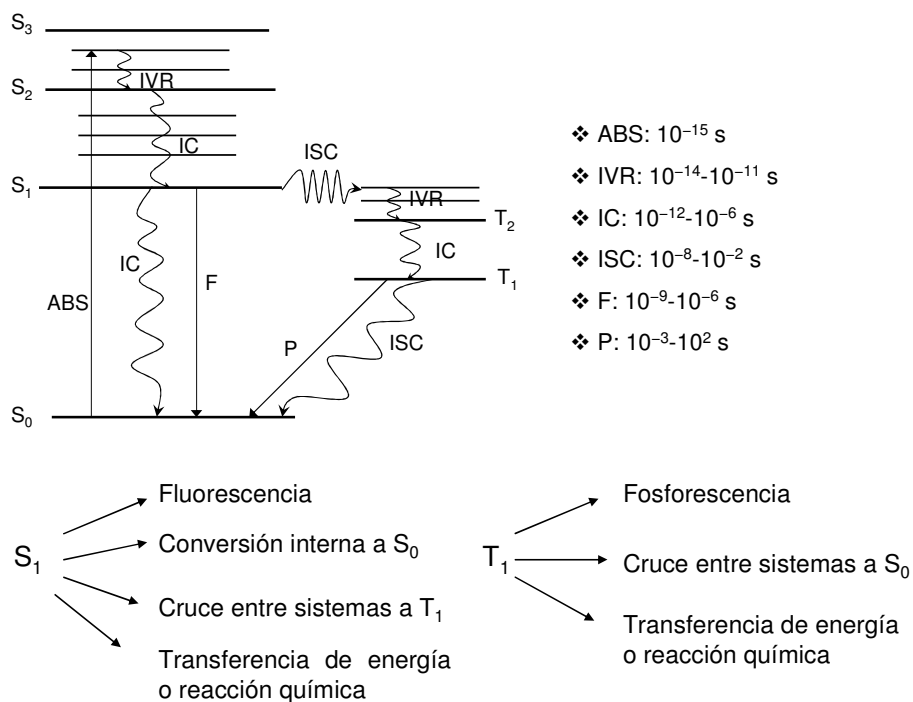


Figura 15. Diagrama de Jablonski, tiempos de vida comunes de los procesos fotofísicos y posibles caminos de desexcitación del primer estado excitado singlete y triplete.

Las transiciones entre estados de diferente multiplicidad violan una de las reglas de selección de dipolo eléctrico dentro de una aproximación no relativista, por lo que hemos de recurrir a correcciones relativistas para explicar su existencia, como el acoplamiento espín-órbita.

El acoplamiento espín-órbita (SOC, *spin-orbit coupling*) se produce por el acoplamiento entre el momento angular orbital \vec{L} y el momento angular de

espín \vec{S} , cuyas representaciones vectoriales realizan un movimiento de precesión alrededor de su resultante \vec{J} (momento angular total) [30]. Dicho acoplamiento, que se debe al hecho de que la energía de un electrón depende del momento angular orbital y de su momento magnético, permite el cruce entre los grados de libertad en los dominios del momento angular orbital y del momento angular de espín. En virtud de este acoplamiento, algo del carácter de espín triplete es “traspasado” a un estado puro de espín singlete, y viceversa. Para cualquier cambio neto en el momento angular de espín en una transición, se produce un cambio en el momento angular orbital de tal forma que el momento angular total del sistema se conserva. El hecho de que una perturbación como el acoplamiento espín-órbita provoque la mezcla de dos estados que de otro modo son independientes es la causa de la transición entre singletes y tripletes: mezclando algo del carácter de espín triplete en un estado singlete dado S_i , y mezclando algo del carácter de espín singlete en un estado triplete dado T_i , la transición $S_i \rightarrow T_i$, formalmente prohibida en el sistema sin perturbar, se convierte en una transición más probable.

La descripción mecano-cuántica de la interacción espín-órbita es: $\hat{H}_{SO} = \hat{H}_i + \hat{H}_{ij} + \hat{H}^{\xi}$ [30], donde el Hamiltoniano se expresa como suma de operadores monoeléctricos, dielectrónicos (de repulsión interelectrónica) y espín-órbita. La longitud del vector de acoplamiento espín-órbita entre un estado singlete y uno triplete se calcula como:

$$SOC_{lk} = \sqrt{\sum_{\mu} |\langle T_{l,\mu} | \hat{H}_{SO} | S_k \rangle|^2} \quad | \quad u = x, y, z$$

Ecuación 16

Como hemos visto en el diagrama de Jablonski, un proceso de desactivación posible es un cruce entre sistemas (ISC) entre estados de diferente

multiplicidad. En general, la eficiencia de un proceso ISC es discutida en términos de la interacción entre niveles vibracionales de energía de las dos hipersuperficies de energía potencial implicadas en un proceso dado, empleando la Regla de Oro de Fermi:

$$k_{NR(i \rightarrow f)} = \frac{2\pi}{\hbar} \langle \psi_i | \hat{H} | \psi_j \rangle^2 \rho_E$$

Ecuación 17

donde $k_{NR(i \rightarrow f)}$ es la constante cinética de la transición no radiativa desde un estado inicial i hasta un estado final f , cuyas funciones de onda son respectivamente ψ_i y ψ_f , y ρ_E es la densidad de estados vibracionales en el estado electrónico final (número de estados cuya energía se encuentra entre E y $E + dE$).

Los estados electrónicos excitados del sistema dan lugar a una superposición de bandas que caracterizan el espectro de absorción. Centrándonos en la parte electrónica únicamente, en cada uno de ellos el rango de energías absorbidas oscila aproximadamente entre la obtenida como diferencia entre el estado fundamental relajado de la molécula y el estado excitado a la misma geometría (transición vertical o Franck-Condon) y la diferencia entre el primero y el estado excitado relajado (transición adiabática u origen de banda).

El origen de banda vibracional se define como $T_0 = T_e + ZVE$, y es comparable con el dato experimental. El origen de banda electrónico, T_e , se calcula como la diferencia de energía entre los mínimos de las dos hipersuperficies de energía potencial, correspondientes al estado fundamental y al estado excitado, mientras que el origen de banda vibracional T_0 corresponde a la diferencia de energía entre los niveles vibracionales más bajos de ambas hipersuperficies. Por ello incluimos el *ZVE* (*Zero-point Vibrational Energy*) o

corrección de punto cero, la cual se estima empleando el modelo físico del oscilador armónico.

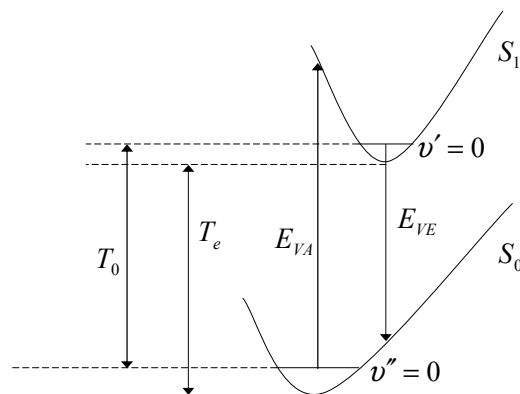


Figura 16. Energías verticales y orígenes de banda. Estados vibracionales representados por la letra ν .

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Energía de absorción vertical:</u>
$E_{VA} = E_{S_1}(S_0) - E_{S_0}(S_0)$ | <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Origen de banda de fluorescencia:</u>
$T_e^F = E_{S_1}(S_1) - E_{S_0}(S_0)$ |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Energía de emisión vertical:</u>
$E_{VE} = E_{S_1}(S_1) - E_{S_0}(S_1)$ | <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Origen de banda de fosforescencia:</u>
$T_e^P = E_{T_1}(T_1) - E_{S_0}(S_0)$ |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Fuerza de oscilador:</u>
$f = (2/3)E_{VA}TDM^2$ | <ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Tiempo de vida radiativo:</u>
$(1/\tau_{rad}) = 2.142005 \cdot 10^{10} TDM^2 T_e^3$ |

Figura 17. Parámetros espectroscópicos básicos (entre paréntesis figura la geometría optimizada a la cual se realiza el cálculo).

Además de la energía de los estados, interesa la probabilidad de transición. Estados con la misma multiplicidad de espín que el fundamental tienen una mayor probabilidad para absorber fotones, ya que en espectroscopia electrónica las transiciones permitidas son aquellas que cumplen que $\Delta S = 0$. La

magnitud que mide dicha probabilidad es la fuerza de oscilador de la transición espectroscópica, que se calcula [64,219] como: $f = \left(\frac{8\pi^2 \nu_{mn} m_e}{3he^2} \right) \left| \langle \Psi_m | \hat{d} | \Psi_n \rangle \right|^2$.

El origen de banda puede relacionarse con el tiempo de radiación, τ_{rad} , a través de la aproximación de Strickler-Berg [237,238], que define el coeficiente de Einstein de emisión espontánea, A_{21} , como:

$$A_{21} = \frac{1}{\tau_{rad}} = 2.142005 \cdot 10^{10} T_e^3 TDM_{1 \rightarrow 2}^2$$

Ecuación 18

siendo T_e el origen de banda (en realidad, en la aproximación se considera E_{VE}), y TDM el momento dipolar de transición.

La mayoría de las aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos se basan en transiciones de los electrones n y π al estado excitado π^* . Las transiciones $\pi\pi^*$ suelen ser más intensas, ya que los orbitales π solapan mejor entre sí. Respecto a las transiciones $n\pi^*$, suelen presentar un momento dipolar más bajo, por lo que en disolventes polares se desestabilizan y se sitúan a mayor energía (desplazamiento hipsocrómico o hacia el azul), al contrario que las transiciones $\pi\pi^*$, que se estabilizan (desplazamiento batocrómico o hacia el rojo) [163].

Los procesos fotofísicos conllevarán, en muchas ocasiones, un cambio químico, lo que entra en el dominio de la Fotoquímica [161,162]. Los fotones incidentes son absorbidos por el estado electrónico fundamental de la molécula para dar lugar al sistema excitado o a un radical libre. El rendimiento cuántico, Φ_x , cuantifica cualquier reacción fotoquímica, y es el cociente entre los moles de reactivo consumidos y los moles de fotones absorbidos. Si estas cantidades se expresan por unidad de volumen y tiempo, el numerador se convierte en la

velocidad de reacción ν , y el denominador en la intensidad de radiación absorbida I_{abs} , de tal modo que $\Phi_x = (\nu/I_{abs})$. Hay sustancias amortiguadoras que desactivan las moléculas excitadas (*vide* Figura 15) y, como consecuencia, disminuye la intensidad de emisión. Los reactivos, cuando se excitan, se pueden desactivar por procesos no radiativos (conversión interna o cruce entre sistemas, genéricamente NR), por procesos radiativos (fluorescencia o fosforescencia, genéricamente R) o por amortiguación o *quenching* (Q), incluyendo la *transferencia de energía*.

Tabla II. Cinética fotoquímica elemental.

Proceso	Velocidad
Activación: $S_0 + h\nu \rightarrow S^*$	I_{abs}^{16}
Proceso no radiativo: $S^* \rightarrow S_0$	$k_{NR}[S^*]$
Proceso radiativo: $S^* \rightarrow S_0 + h\nu$	$k_R[S^*]$
Amortiguación: $S^* + Q \rightarrow S_0 + Q^*$	$k_Q[S^*][Q]$

¹⁶ Velocidad a la que son absorbidos los fotones de una frecuencia adecuada dividida por el volumen en el que tiene lugar el proceso de absorción.

1.4.2. Espectroscopia electrónica

La absorción de energía radiante desde el estado fundamental se invierte en cambiar la distribución de carga de la molécula mediante la excitación o reubicación de sus electrones; los núcleos responden a esta redistribución cambiando sus movimientos vibracionales y rotacionales. Así pues, toda transición electrónica lleva pareja un conjunto de transiciones correspondientes a los estados vibracionales y rotacionales de la molécula. La molécula en estado excitado puede ser más proclive a reaccionar, especialmente en el caso de excitaciones electrónicas: las energías son del orden de las energías de enlace y de las energías de activación de muchas reacciones y, además, la redistribución electrónica puede intensificar las propiedades nucleofílicas o electrofílicas de la molécula.

Existen varias notaciones posibles para los estados electrónicos (Mulliken, Platt, Kasha, a partir de la teoría de grupos, enumerativa...). De todas ellas, las más útiles, en mi opinión, son la enumerativa ($S_0 \rightarrow S_1$), que ordena los estados por orden energético y multiplicidad de espín (S : singlete; T : triplete); y la basada en la teoría de grupos (${}^1A_{1g} \rightarrow {}^1B_{1u}$): los operadores de simetría de una molécula conmutan con el Hamiltoniano¹⁷, luego los estados electrónicos de dicha molécula pueden clasificarse de acuerdo con el comportamiento de la función de onda electrónica cuando aplicamos estos operadores [219,223]. Para una molécula dada, los orbitales que participan en las diferentes configuraciones pueden ser caracterizados como pertenecientes a una representación irreducible del grupo puntual de la molécula y la simetría espacial de una configuración determinada se halla mediante el producto directo de las simetrías de los orbitales. El estado fundamental de la mayoría de las moléculas cuya estructura electrónica es de capa cerrada (sin electrones desapareados) pertenece a la

¹⁷ Dado que un operador de simetría deja la molécula en una configuración indistinguible de la inicial, ambas configuraciones, inicial y final, tendrán la misma energía.

representación irreducible totalmente simétrica, así que los orbitales doblemente ocupados no nos interesan para determinar la simetría espacial, sino que son los orbitales ocupados por un solo electrón los que hay que analizar. El símbolo de simetría caracteriza el estado. Además, se añade un superíndice a la izquierda indicando la multiplicidad de espín ($2S + 1$) del estado.

Para una molécula con N átomos tenemos que especificar $3N$ coordenadas, que son los grados de libertad de la molécula. Para definir el movimiento molecular tenemos que tener en cuenta la traslación del centro de masas de la molécula (se requieren tres grados de libertad), la rotación alrededor del centro de masas (se requieren dos o tres grados de libertad, según si la molécula es o no lineal, respectivamente), y los restantes $3N - 6$ grados de libertad (caso no lineal) representan el número de vibraciones posibles en la molécula o *modos normales de vibración*. Todos estos movimientos están descritos en la correspondiente Tabla de Caracteres o se pueden deducir a partir de la misma y de la Simetría.

Por lo que respecta a la evolución de los procesos espectroscópicos, la Fotofísica y la Fotoquímica modernas están basadas en el estudio de las relaciones entre las superficies de energía potencial (PES, *potential energy surface*) de los estados implicados en un proceso determinado [229,230,239]. Por tanto, podemos decir que la hipersuperficie de energía potencial es el terreno de juego donde tienen lugar los procesos físicos y químicos.

Existen dos tipos de puntos estacionarios (las derivadas primeras de la energía respecto a las coordenadas –vector gradiente- son todas nulas) esenciales en la PES. Por un lado, tenemos los mínimos relativos correspondientes a reactivos (R) y productos (P), de los cuales el sistema no puede salir sin aporte externo de energía. En un mínimo, al diagonalizar la matriz de derivadas segundas de la energía (Hessiano), obtenemos todos los valores propios positivos. Por otro lado, tenemos una estructura que es un máximo en una dirección (la que corresponde al camino de reacción $R \rightarrow P$), pero es un mínimo

en la dirección perpendicular a ésta. Su topología recuerda a una silla de montar: es un punto de silla de primer orden (*saddle-point*), y químicamente se relaciona con el estado de transición (TS, *transition state*) de la reacción. Además, tenemos puntos de cruce entre hipersuperficies (intersecciones cónicas y cruces singlete-triplete).

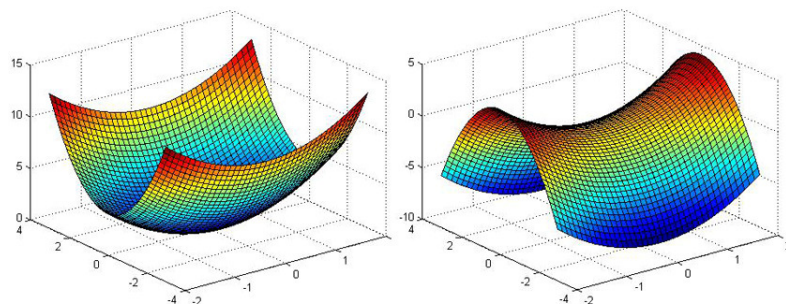


Figura 18. Mínimo (izquierda) y punto de silla (derecha) en una hipersuperficie de potencial.

En el caso de procesos de optimización para hallar las geometrías de equilibrio en cada estado electrónico (mínimos), hemos de localizar dichos puntos estacionarios mediante procedimientos numéricos (el problema equivale a minimizar una función de N dimensiones), dado que no tenemos una forma analítica de la PES debido a su elevado número de dimensiones ($3N$ coordenadas cartesianas o $3N-6$ coordenadas internas para un sistema molecular constituido por N átomos).

Para estudiar los procesos fotofísicos y fotoquímicos desde un punto de vista teórico, se requiere conocer la topología de las superficies de energía potencial implicadas, es decir, la posición de sus puntos singulares, y el camino más favorable entre dichos puntos y sus regiones cercanas. Dentro del panorama fotoquímico se puede distinguir, atendiendo al número y naturaleza de las hipersuperficies implicadas, dos tipos fundamentales de esquemas básicos:

fotoquímica no adiabática (la reacción tiene lugar en dos o más hipersuperficies) y fotoquímica adiabática (la reacción tiene lugar en una única hipersuperficie).

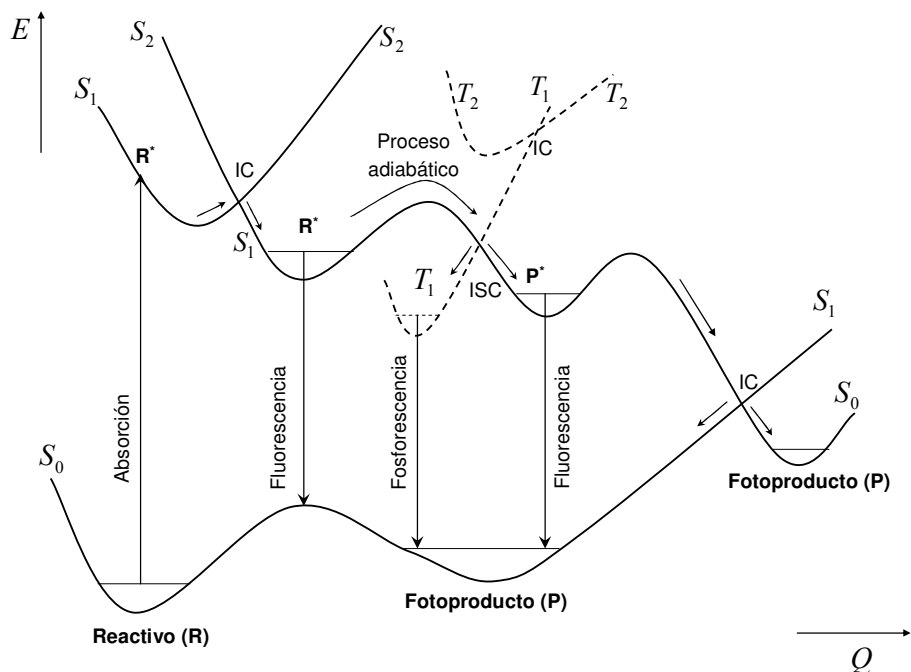


Figura 19. Esquema de los procesos moleculares fotofísicos y fotoquímicos más relevantes.

Las funciones de onda de los estados adiabáticos diagonalizan el Hamiltoniano electrónico (*i.e.*, son funciones propias de \hat{H}_{el}) y gobiernan el movimiento nuclear si éste es suficientemente lento. En cambio, para describir movimientos rápidos sobre las PES es conveniente trabajar con superficies que no diagonalicen el Hamiltoniano electrónico y, por tanto, puedan cruzarse, es decir, estados diabáticos [239] descritos por funciones de onda cuya naturaleza apenas cambia en el cruce. El camino de reacción de una reacción fotoquímica no adiabática empieza en la PES del estado excitado en la región Franck-Condon y termina en el mínimo del producto en la PES del estado fundamental. Ambos

estados están conectados por un canal o *funnel* (o varios) que permite el decaimiento no radiativo.

Los cruces entre el estado excitado relevante desde el punto de vista fotoquímico y el estado fundamental tienen lugar con frecuencia, y son la base de los procesos espectroscópicos. Por consiguiente, una molécula evolucionando a través de la PES de un estado excitado tiene una elevada probabilidad de entrar en una región de cruce entre hipersuperficies, durante el tiempo de vida de dicho estado excitado. Dichos cruces, intersecciones cónicas (CI, *conical intersections*) en el caso de cruce entre estados con la misma multiplicidad de espín, o cruces singlete-triplete (STC, *singlet-triplet crossings*) en el caso de cruce de hipersuperficies de diferente multiplicidad, proporcionan un canal eficiente para la desactivación no radiativa o para otros procesos espectroscópicos [239,240,241,242,243,244,245,246].

Las curvas de potencial de moléculas diatómicas no se cruzarán salvo que los dos estados electrónicos en cuestión difieran bien en sus propiedades de simetría, bien en su multiplicidad de espín [240]. Esto se debe a que, si dos curvas se cruzan, el estado electrónico debe ser degenerado en el punto de cruce, algo que no puede lograrse variando sólo la distancia internuclear. En cambio, en moléculas poliatómicas pueden cruzarse hipersuperficies con la misma simetría espacial y de espín. Así, se entiende que tenemos una intersección cónica entre dos estados, incluso de la misma simetría, cuando representando la energía respecto a las F coordenadas nucleares obtenemos una intersección a lo largo de la hiperlínea de dimensión $F - 2$, siendo $F = 3N - 6$ los grados de libertad de un sistema de N partículas [230,244]. De esta forma, el espacio total de coordenadas (de dimensión F) se divide en el subespacio de intersección de dimensión $F - 2$, en el que los dos estados están degenerados, y el subespacio ramificado (*branching space*) de dos dimensiones en el que la degeneración desaparece a lo largo de los vectores \bar{x}_1 y \bar{x}_2 . En módulo, el vector $x_1 = (\partial(E_1 - E_2)/\partial Q)$ representa la diferencia de gradientes, mientras que el

vector $x_2 = \langle \psi_1 | \partial \psi_2 / \partial Q \rangle$ representa el acoplamiento no adiabático, siendo Q el conjunto de coordenadas nucleares del sistema. La diferencia más pronunciada entre las pendientes de las hipersuperficies superior e inferior se da a lo largo de la dirección de \bar{x}_1 , mientras que a lo largo de la dirección de \bar{x}_2 se da el desplazamiento nuclear óptimo que mezcla las dos funciones adiabáticas en el punto de CI. Cuando representamos la energía de los dos estados frente a los vectores \bar{x}_1 y \bar{x}_2 , las superficies de energía correspondientes presentan la forma de un doble cono [243].

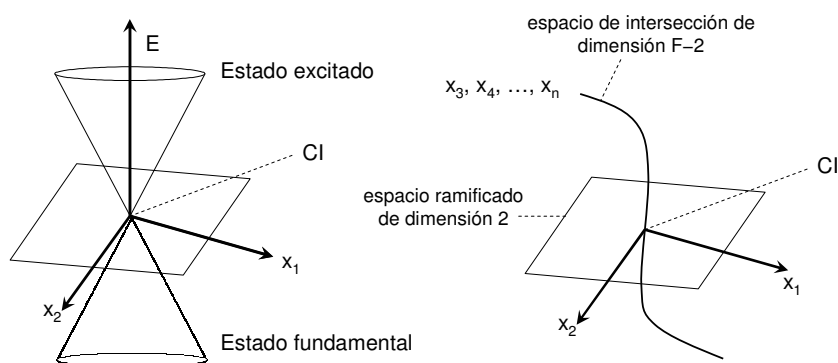


Figura 20. Representación topológica de una intersección cónica entre dos estados electrónicos.

Obsérvese que el espacio de intersección es una hiperlínea consistente en un número infinito de puntos de intersección cónica. En un punto de CI se cumple que $E_1 = E_2$, lo cual es condición necesaria pero no suficiente para su determinación. Es más, en un punto de CI ni la superficie superior ni la inferior presentan gradiente nulo, como lo sería para un verdadero punto estacionario, y por ello se requieren algoritmos especiales para su determinación. Realmente, es la proyección del gradiente en el subespacio de intersección $F - 2$ ortogonal a \bar{x}_1 y \bar{x}_2 la magnitud que va hacia cero cuando se optimiza la estructura de una CI [230,244]. Por otro lado, cuando tenemos un cruce entre hipersuperficies de

diferente multiplicidad tenemos un cruce singlete-triplete (STC, *singlet-triplet crossing*). En este caso hablamos de un hiperplano, ya que nos movemos en un espacio de $F - 1$ dimensiones, ya que el vector de acoplamiento no adiabático es nulo (en el tratamiento no relativista).

Los algoritmos teóricos necesarios para localizar mínimos de energía, estados de transición y caminos de reacción adiabáticos en estados excitados suelen ser más complejos que los empleados para el estado fundamental. Mención especial merece la localización y descripción de las regiones en las que tienen lugar procesos de decaimiento no radiativo: conversiones internas (se producen en regiones próximas a cruces débilmente evitados o a intersecciones cónicas) y cruces entre sistemas (tienen lugar en regiones cercanas a cruces singlete-triplete, si existe una combinación favorable entre la diferencia de energía y el acoplamiento espín-órbita entre los estados). Desde un punto de visto estático nos interesa la determinación estructural y el emplazamiento energético de la CI más accesible, si bien hemos de tener en cuenta que es realmente la hiperlínea la que juega el papel primordial para comprender detalladamente el comportamiento dinámico del sistema. Si para localizar un TS en una PES de dimensión N se realiza una minimización en un espacio de dimensión $N - 1$ y una maximización en la dirección restante, el punto de más baja energía en una CI se obtiene minimizando la energía en el espacio de intersección de dimensión $F - 2$.

Aparte de localizar los cruces, para estudiar un mecanismo fotoquímico hemos de determinar qué ocurre a lo largo de la coordenada de reacción desde el mismo acto de la absorción de radiación hasta la formación del producto. Para ello podemos aplicar el concepto de *camino de reacción fotoquímica* (*photochemical reaction path*), basado en el *camino de reacción de mínima energía* o MEP (*minimum energy path*) [183,246], que normalmente se origina en el estado excitado a la geometría Franck-Condon hasta el fotoproducto en estado fundamental a través de una intersección cónica.

La frase mas excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es "¡Eureka!" (¡Lo encontré!), sino "Es extraño..."

Isaac Asimov

It's lots of fun to blow bubbles - but it's wiser to prick them yourself before someone else tries to... It's hazardous to go off half cocked -and embarrassing to have to retract later.

Oswald T. Avery

2. Objetivos

Our aim is to study the photochemical behaviour of the furocoumarins in order to propose the best photosensitizer.

Firstly the photophysics of psoralen, the parent molecule, will be studied. Afterwards how the lowest triplet excited state is populated will be analyzed, in both psoralen and thymine, since this state is the responsible for the photosensitizing action. The next step is studying the photocycloaddition between psoralen and thymine that culminates in the formation of monoadducts and diadducts in DNA, which is the key point in the photosensitizing ability of these compounds. A parallel study of other furocoumarins (8-MOP, 5-MOP, TMP, khellin and 3-CPS) will be carried out in order to rationalize which is the best drug from a quantum-chemical viewpoint.

We will consider the other side of PUVA therapy as well: the interaction of furocoumarins with molecular oxygen through energy transfer to yield singlet oxygen, which is a strong electrophilic species that reacts with some components of the cellular membrane causing cell death by apoptosis.

Finally, the properties of thymine dimers, formed via another sort of photocycloaddition reaction, will be studied.

The overwhelming majority of the calculations presented here will be carried out with the CASPT2//CASSCF methodology, that is, energies at CASPT2 level and geometries at CASSCF level. Specifically, we will compute the lowest-lying singlet and triplet excited states, in order to rationalize the photophysical (electronic energies, oscillator strengths, dipole moments, radiative lifetimes, band origins, spin-orbit coupling...) and photochemical properties (photocycloaddition, energy transfer) of furocoumarins.

Often in the history of physics a guiding line of mathematical thought has permeated the whole of the science for years, tying together apparently unrelated branches of the subject, contributing to the unity of physics, but at the same time stimulating philosophical thought, and focussing attention on a branch of mathematics, and leading to its development.

J.C. Slater

The underlying physical laws necessary for the mathematical theory of a large part of physics and the whole of chemistry are thus completely known, and the difficulty is only that the exact solution of these laws leads to equations much too complicated to be soluble.

Paul Dirac

3. Metodología

Los cálculos químico-cuánticos realizados en la presente Tesis Doctoral han sido llevados a cabo, en su mayoría, empleando el programa MOLCAS [247,248,249], aunque también se ha utilizado el programa GAUSSIAN [250], así como el programa MOLDEN [251] para la visualización de orbitales moleculares, geometrías y modos normales de vibración, y el paquete de programas ChemOffice para Windows [252].

Para el cálculo de los estados excitados, en todos los sistemas en estudio, se ha empleado el método CASPT2, utilizando una función de onda multiconfiguracional CASSCF como referencia y dejando congelados los electrones de *core* 1s de todos los átomos, excepto el hidrógeno. Se ha recurrido a la técnica *level-shift* para evitar la presencia de estados intrusos (*vide* sección 1.4.2), con un parámetro imaginario de 0.3 *au* añadido al Hamiltoniano de orden cero.

Las geometrías de los estados electrónicos fueron optimizadas calculando gradientes analíticos a nivel RASSCF, permitiendo hasta cuádruples excitaciones en los espacios complementarios RAS1 y RAS3 (excepto para la kelina, donde sólo se permitieron hasta triples excitaciones). También se ha empleado el método RASSCF para calcular MEPs, como se describe en otro trabajo [253], y para la búsqueda de STCs y CIs se ha empleado el método CASSCF.

La búsqueda de los puntos del MEP y los puntos de cruce es similar a los procesos de optimización (pero con condiciones). El MEP es construido como caminos de *máxima pendiente* [35,175,177,183], esto es, se va buscando el descenso más pronunciado en la dirección del gradiente. Cada paso requiere una minimización de la PES en una sección de cruce hiperesférica centrada en la geometría inicial y caracterizada por un radio determinado (con unidades de coordenadas ponderadas por la masa, dividido por la raíz cuadrada de la masa total de la molécula, bohr·amu^{1/2}). La estructura optimizada se toma como el

centro de una nueva hiperesfera del mismo radio, y el procedimiento se repite iterativamente hasta que se alcanza la parte inferior de la superficie de energía.

Para la búsqueda de los cruces entre hipersuperficies se define de nuevo un cierto radio de una hiperesfera definida por dos estructuras moleculares (el origen es la primera estructura) correspondientes a dos estados electrónicos del sistema. La hiperesfera va avanzando paso a paso (cada paso se corresponde con una longitud igual a su radio) en la dirección de minimización de la diferencia de energía entre los dos estados, hasta que finalmente se llega a la degeneración (en realidad, llegamos a un mínimo bajo la restricción de degeneración entre estados, empleando la técnica de los multiplicadores de Lagrange). Por lo que respecta a las intersecciones cónicas, en realidad no calculamos un punto de intersección cónica como tal, pues no calculamos los términos de acoplamiento no adiabático, por lo que es más correcto denominarlo un punto MECP (*minimum energy crossing point*) o punto de cruce de mínima energía.

Las propiedades de transición (fuerzas de oscilador, TDMs, SOC) se han hallado con el método CASSI, empleando el programa RASSI del paquete MOLCAS, incluyendo los elementos matriciales de acoplamiento espín-órbita (SOME, *spin-orbit matrix element*) como se ha descrito en otros trabajos [188,254,255]. En concreto, se calculó el TDM en una representación de longitud, $\langle \Psi_m | \vec{d} | \Psi_n \rangle = \langle \Psi_m | \sum_k \vec{r}_k | \Psi_n \rangle$. Todos los cálculos fueron realizando considerando que las moléculas pertenecían al grupo puntual de simetría C_s , manteniendo por tanto el plano de simetría molecular. Para el cálculo de tiempos de vida radiativos se empleó la aproximación de Strickler-Berg [256], tanto para transiciones singlete-singlete como singlete-triplete [257].

La elección del espacio activo para los cálculos CASSCF fue realizada considerando cálculos RASSCF previos, empleando el criterio del número de ocupación para seleccionar los orbitales activos (aquéllos cuyos números de ocupación no estuviesen próximos ni a 2 ni a 0).

Tabla III. Espacio activo empleado para los cálculos de las furocumarinas, considerando las representaciones irreducibles (a' , a'') del grupo puntual C_5 . El orbital a' incluido es el par solitario del oxígeno carbonílico presente en la estructura principal del compuesto. Dicha elección se basó en el análisis de los orbitales y de sus energías en cálculos SCF y RASSCF.

	RASSCF (A')			RASSCF (A'')			CASSCF (A', A'')	
	RAS1	RAS3	Nº e ⁻	RAS1	RAS3	Nº e ⁻	RAS2	Nº e ⁻
Psoraleno	(0,8)	(0,6)	16	(1,8)	(0,6)	18	(1,12)	14
8-MOP	(0,9)	(0,6)	18	(1,9)	(0,6)	20	(1,11)	12
5-MOP	(0,9)	(0,6)	18	(1,9)	(0,6)	20	(1,11)	12
TMP	(0,8)	(0,6)	16	(1,8)	(0,6)	18	(1,10)	14
Kelina	(0,10)	(0,6)	20	(1,10)	(0,6)	22	(1,9)	12
3-CPS	(0,8)	(0,7)	16	(1,8)	(0,7)	18	(1,9)	12

Como criterio inicial para la elección del espacio activo se eligió todo el espacio π , junto al par solitario n del oxígeno carbonílico de la estructura principal. Dicha elección se basó en un cálculo SCF previo y en el análisis de los orbitales moleculares σ y π de la molécula.

El espacio activo fue el mismo para estados A' y A'' en CASSCF, pero en los cálculos de optimización se empleó un espacio activo distinto según la simetría¹⁸.

En el caso del psoraleno y sus derivados, las funciones de onda CASSCF fueron generadas con el método SA-CASSCF. El número de raíces fue de 11, 4, 7 y 3, para las simetrías $^1A'$, $^1A''$, $^3A'$ y $^3A''$, respectivamente.

Para obtener las estructuras cercanas al punto de STC se realizó un cálculo de interpolación lineal en coordenadas internas o LIIC (*linear interpolation of internal coordinates*) entre el mínimo del primer estado excitado singlete de naturaleza $\pi\pi^*$ y el mínimo del primer estado excitado singlete de

¹⁸ Lo importante es que los estados pertenecientes a ambas representaciones irreducibles tengan el mismo espacio activo cuando calculamos estados excitados, no cuando optimizamos las raíces.

naturaleza $n\pi^*$, obteniendo una serie de geometrías a las cuales calculamos los estados excitados más bajos y el SOC entre los mismos.

El conjunto de base empleado fue siempre un conjunto de orbitales naturales atómicos (ANO-L): C, O [4s3p1d]/H [2s1p], lo cual corresponde a una base de calidad TZVP (triple- ζ de valencia con funciones de polarización) para todos los átomos, excepto para los átomos de hidrógeno, cuya calidad es DZVP (doble- ζ de valencia con funciones de polarización). En el caso del psoraleno también se calculó el primer estado excitado de naturaleza Rydberg, para lo cual el conjunto de base fue aumentado con una función difusa s adicional localizada en el centro de cargas del catión [187,258].

En el estudio de la timina, para los resultados finales se empleó un espacio activo de 14 electrones distribuidos en 10 orbitales, con una base ANO-S contraída a C,N,O [3s2p1d]/H[2s1p]. Se empleó la técnica LS-CASPT2 con un parámetro de desplazamiento imaginario de 0.2 au . En el estudio de los MEPs se emplearon diferentes espacios activos: CASSCF (10,11), CASSCF (12,9) y CASSCF (10,8) para los MEP sobre los estados $^1(\pi\pi^*)$, $^1(n\pi^*)$ y $^3(\pi\pi^*)$, respectivamente. Mientras que el espacio total $\pi\pi^*$ comprende 10 electrones en ocho orbitales, se añadieron tres MOs π^* adicionales para balancear los efectos de la correlación dinámica. La naturaleza de los orbitales no cambia esencialmente a lo largo del proceso de optimización. En todos los casos se incluyeron 7 singletes y 7 tripletes en los cálculos.

En el caso de los monoadductos psoraleno-timina, tanto FMA como PMA, se partió de unas estructuras creadas a partir de los estados considerados de psoraleno y timina, optimizados a nivel DFT/B3LYP/6-31G*. Los cálculos fueron realizados en el grupo puntual C_1 . Se calcularon los estados S_0 , S_1 y T_1 a nivel CASPT2//CASSCF, con un espacio activo de 8 orbitales y 8 electrones, elegido mediante estudios RASSCF previos y cálculos de los sistemas aislados. Este mismo espacio activo fue el empleado para la optimización de CIs y STCs en las diferentes hipersuperficies.

Con el fin de verificar los resultados obtenidos, los correspondientes estados electrónicos S_0 y T_1 de los reactivos aislados (psoraleno y timina) fueron optimizados a nivel CASSCF con los espacios activos aproximadamente equivalentes a los que posee cada fragmento en la supermolécula (6/6 y 2/2, respectivamente). Es importante destacar que las energías obtenidas a nivel CASPT2 pueden ser consideradas suficientemente precisas respecto al cálculo de los sistemas aislados a niveles superiores de cálculo (tanto en lo referente al conjunto de base como al espacio activo), ya que las diferencias son siempre menores de 0.2 eV. No se impuso ninguna restricción geométrica o de simetría en estos cálculos de los monoadductos.

Para concluir con el estudio de la terapia PUVA, en el estudio de la interacción furocumarina-oxígeno, se hallaron funciones de onda CASSCF y energías CASPT2. No es trivial la conformación de la supermolécula más favorable para la transferencia de energía entre los fragmentos, dadas las características de las hipersuperficies [molécula orgánica-O₂], como luego se detallará. Por ello, en otro estudio [259] se consideraron diferentes orientaciones (cara a cara, lado a lado y perpendicular) con diferentes sistemas: etileno-etileno (Et-Et), ión metaniminio-etileno (MetN⁺-Et) y etileno-oxígeno (Et-O₂). El resultado fue que la orientación más favorable para el proceso de la transferencia de energía es la cara a cara (*FF*, *face-to-face*). Por tanto, dicha orientación se empleó para el caso furocumarina-oxígeno, colocando el oxígeno molecular en estado fundamental, cuya geometría fue tomada de la bibliografía [221], a diferentes distancias con respecto al doble enlace reactivo de cada furocumarina en estado triplete. La geometría de cada furocumarina era la óptima para el estado excitado triplete más bajo; la misma que se ha utilizado anteriormente en los cálculos de las furocumarinas aisladas. El espacio activo elegido fue, en todos los casos, de 14 electrones/11 orbitales (8/7 localizados en la furocumarina y 6/4 en el oxígeno), y fue validado comparando los resultados con estudios previos de las furocumarinas y del oxígeno por separado con espacios activos y

conjuntos de base más precisos. Así se calcularon los cuatro primeros estados singletes y los tres primeros tripletes del sistema. No se impusieron restricciones de simetría y se empleó un conjunto de base ANO-L C,N,O[4s3p1d]/H[2s1p], al igual que en los estudios previos de las furocumarinas aisladas.

Con respecto al estudio de los dímeros de timina, se empleó el método CASPT2 con un espacio activo de 12 electrones π / 12 orbitales π para calcular los valores de energía, incluyendo la corrección BSSE. Se empleó un conjunto de base ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]. Se consideraron cinco geometrías en el estudio: monómeros no interaccionantes ($T + T^*$: uno en estado fundamental y otro en estado excitado), excímero deslocalizado, ${}^1(\text{TT})_{\text{exc}}$, dímero con la disposición geométrica propia del B-ADN, $(\text{TT})_{\text{B}}$, el cruce $(S_1/S_0)_{\text{CI}}$ y el dímero optimizado, ${}^1(\text{T}\langle\text{T})$. Las optimizaciones de geometría del estado fundamental del dímero optimizado, $(\text{T}\langle\text{T})$, y del excímero deslocalizado, ${}^1(\text{TT})_{\text{exc}}$, fueron llevadas a cabo con el método CASSCF (espacio activo: 16 electrones π / 14 orbitales π). Los orbitales moleculares π totalmente simétricos de cada timina fueron considerados inactivos. Para simular la interacción real entre pirimidinas en la doble hélice, la optimización se realizó inicialmente imponiendo una simetría C_s , para asegurarnos de que se forme el estereoisómero cis-syn. A las geometrías optimizadas, las energías fueron calculadas sin restricciones de simetría (C_1) dado que la ruptura de la función de onda es un requisito previo para describir correctamente el límite asintótico para la transición electrónica singlete-singlete más baja de dos fragmentos. Se dice que el cálculo rompe la simetría cuando la función de onda electrónica calculada presenta una simetría menor que la implicada por las coordenadas nucleares. Para los cálculos C_1 , otros dos orbitales moleculares π fueron considerados inactivos, dado que el número de ocupación de los orbitales naturales correspondientes cuando fueron tomados como activos era prácticamente de 2.0. Por tanto, se empleó una función de onda de 12 electrones π / 12 orbitales π , que denominaremos CASSCF (12,12) de ahora en adelante.

Los cruces de intersección cónica en el sistema timina-timina fueron obtenidos como MECPs mediante el empleo de la técnica de multiplicadores de Lagrange, implementada en el paquete MOLCAS, hallándose el punto de mínima energía con la restricción de degeneración entre los dos estados considerados [260]. Además, para la forma correspondiente al B-ADN, $(TT)_B$, se empleó la disposición estándar [261].

Empleando las funciones de onda CASSCF (12,12) sin restricción de simetría (C_1), promediadas para tres raíces, se introdujo la correlación electrónica dinámica con el método CASPT2, etiquetado como CASPT2 (12,12). Para minimizar la presencia de estados intrusos se empleó la técnica *imaginary level-shift*, con un parámetro de desplazamiento de 0.2 *au* en los cálculos. La intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$ fue obtenida con el método CASPT2 explorando una red de puntos a lo largo de las distorsiones que implican los valores mínimos para los gradientes CASSCF (12,12) en la región de cruce [297]. La estructura obtenida es consistente con resultados CASSCF previamente obtenidos [262], aunque las distancias entre monómeros son mayores, tal y como ocurre en el dímero eteno-eteno [297,263]. Este efecto está directamente relacionado con la inclusión de la correlación dinámica.

One of the main objectives of a theoretical chemist should be to provide a critical quantitative background for simple qualitative hypotheses about electronic structure.

John A. Pople

¿Crees que la Física Cuántica es la respuesta? Porque no sé, ¿en el fondo de qué me sirve a mí que el tiempo y el espacio sean exactamente lo mismo? En fin, si le pregunto a un tío qué hora es y me dice que 6 kilómetros, ¿qué diablos es eso?

Anything else (2003). Escrita y dirigida por **Woody Allen**.

4. Resultados y Discusión

4.1. Estudio de la molécula de psoraleno

4.1.1. Fotofísica

El primer paso para desentrañar el mecanismo fotoquímico de la terapia PUVA es entender la fotofísica de la molécula parental, el psoraleno. Para ello estudiaremos los estados excitados de más baja energía y los caminos de desexcitación de la molécula.

Hemos empezado estudiando el espectro singlete-singlete y singlete-triplete de la molécula, calculando varios estados excitados singlete (*vide* Sección 3) verticalmente a la geometría optimizada RASSCF del estado fundamental S_0 ($1^1A'$). Esto es, a la geometría Franck-Condon. Los resultados están compilados en la Tabla IV. A partir de aquí sólo discutiremos los resultados obtenidos a nivel CASPT2, salvo que se especifique lo contrario.

El estado excitado singlete más bajo, $2^1A'(\pi\pi^*)$, se sitúa verticalmente a 3.98 eV, con una fuerza de oscilador asociada de 0.027. El siguiente estado, $1^1A''(n\pi^*)$ se encuentra a 5.01 eV, correspondiéndose con una transición de intensidad prácticamente nula. Una tercera transición al estado $3^1A'$ se localiza a 5.03 eV, con una fuerza de oscilador de 0.107. No obstante, el estado $3^1A'$ presenta el momento dipolar más elevado de entre los estados considerados, 8.70 D, difiriendo en *ca.* 2.5 D con respecto al valor del estado fundamental, lo cual es una indicación de su sensibilidad a disolventes polares, en los cuales la transición asociada presentará un corrimiento al rojo (desplazamiento batocrómico).

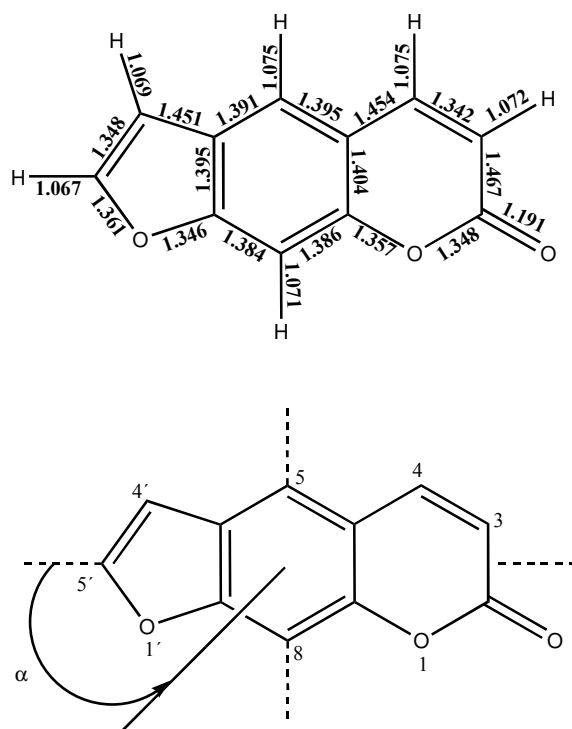


Figura 21. Molécula de psoraleno con los átomos numerados (abajo) y distancias de enlace en angstroms correspondiente al mínimo del estado fundamental (arriba). La flecha define los ángulos positivos de la dirección del momento dipolar y del momento dipolar de transición con respecto al eje largo de pseudosimetría de la molécula.

Nuestros resultados sugieren que la primera banda con estructura vibracional observada en el espectro de absorción óptica puede ser asignada a la transición al estado $2^1A'$ ($\pi\pi^*$), con una banda débil $n\pi^*$ enmascarada. El perfil observado de la banda debe ser atribuido a la estructura vibracional, lo cual no es improbable dado que se produce una modificación significativa de las distancias de enlace en el mínimo del estado $2^1A'$.

Tabla IV. Energías de excitación ΔE (eV), fuerzas de oscilador f , momentos dipolares d (D), dirección del momento dipolar d_{dir} y dirección del momento dipolar de transición TDM_{dir} (grados) en el psoraleno a la geometría optimizada S_0 .

Estado	ΔE		f	d	d_{dir}	TDM_{dir}
	CASSCF	CASPT2				
$1^1A'$	-	-	-	6.25	128	-
$2^1A'(\pi\pi^*)$	4.52	3.98	0.027	6.50	132	4
$1^1A''(n\pi^*)$	4.22	5.01	0.000	2.07	110	-
$3^1A'(\pi\pi^*)$	6.33	5.03	0.107	8.70	-23	5
$4^1A'(\pi\pi^*)$	6.73	5.22	0.064	7.01	-37	102
$5^1A'(\pi\pi^*)$	6.95	5.30	0.331	7.35	-34	30
$6^1A'(\pi\pi^*)$	6.67	5.70	0.091	7.02	-38	-9
$7^1A'(\pi\pi^*)$	7.30	5.81	0.321	6.62	-35	4
$8^1A'(\pi\pi^*)$	7.72	6.17	0.287	6.29	-29	-6
$9^1A'(\pi\pi^*)$	7.86	6.24	0.168	4.89	114	-28
$2^1A''(\pi 3s)$	6.39	6.32	0.000	0.11	43	-
$1^3A'(\pi\pi^*)$	2.57	3.27	-	5.40	124	-
$2^3A'(\pi\pi^*)$	3.13	3.55	-	5.34	125	-
$3^3A'(\pi\pi^*)$	3.82	4.08	-	5.48	127	-
$4^3A'(\pi\pi^*)$	5.68	4.66	-	6.77	-31	-
$5^3A'(\pi\pi^*)$	4.18	4.67	-	5.96	129	-
$6^3A'(\pi\pi^*)$	4.43	4.84	-	5.41	123	-
$1^3A''(n\pi^*)$	4.07	4.85	-	2.15	111	-

Cálculos realizados a nivel TD-DFT [81,124] y DFT/MRCI [125] sugieren, sin embargo, que dos transiciones $\pi\pi^*$ localizadas cerca de 3.8 y 4.4 eV son las verdaderas responsables de la banda de más baja energía del espectro. Una asignación incontrovertible requeriría un análisis completo de la estructura vibracional de la banda y una comparación con el espectro obtenido en fase vapor o en haces moleculares.

Por encima de 5.0 eV se observan varias transiciones singlete-singlete. El estado $3^1A'$ (5.03 eV) es el responsable de la banda a unos 5 eV observada en el espectro experimental (*vide* Sección 1.2). Las transiciones a los estados ($\pi\pi^*$) $4^1A'$ (5.22 eV) y $5^1A'$ (5.30 eV) presentan fuerzas de oscilador de 0.064 y 0.331, respectivamente, por lo que, de acuerdo con estos resultados, debería haber una banda intensa a mayores energías. En realidad, dicha banda es probablemente una combinación de ambas transiciones. Entre 5.7 y 6.2 eV aparecen cuatro transiciones a estados excitados $^1A'$ ($\pi\pi^*$) de intensidad media-alta. Por encima de este valor y hasta 8.0 eV, sólo se obtienen transiciones de valencia débiles de carácter $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$. El inicio de las series Rydberg ha sido determinado a 6.32 eV, como el estado $2^1A''$ (HOMO \rightarrow 3s). Dos bandas intensas a 210 nm (5.90 eV) y a 200 nm (6.20 eV) han sido registradas en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol [107], y corresponden a las transiciones a los estados $\pi\pi^*$ $7^1A'$ y $8^1A'$. Estas bandas son las más intensas en esta región del espectro. Song *et al.* [102] sostenían que las dos bandas de absorción de más baja energía en el psoraleno, angelicina y metilpsoralenos estaban polarizadas a lo largo del eje largo y eran aproximadamente paralelas, con ángulos que diferían en menos de 20°. Nuestros cálculos del TDM muestran que las dos transiciones $\pi\pi^*$ más bajas presentan una polarización casi paralela, esto es, están alineadas con el eje largo de la molécula, mientras que la transición $4^1A'$ presenta una polarización prácticamente perpendicular a las anteriores.

Con respecto a los tripletes, el estado $1^3A'(T_1)$, de naturaleza $\pi\pi^*$, se sitúa a 3.27 eV, prácticamente 0.7 eV por debajo del estado S_1 ($2^1A'$). Otras tres transiciones $\pi\pi^*$ a estados $^3A'$ aparecen seguidamente, a 3.55, 4.08 y 4.66 eV. El estado excitado triplete de naturaleza $n\pi^*$ más bajo, $^3A''$, se sitúa verticalmente a 4.85 eV, ligeramente por debajo del correspondiente estado singlete. Los cálculos DFT [81] y DFT/MRCI [125] muestran resultados similares en lo referente a la localización de los tripletes, aunque, como es típico en cálculos DFT [264], las transiciones singlete-triplete están subestimadas (0.2-0.3 eV). La naturaleza de las transiciones más bajas de cada simetría, las cuales son básicamente responsables de las propiedades fotofísicas, pueden ser descritas gráficamente mediante la representación de la densidad electrónica diferencial (*vide* Figura 22).

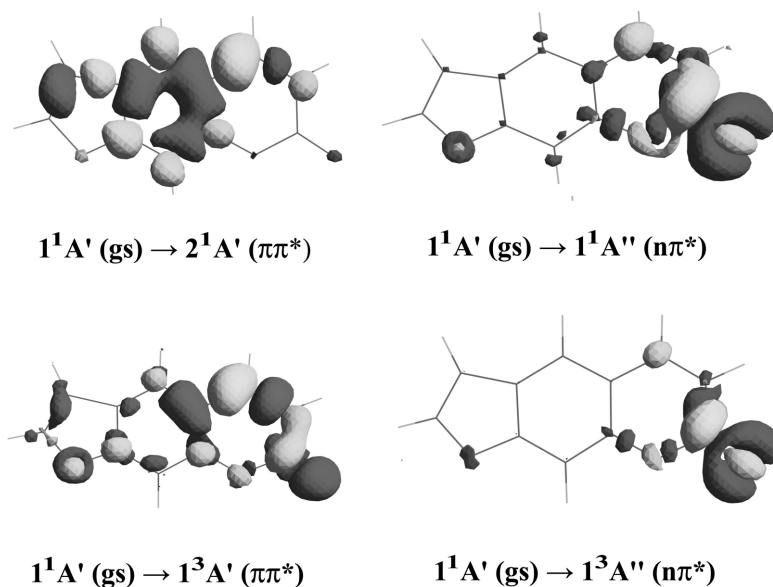


Figura 22. Densidad electrónica diferencial para las principales transiciones de valencia en el psoraleno (en el mínimo del estado fundamental). La densidad electrónica se desplaza, tras interactuar con la radiación, desde las zonas oscuras hasta las zonas claras.

En la transición al estado $S_1(\pi\pi^*)$, la migración de la carga está centrada preferentemente en el anillo bencénico central. Por el contrario, la transición asociada al estado $T_1(\pi\pi^*)$ presenta mayores contribuciones en el anillo de pirona, con una elevada participación del oxígeno carbonílico y un desplazamiento de la carga desde la zona del enlace $C_3 - C_4$, que luego relacionaremos con las propiedades fotosensibilizadoras. Asimismo, observamos que las densidades diferenciales de los estados $n\pi^*$ están centradas en el grupo carbonilo.

Por otro lado, las furocumarinas se caracterizan por débiles bandas de emisión de fluorescencia y bandas intensas de fosforescencia. La razón de rendimientos cuánticos de fosforescencia/fluorescencia, $(\Phi_P/\Phi_F) = 7.1$, indica que debe haber un mecanismo de cruce entre sistemas (ISC) efectivo para la población del estado triplete más bajo (T_1). Como hemos indicado anteriormente, la fotoreactividad de las furocumarinas está ligada al estado T_1 tanto en PUVA como en PDT [84], por lo que un incremento en el rendimiento cuántico de formación del triplete debería conducir a un incremento de la acción fototerapéutica. El tiempo de decaimiento total de fosforescencia (τ_P) fue medido en una mezcla glicerol-agua con el resultado de 1.1 s y en etanol con el resultado de 0.66 s [104]. Los tiempos de vida radiativos de fosforescencia experimentales fueron obtenidos a partir de la relación $\tau_{rad} = \tau_P \cdot \Phi_P$, y el resultado fue de 8 y 5 s, respectivamente.

Los resultados de la Tabla V nos permiten racionalizar parte de los datos experimentales. El estado $2^1A'(\pi\pi^*)$ es responsable de la banda de más baja energía y de la banda de emisión de fluorescencia. Verticalmente, a la geometría optimizada del estado fundamental, la energía de la transición es 3.98 eV y, tras relajación de la geometría, el origen de banda (T_0), obtenido como la diferencia de energía entre los mínimos del estado fundamental y del estado excitado, decrece a 3.59 eV. Esto significa que el rango de absorción se extiende de 3.59 a

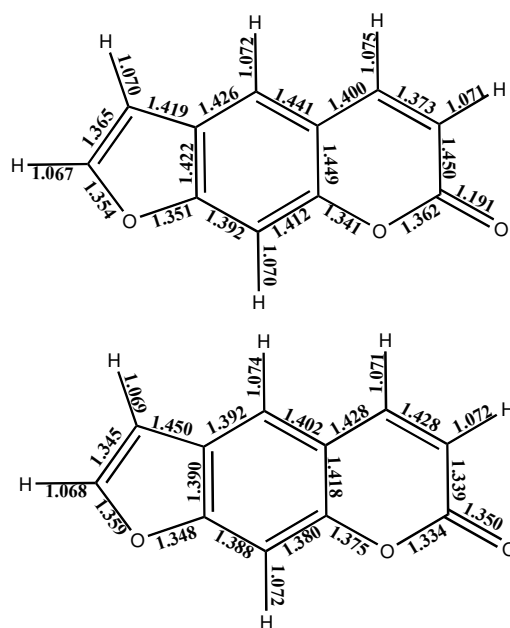
3.98 eV, y este rango cae dentro del radio de acción de la terapia PUVA. Un rango similar se observa, experimentalmente, entre la banda de absorción más baja y el origen de banda.

Tabla V. Energías de excitación medidas experimentalmente y calculadas (en eV) y tiempos de vida de emisión (τ_{rad}) relevantes en la fotofísica del psoraleno. E_{VA} : energía de absorción vertical; T_e : origen de banda electrónico (adiabático); E_{VE} : energía de emisión vertical; Abs_{max} : máximo de absorción experimental; T_0 : origen de banda experimental; E_{max} : máximo experimental de emisión.

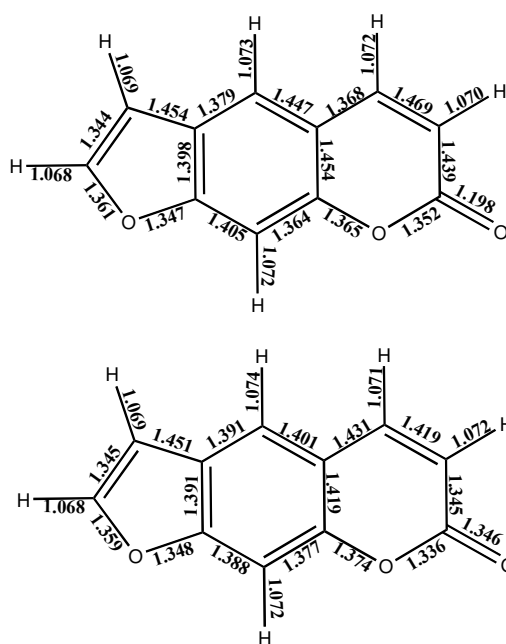
Estado	Teórico (CASPT2)				Experimental ^a			
	E_{VA}	T_e	E_{VE}	τ_{rad}	Abs_{max}	T_0	E_{max}	τ_{rad}
$2^1A'(\pi\pi^*)$	3.98	3.59	3.45	74 ns	3.7-4.3	3.54	3.03	-
$1^1A''(n\pi^*)$	5.01	3.91	2.78	3 μ s	-	-	-	-
$1^3A'(\pi\pi^*)$	3.27	2.76	2.29	28 s	-	2.7	2.7	5-8 s
$1^3A''(n\pi^*)$	4.85	3.84	2.79	9 ms	-	-	-	-

^a Datos en etanol (refs. 102,103,104,105,106). Existe información en otros solventes (ref. 107).

Los cambios geométricos entre S_0 y S_1 afectan principalmente a la longitud de los enlaces del anillo de benceno central (*vide* Figura 21 y Figura 23), lo cual era de esperar tras el análisis de la densidad electrónica diferencial (*vide* Figura 22).



determinado experimentalmente los tiempos de vida, pero a partir de nuestros tiempos de vida radiativos, 74 ns para el estado $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) y 3 μ s para el estado $1^1A''$ ($n\pi^*$), y el rendimiento cuántico de fluorescencia experimental (0.019) [104], pueden ser deducidos los valores de 1.4 y 57 ns, respectivamente. Teniendo en cuenta que las medidas experimentales fueron obtenidas con resoluciones temporales no inferiores a 2 ns [104], la falta de tiempos medidos señala que el estado preferente para tal asignación es el estado $\pi\pi^*$, con un decaimiento de fluorescencia más rápido. Ciertamente, sería deseable obtener datos experimentales con mayor resolución temporal.



significativas con respecto a S_0 , principalmente en el anillo de pirona, mientras que la relajación energética alcanza casi 0.5 eV (*vide* Figura 24). El cambio estructural más sobresaliente tiene lugar en el doble enlace $C_3 = C_4$ del anillo de pirona, el cual se alarga unos 0.13 Å.

La población de espín, mostrada en la Figura 25, está localizada principalmente en cada uno de los átomos de carbono que forman el susodicho doble enlace.

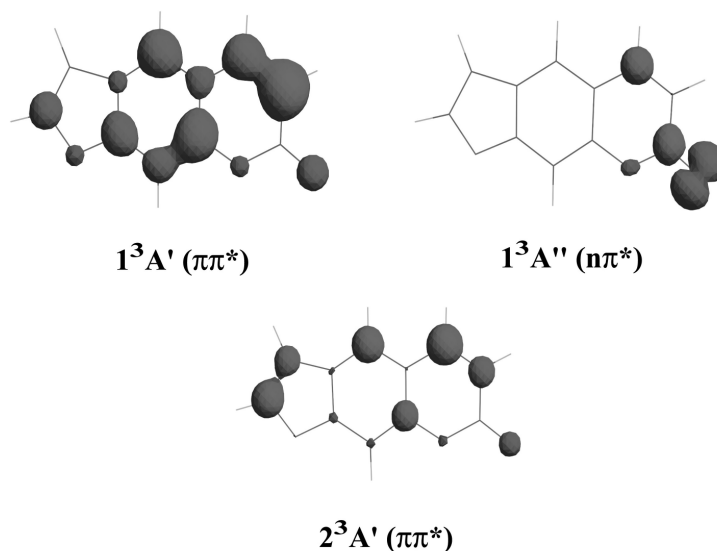


Figura 25. Densidad de espín para los tripletes más bajos en el psoraleno, calculada a la geometría optimizada del estado fundamental.

En este sentido, podemos decir que la molécula de psoraleno incrementa su reactividad en el estado T_1 , siendo muy susceptible de reaccionar a través de estos dos átomos de carbono del doble enlace de la pirona. Esto está de acuerdo con la literatura científica, donde se postula que la acción fototerapéutica desempeñada por el psoraleno tiene lugar a través de su estado T_1 , y también está de acuerdo con la estructura propuesta para la banda de fosforescencia, basada

en la intensa progresión vibracional correspondiente al modo de *stretching* (vibración de estiramiento) del doble enlace carbono-carbono en la parte de la pirona [104]. El tiempo de vida de fosforescencia calculado resultó ser de 28 s, ligeramente superior que el estimado experimentalmente a partir del tiempo de relajación total, 5 y 8 s [104,106]. Para el estado $2^3A'(\pi\pi^*)$ la población de espín se localiza principalmente en los átomos de carbono que forman ambos dobles enlaces reactivos, $C_3 = C_4$ (pirona) y $C'_4 = C'_5$ (furano).

4.1.2. Población del estado triplete

Dado que las propiedades fototerapéuticas del psoraleno se inician por irradiación con luz de longitud de onda de 320-400 nm (3.87-3.10 eV), el único estado que será poblado por absorción directa es el estado $2^1A'(\pi\pi^*)$, S_1 (de aquí en adelante también lo denominaremos S_π). La molécula excitada evolucionará mayoritariamente hacia el mínimo de este estado, donde la fluorescencia puede tener lugar. Recordemos, no obstante, que la razón de rendimientos cuánticos de fosforescencia/fluorescencia, 7.1, enfatiza el papel que juegan los estado triplete en la fotofísica del sistema. Por tanto, el estado triplete más bajo, $1^3A'(\pi\pi^*)$, T_1 (en adelante, también T_π), debe poblarse eficientemente por un mecanismo de cruce entre sistemas. El estado T_1 (T_π) se encuentra muy por debajo en energía con respecto al estado S_1 (S_π), tanto vertical (≈ 0.6 eV) como adiabáticamente (≈ 1.2 eV), lo cual descarta una interacción entre ambos estados, al menos en fase gas. Es más, como veremos más adelante, ambos estados no se cruzan tampoco a lo largo del camino de relajación de S_1 . Debe existir otro mecanismo efectivo que implique probablemente la población de estados triplete de alta energía, que por sucesivas conversiones internas conduzcan hasta T_1 (T_π).

Dado que las reglas cualitativas de El-Sayed [266,267] indican que el SOC es máximo entre un estado $\pi\pi^*$ y un estado $n\pi^*$, y mínimo entre estados de la misma naturaleza, en principio podríamos pensar que el estado fundamental podría interaccionar con un triplete $n\pi^*$. El SOME entre el estado fundamental S_0 y el estado triplete de naturaleza $n\pi^*$ más bajo, $1^3A''$, es relativamente alto, 47 cm^{-1} , pero la fuerza de oscilador de la transición asociada es muy pequeña, 5×10^{-6} , como corresponde a una transición prohibida por el espín. El alto rendimiento cuántico de fosforescencia requiere un camino mucho más efectivo

para poblar el estado triplete $\pi\pi^*$ más bajo, por lo que debe tener lugar un proceso ISC.

Hay dos condiciones necesarias para que dicho proceso sea efectivo: una diferencia de energía pequeña entre los estados implicados, y un elevado acoplamiento espín-órbita entre los mismos. Si el estado inicialmente poblado es el $2^1A'$ ($\pi\pi^*$), S_{π} la desexcitación no radiativa al estado triplete debe ocurrir a lo largo del camino de relajación de S_{π} , comenzando en la región Franck-Condon (geometría del estado fundamental), y próxima a un STC entre dos hipersuperficies. Analizando las diferencias de energía verticales entre S_{π} y los tripletes $\pi\pi^*$ a la geometría Franck-Condon, encontramos que para los estados triplete $\pi\pi^*$ cuyo *gap* (diferencia de energía) con S_{π} es más pequeño ($1^3A'$ (T_{π}): -0.71 eV; $2^3A'$ (T_2): -0.43 eV; $3^3A'$ (T_3): 0.10 eV), los términos del SOC son siempre muy bajos, en concordancia con las reglas de El-Sayed y con cálculos previos DFT/MRCI [126]. Estos guarismos señalan que un proceso ISC entre estos estados triplete y el estado S_{π} es muy improbable, al menos en fase gas. Por el contrario, como ya hemos dicho, el acoplamiento es mayor entre el estado S_{π} y el triplete $n\pi^*$ más bajo, $1^3A''$ (T_n), verticalmente T_7 , siendo de 3 cm^{-1} . Un valor similar de 10 cm^{-1} fue obtenido con el método DFT/MRCI [125]. El problema es que el *gap* energético es muy alto (0.87 eV), por lo que para entender completamente el mecanismo de ISC responsable de la población de T_1 , condición *sine qua non* para que la acción fotosensibilizadora tenga lugar, se deben calcular los caminos de relajación de la energía desde S_1 , el estado inicialmente poblado por la radiación electromagnética, buscando las regiones de degeneraciones o cruces entre dicho estado y los estados triplete, teniendo asimismo un parámetro de acoplamiento espín-órbita elevado. En este sentido, el papel que debe jugar el estado $1^3A''$ (T_n) se antoja fundamental.

Por tanto, la posibilidad que hemos de explorar es el decaimiento no radiativo a un estado triplete a lo largo del camino de relajación de S_1 . Para ello,

comenzamos calculando un MEP en la hipersuperficie de S_1 a partir de la geometría Franck-Condon. En los pasos iniciales del MEP, el estado $T_n(n\pi^*)$ continuó presentando los SOMEs más grandes con el estado S_π , si bien el *gap* entre ambos fue aumentando en cada punto del camino casi 0.2 eV. Por tanto, no puede haber un mecanismo ISC eficaz a lo largo del principal camino de relajación, y el estado S_π alcanza rápidamente su mínimo sin cruzarse con ningún estado triplete.

Dado que debía existir otro mecanismo posible en la desactivación no radiativa de S_π , probamos otra estrategia diferente. A tenor de nuestros resultados anteriores, el proceso ISC más favorable se da cuando las hipersuperficies de los estados S_π y T_n se cruzan. A la geometría $(S_\pi)_{MIN}$, el estado T_n está por encima del S_π a 1.24 eV. Para encontrar la estructura correspondiente al cruce realizamos una interpolación lineal en coordenadas internas (LIIC) desde el $(S_\pi)_{MIN}$, hasta el mínimo del estado $1^1A''$, $(S_n)_{MIN}$, una geometría donde el estado T_n es claramente inferior en energía (0.51 eV) que el estado S_π . Por tanto, se debe haber producido un cruce entre estas dos estructuras.

La Figura 26 muestra los valores de energía y SOC calculados con el protocolo CASSCF/CASPT2 para los estados más bajos del psoraleno, en concreto, dos singletes y cinco tripletes, a lo largo del camino LIIC. El *gap* S_π - T_n decrece hasta que los dos estados se cruzan apenas pasado el punto 2. Mientras tanto, los elementos del SOC aumentan significativamente hasta unos 10 cm^{-1} , lo que sugiere una situación favorable para el ISC.

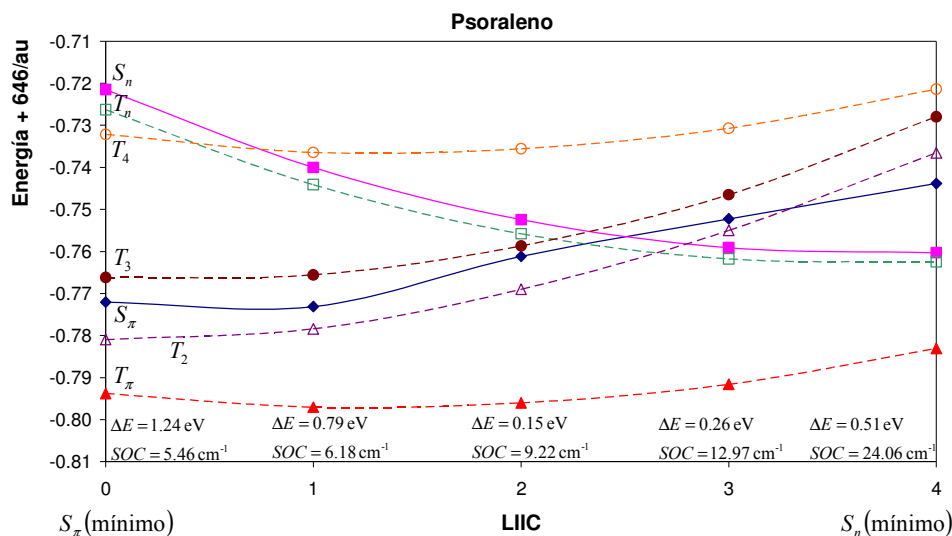


Figura 26. Energías calculadas a nivel CASPT2 para los estados excitados más bajos del psoraleno a lo largo del LIIC entre los mínimos del S_π y del S_n . Las líneas continua y a trazas representan, respectivamente, estados singlete y triplete. Se han incluido también las diferencias de energía (ΔE) y términos de acoplamiento espín-órbita (SOC) entre S_π y T_n a las geometrías interpoladas.

Con respecto al $(S_\pi)_{MIN}$, la barrera para alcanzar T_n fue estimada en 0.42 eV, un valor que puede considerarse como un límite superior para el camino más favorable, como veremos enseguida. Para determinar de forma más precisa esta barrera y las características de la región del cruce S-T, se empleó el punto 2 del LIIC como geometría inicial en la búsqueda de un cruce singlete-triplete STC a nivel CASSCF entre S_π y T_n . Dicho STC fue hallado y lo denotaremos como $(S_\pi/T_n)_X$.

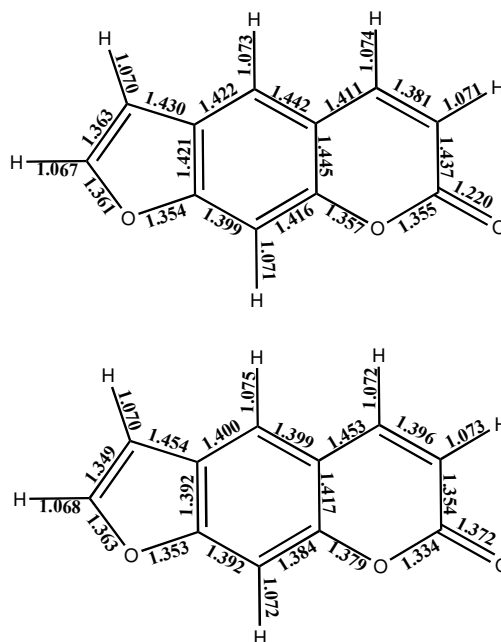


Figura 27. Geometrías del psoraleno en el punto de STC (S_{π}/T_n) $_X$ —arriba— y en el punto de CI (T_n/T_n) $_{CI}$ —abajo—.

Como era de esperar, el cambio más importante en la geometría desde el mínimo de S_{π} hasta las estructuras optimizadas de S_n o T_n está relacionado con la longitud de enlace $C = O$, más largo (≈ 0.15 Å) en estados $n\pi^*$. Por tanto, no es sorprendente que la estructura STC presente un valor intermedio de 1.220 Å.

El SOC a la geometría del STC es de 6.4 cm^{-1} . La barrera entre $(S_{\pi})_{MIN}$ y $(S_{\pi}/T_n)_X$ calculada es de 0.36 eV a nivel CASPT2, y representa el exceso de energía requerido para que el proceso ISC tenga lugar desde el mínimo del estado S_{π} . Dicha barrera será menor si se considera la energía en exceso del sistema inicial. De hecho, a la geometría Franck-Condon el estado S_{π} presenta una energía de al menos 0.03 eV superior a la del cruce $(S_{\pi}/T_n)_X$, lo cual representaría una situación favorable para superar la barrera (en fase gas).

cónica $(T_n/T_\pi)_{CI}$, pero acortándose hasta 1.198 Å en $(T_\pi)_{MIN}$, de acuerdo con la naturaleza $\pi\pi^*$ o $n\pi^*$ de los estados excitados.

Las consecuencias de la ruptura de la conformación plana de la molécula fueron exploradas a diferentes niveles de cálculo, pero las optimizaciones de geometría condujeron siempre a un mínimo plano para todos los estados electrónicos estudiados. La relevancia de los desplazamientos fuera del plano para la relajación del estado S_π ha sido destacada recientemente [126], junto con un aumento del SOC entre los estados S_π y T_π considerando, además, los efectos del acoplamiento vibrónico incluyendo modos normales de vibración fuera del plano, como un mecanismo alternativo para un ISC eficiente [268]. Ambos mecanismos deben ser competitivos en fase gas. Teniendo en cuenta que los estados $n\pi^*$ se desestabilizan en disolventes polares [125], el mecanismo mediado por el estado T_n que proponemos podría ser de menor importancia en medios polares.

Por otro lado, es improbable que el estado $S_2(n\pi^*)$ sea importante en el mecanismo [104] por mor del “efecto de proximidad” (*proximity effect*) [111,269] entre estados singletes $\pi\pi^*$ y $n\pi^*$. Este tipo de razonamiento está basado en *gaps* verticales, mientras que la Fotofísica moderna está basada en procesos no adiabáticos a lo largo de los caminos de relajación de la energía [230,229,254,270].

4.1.3. Interacción con el ADN

La acción fotosensibilizadora de los psoralenos ha sido estudiada extensamente, en concreto la fotocicloaddición con las bases del ADN, tanto desde el punto de vista teórico [117,271,272,273,274,275,276], aunque sólo en lo referente al estudio de los complejos de intercalación furocumarina-ADN y estudios conformacionales sin mediar reacción química, como desde la perspectiva experimental [140,141,147,150,277,278].

A tenor de los resultados anteriormente expuestos, el PMA debería formarse a partir del estado T_1 del psoraleno. Respecto al FMA, el psoraleno no presenta un alargamiento significativo del doble enlace del furano en estado excitado. Como se ha sugerido antes, este monoadducto podría formarse a partir del estado T_1 de la timina. Por tanto, nos interesa analizar cómo se puebla dicho estado en la nucleobase. Los estados electrónicos de las bases del ADN han sido estudiados concienzudamente, especialmente en la última década, tanto desde el punto de vista experimental [86,279,280,281] como teórico [270,282,283].

La luz solar constituye un riesgo carcinogénico importante por mor de su componente ultravioleta. La dinámica de desexcitación ultrarrápida que tiene lugar en el ADN [64,284] es clave en el mantenimiento de la integridad de la información genética. En caso contrario, las mutaciones serían mucho más frecuentes. Este decaimiento ultrarrápido ha sido objeto de diversas investigaciones químico-cuánticas en los últimos años, y ahora se puede explicar mediante un modelo de intersecciones cónicas entre los estados excitados singlete más bajos de las bases del ADN [254,270,283,285].

Una vez la timina, en estado fundamental, es irradiada con luz UV, es la transición $^1(\pi\pi^*)$ HOMO (H) \rightarrow LUMO (L), de aquí en adelante HL, situada a 4.89 eV, la que presenta una fuerza de oscilador más elevada por debajo de 6 eV, 0.167 (*vide* Tabla VI). El decaimiento ultrarrápido experimentado por la

timina en el rango de los femtosegundos [64,284] es lógico dado que en el MEP asociado al estado excitado singlete más bajo, de naturaleza $\pi\pi^*$, se llega a intersección cónica con el estado fundamental (*ground state*, *gs*), $(gs/{}^1\pi\pi^*)_{CI}$, sin encontrar ninguna barrera energética [283].

Tabla VI. Propiedades espectroscópicas para los estados excitados singletes y tripletes más bajos de la timina.

Estado	Transición vertical (eV)		Origen de banda (T_e , eV)		τ_{rad}
	CASSCF	CASPT2 ^a	CASSCF	CASPT2	
${}^1(n\pi^*)^b$	5.41	4.77 (0.004)	4.23	4.05	2501 ns
${}^1(\pi\pi^*)$	6.52	4.89 (0.167)	6.07	4.49	9 ns
${}^1(\pi\pi^*)$	7.36	5.94 (0.114)			
${}^3(\pi\pi^*)$	3.95	3.59	2.99	2.87	17 ms
${}^3(n\pi^*)^b$	5.21	4.75	3.84	3.93	
${}^3(\pi\pi^*)$	5.86	5.14			

^a Fuerzas de oscilador entre paréntesis. ^b Implica básicamente al O en posición orto con respecto al metilo.

El uso del MEP garantiza la ausencia de barreras energéticas a lo largo del camino de mínima energía, a diferencia de lo que ocurre con una simple optimización de geometría. La estructura de la CI al final del MEP es del tipo del eteno, implicando un alargamiento y un giro del doble enlace etilénico [283]. La presencia de una CI accesible también explica el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia experimental ($\Phi_F \approx 10^{-4}$), con un origen de banda a 4.5 eV en agua [286]. Esta débil emisión puede ser relacionada con la presencia de un mínimo con estructura molecular plana situado adiabáticamente a 4.49 eV, mientras que un mínimo no fluorescente, ${}^1(n\pi^*) \equiv {}^1(n_o\pi^*)$, se encuentra a 4.05 eV

(vide Tabla VI). El hecho de que el tiempo de vida radiativo sea de 9 ns confirma la naturaleza $\pi\pi^*$ del estado fluorescente.

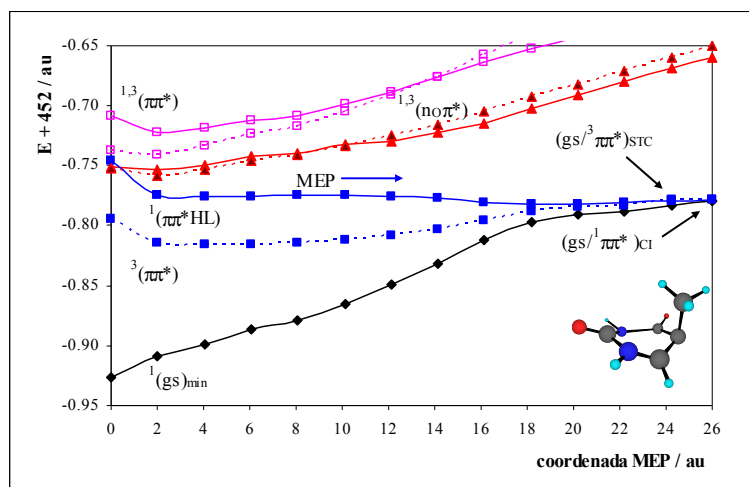


Figura 29. Evolución del estado fundamental y de los estados excitados singlete más bajos de la timina a partir de la geometría Franck-Condon a lo largo del MEP $^1(\pi\pi^* \text{HL})$.

La población eficiente de los estados triplete debe tener lugar a lo largo del principal proceso de decaimiento de S_1 ($\pi\pi^* \text{HL}$). Como se ve en la Figura 29, desde dicho estado tienen lugar dos cruces STC a lo largo del MEP y, consecuentemente, dos procesos de cruce entre sistemas, amén de la CI que tiene lugar con el estado $^1(n\pi^*)$. El primer STC está localizado a 4.8 eV y tiene lugar con el estado $^3(n\pi^*)$, y lo llamaremos $(^3n\pi^*/^1\pi\pi^*)_{STC}$. El segundo está situado a 4.0 eV, más lejos a lo largo del camino de relajación y cerca de la CI del tipo eteno con el estado fundamental, con el primer estado excitado triplete $^3(\pi\pi^*)$; lo designaremos como $(^3\pi\pi^*/^1\pi\pi^*)_{STC}$. Esta última estructura presenta el mismo tipo de geometría distorsionada al estilo *screw-boat puckered* con un doble enlace $C_5 = C_6$ como el de la CI con el estado fundamental, $(gs/^1\pi\pi^*)_{CI}$. Ambos procesos ISC tienen un SOC de unos 8 cm^{-1} .

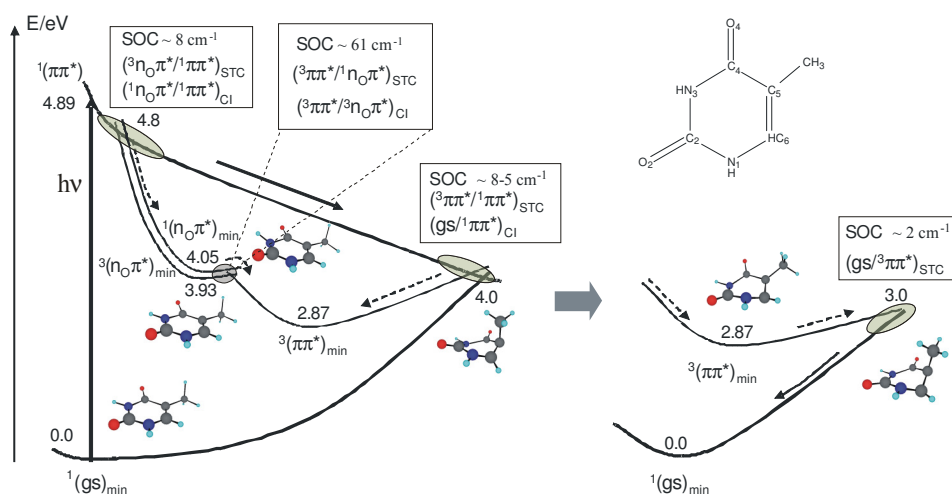


Figura 30. Fotoquímica de la timina y población del triplete.

La Figura 30 incluye un esquema que describe la población del estado T_1 por tres posibles vías:

- 1) $^1(\pi\pi^*) \rightarrow ^3(\pi\pi^*)$
- 2) $^1(\pi\pi^*) \rightarrow ^3(n\pi^*) \rightarrow ^3(\pi\pi^*)$
- 3) $^1(\pi\pi^*) \rightarrow ^1(n\pi^*) \rightarrow ^3(\pi\pi^*)$

Con respecto al proceso ISC de mayor energía, una vez que se ha poblado el estado $^3(n\pi^*)$, un MEP conduce directamente a su mínimo de energía, $^3(n\pi^*)_{\min}$, situado a 3.93 eV adiabáticamente con respecto al estado fundamental.

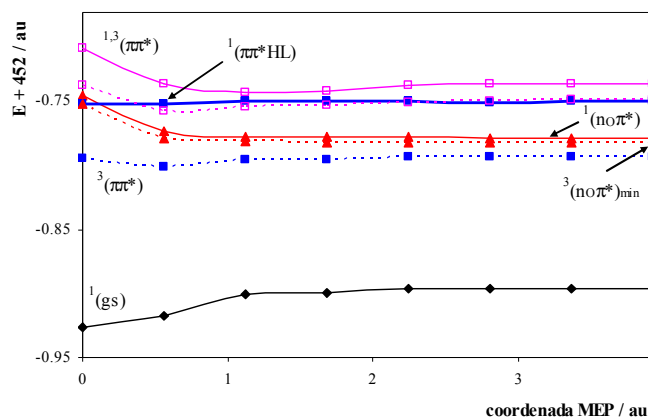


Figura 31. Evolución del MEP desde el STC (${}^3n_0\pi^*/{}^1\pi\pi^*$)_{STC} hasta el mínimo (${}^3n_0\pi^*$)_{min}.

Se localiza una intersección cónica prácticamente degenerada con el mínimo del estado ${}^3(n\pi^*)$. Este cruce conecta dicho estado con el estado ${}^3(\pi\pi^*)$ más bajo, con lo cual se puebla dicho estado, y desde ahí podría reaccionar la timina con la molécula de psoraleno.

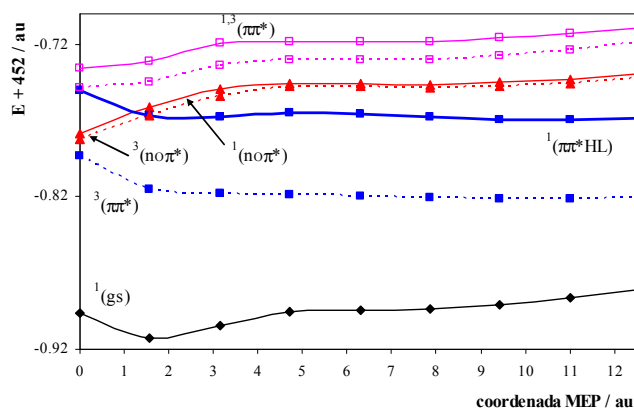


Figura 32. Evolución del MEP a lo largo del estado ${}^3(\pi\pi^*)$ desde la cónica (${}^3n_0\pi^*/{}^3\pi\pi^*$)_{CI} al mínimo (${}^3\pi\pi^*$)_{min}.

Otro MEP calculado sobre la hipersuperficie del estado T_1 conduce el sistema desde la cónica $(^3n\pi^*/^3\pi\pi^*)_{CI}$ al mínimo del estado $^3(\pi\pi^*)$. Este tipo de mecanismo que conecta los estados $\pi\pi^*$ singlete y triplete más bajos, a través de un estado $n\pi^*$, es precisamente lo que hemos encontrado también en el psoraleno.

Ambos mecanismos (1 y 2) pueden contribuir a la población del estado T_1 . En principio, el estado excitado de naturaleza $n\pi^*$ se desestabilizará en medios polares. A pesar de este efecto, se estima que ambos estados $n\pi^*$, singlete y triplete, se encuentren en presencia de solvente por debajo del estado $^1(\pi\pi^*$ HL) a la geometría Franck-Condon [286,287], garantizando la existencia de un cruce STC a lo largo del estado $^1(\pi\pi^*$ HL). La dependencia del rendimiento cuántico de ISC con la longitud de onda puede ser entendida por la localización de las dos regiones de STC y su accesibilidad según las condiciones de excitación iniciales [86].

Recientemente, Hare *et al.* [287] han informado de la presencia de otro mecanismo de desactivación en las bases pirimidínicas (mecanismo 3) en disolución a través de un estado oscuro intermedio que se corresponde con el singlete $^1(n\pi^*)$. Para explicar los rendimientos cuánticos de triplete de las pirimidinas, que son más elevados que en las purinas, se sugiere que una pequeña fracción de la población del estado experimenta un proceso ISC hacia el estado triplete más bajo. Según nuestros resultados, acordes con estudios teóricos previos [282,285], se confirma la existencia de dicho estado $^1(n\pi^*)$, situado casi isoenergéticamente con respecto a la cónica $(gs/^1\pi\pi^*)$, cerca de los 4 eV. El estado $^1(n\pi^*)$ debe ser relacionado entonces con el estado oscuro observado. Asimismo, dado que ambos estados, singlete y triplete $n\pi^*$, presentan hipersuperficies prácticamente paralelas debido a que estos estados presentan una integral de intercambio [177] muy pequeña, las situaciones de *cuasi*-degeneración con el estado $^3(\pi\pi^*)$ más bajo son idénticas para ambos estados.

Por tanto, encontramos un STC, $(^3\pi\pi^*/^1n\pi^*)_{STC}$, próximo a la cónica $(^3\pi\pi^*/^3n\pi^*)_{CI}$. Los SOC calculados en esta región, en torno a 61 cm^{-1} , garantizan un proceso ISC muy eficiente, confirmando este mecanismo como plausible en el proceso de población del estado excitado triplete más bajo.

Por tanto, existen tres mecanismos relevantes para la población del estado T_1 , que posteriormente alcanza su mínimo (*vide* Figura 30), a través del cual la timina podría reaccionar con el psoraleno para formar el monoadducto por el furano (FMA). En el mínimo de dicho estado, la molécula presenta una geometría distorsionada con un incremento de la distancia de enlace $C=C$, pasando de 1.346 \AA en el estado fundamental a 1.513 \AA . La elevada reactividad atribuida a este estado triplete se debe a su carácter biradicalario sobre los átomos de carbono del doble enlace. El mínimo se localiza adiabáticamente a 2.87 eV (*vide* Tabla VI), un valor consistente con el dato experimental de 3.2 eV [288]. La localización del estado triplete en la timina es también energéticamente menor que en la citosina [254], por efecto de la metilación [289].

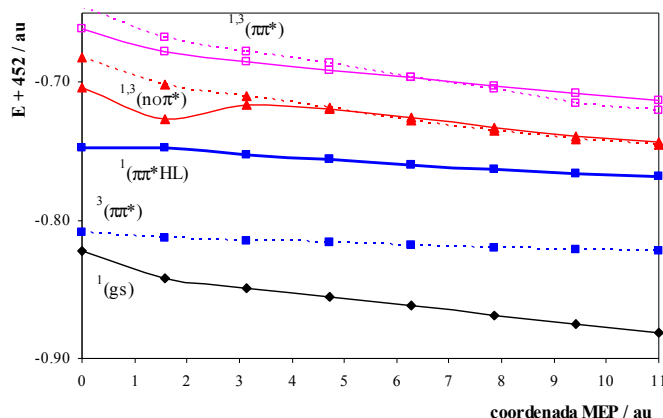


Figura 33. Evolución del MEP a lo largo del estado $^3(\pi\pi^*)$ desde el cruce singlete-triplete $(\text{gs}/^3\pi\pi^*)_{STC}$ hasta alcanzar el mínimo $^3(\pi\pi^*)_{\text{min}}$.

Por otro lado, hemos localizado el cruce STC que conecta el estado $^3(\pi\pi^*)$ y el estado fundamental y hemos calculado el MEP que va desde dicho STC hasta el mínimo de T_1 . El cruce se localiza cerca de los 3.0 eV a partir del mínimo del estado fundamental, lo cual implica que la barrera energética desde el $^3(\pi\pi^*)_{\min}$ para alcanzar el $(gs/{}^3\pi\pi^*)_{STC}$ es de 0.13 eV ($3.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). La molécula recupera la conformación plana, y el SOC calculado es algo bajo, $\approx 2 \text{ cm}^{-1}$, lo cual indica un tiempo de vida largo y una lenta relajación del estado triplete, siendo por tanto propenso a reaccionar, por ejemplo, con el psoraleno.

Una vez analizado cómo se puebla el estado triplete de la timina, es el momento de estudiar la formación y propiedades de los monoadductos, proceso en el cual interviene dicho estado, aparte del estado triplete del psoraleno. En lo referente a la interacción de fármacos con el ADN, una de las propiedades más importantes es la intercalación del fármaco entre las bases, favorecida por el fenómeno de *stacking* y la consiguiente deslocalización π -electrónica. Sin embargo, cálculos realizados por diversos autores a nivel RHF, DFT, MP2 y CCSD(T) del psoraleno y del 8-MOP [275], muestran que los complejos furocumarina-timina en estado fundamental son mucho más estables en una conformación en la que ambos fragmentos se encuentran en el mismo plano, y no en una conformación *stacked* o apilada. La fuerza de la interacción con la timina es diferente en ambos compuestos (el psoraleno presenta una interacción más fuerte), y este hecho es interpretado en función de los momentos dipolares y las polarizabilidades de los fragmentos implicados.

La formación de los monoadductos es un caso particular de reacción pericíclica. Tales reacciones son un caso arquetípico de la conservación de la simetría orbital, de acuerdo con las reglas de Woodward-Hoffmann [290,291,292]. Las cicloadiciones que ocurren térmicamente, como la Diels-Alder, que es del tipo [4+2], tienen lugar a través de intermedios “aromáticos” con $(4n+2)$ electrones π . Por el contrario, las cicloadiciones que no ocurren térmicamente por estar prohibidas por simetría, como por ejemplo la

dimerización de alquenos y de dienos, que son del tipo [2+2], tienen lugar a través de intermedios de reacción con $4n$ electrones π , y están permitidas fotoquímicamente.

Desde el punto de vista químico-cuántico, estas reacciones se explican con un modelo que tiene en cuenta los cruces entre las hipersuperficies de energía potencial de los estados electrónicos implicados. Verbigracia: la reacción entre dos moléculas de etileno tiene lugar debido a que la topología del estado S_1 presenta un mínimo que corresponde a una estructura que posee el mismo carácter de biradical que el estado de transición “antiaromático” en S_0 [239,293,294,295]. Por tanto, el punto clave en el mecanismo es la existencia de un canal favorable (cruce entre hipersuperficies) que permite la transición no radiativa $S_1 \rightarrow S_0$.

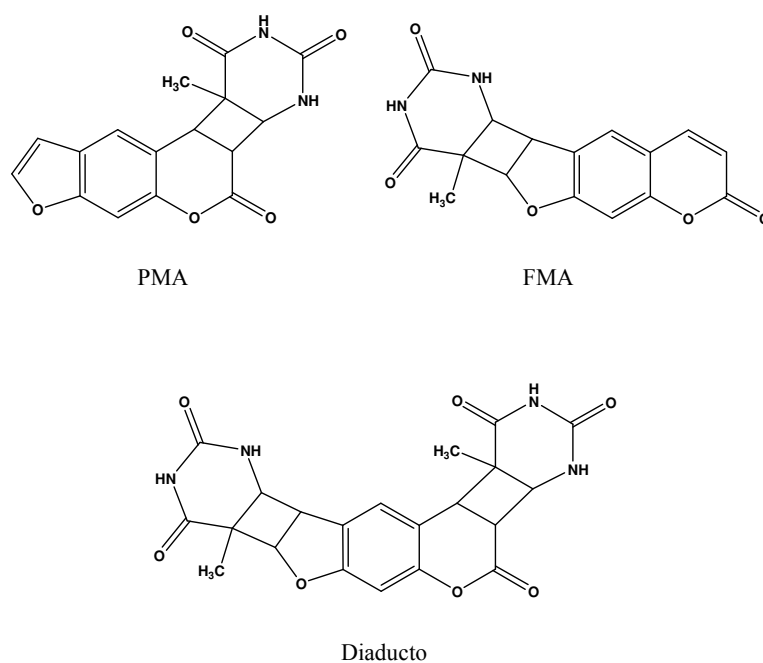


Figura 34. Monoadductos y diaducto psoraleno-timina.

En el caso de los monoadductos psoraleno-timina, están interaccionando dos dobles enlaces: el de la pirona o el del furano, por parte del psoraleno, y el doble enlace de la timina. Como hipótesis inicial, seleccionamos dos estructuras en los límites asintóticos: Psoraleno (S_0) + Timina (T_1) para el FMA; y Psoraleno (T_1) + Timina (S_0) para el PMA. De acuerdo con nuestros estudios previos, estos son los puntos de partida más probables para la fotorreactividad. En el estado triplete optimizado del psoraleno, el doble enlace $C = C$ de la pirona se alarga, con lo que la molécula es propensa a reaccionar por ese lado con la timina del ADN, dando lugar al PMA. En cambio, el FMA es más probable que se obtenga por reacción entre el estado excitado triplete más bajo de la timina y el estado fundamental del psoraleno.

Hemos analizado la evolución de los singletes y los tripletes más bajos para determinar las condiciones más favorables para la fotorreacción. A tenor de los resultados obtenidos de la familia de las furocumarinas y de la timina, el proceso fototerapéutico debería comenzar con la absorción de un fotón al estado $S_1(\pi\pi^*)$ de la furocumarina. Dado que el proceso es una fotocicloaddición [2+2], existen tres mecanismos posibles *a priori*:

- ✓ *Ruta singlete*: el estado $S_1(\pi\pi^*)$ de la supermolécula evoluciona siguiendo un camino eficiente hacia una CI con el estado fundamental, $(S_1/S_0)_{CI}$, que se comporta como un canal para una IC hacia el monoadducto en S_0 .
- ✓ *Ruta triplete*: incluyendo un proceso ISC adecuado, el sistema pasa del estado $S_1(\pi\pi^*)$ del psoraleno poblado inicialmente hacia estados triplete más bajos hasta llegar al estado $T_1(\pi\pi^*)$, y desde este estado el sistema evoluciona eficientemente hacia el STC $(T_1/S_0)_{STC}$, esto es, la estructura que conecta la hipersuperficie del T_1 con el estado

fundamental, lo que permite un segundo proceso ISC que conduce al monoadocto en su estado fundamental S_0 .

- ✓ *Transferencia de energía*: una tercera opción en la formación de aductos es a través del estado T_1 de la timina, siendo éste previamente poblado a través de transferencia de energía resonante merced a la acción de fotosensibilizadores endógenos (como otras nucleobases) o exógenos (como las propias furocumarinas) [296,297]. El sistema llegará a un punto de cruce $(T_1/S_0)_{STC}$ que conecta con el estado fundamental del monoadocto.

En todos los cálculos realizados se ha tenido en cuenta el efecto del BSSE [298]. En este caso tenemos dos efectos si comparamos los monoaductos con las moléculas aisladas: la distorsión geométrica cuando los enlaces están ya formados, y el efecto “puro” del BSSE debido a que cada monómero emplea las funciones matemáticas del otro. Por ello hemos calculado a cada geometría (infinito, STC, CI y mínimo), los estados de cada fragmento por separado, por un lado, y la supermolécula incluyendo funciones *ghost* sobre el psoraleno o sobre la timina, por otro. Las ecuaciones empleadas fueron:

$$E_{CP-correctado} = E_{\min, CI, STC, \text{inf}}^{FMA, PMA}(S_0, S_1, T_1) - BSSE(S_0)$$

$$BSSE(S_0) = [E_{Tim-ghost}^{monoadocto}(S_0) - E_{Tim}^{aislada}(S_0)] + [E_{Pso-ghost}^{monoadocto}(S_0) - E_{Pso}^{aislado}(S_0)]$$

Ecuación 19

Tabla VII. Corrección BSSE (en eV) para cada monoaducto y cada geometría. Podemos observar que tales correcciones son significativas.

	PMA				FMA			
	Min	STC	CI	Inf	Min	STC	CI	Inf
BSSE	0.81	0.51	0.53	0.26	0.81	0.53	0.43	0.09

Los esquemas que muestran los mecanismos de formación de los monoaductos dentro de la ruta triplete vienen dados en la Figura 35 y en la Figura 36. Como reactivos tenemos las dos moléculas aisladas, psoraleno (Pso) y timina (Tim). El cálculo considera ambas como constituyentes de una supermolécula y dichos fragmentos, optimizados en su estado correspondiente según el monoaducto, están separados una distancia de 10 Å. Por tanto, las energías de excitación desde el estado fundamental, Pso(S_0)+Tim(S_0), se dan como transiciones adiabáticas. Como ya se ha mencionado, la radiación UVA puebla el estado $S_1(\pi\pi^*)$ del psoraleno, situado adiabáticamente a 3.57 eV (en excelente concordancia con los resultados obtenidos para el psoraleno aislado a mayor nivel de cálculo, *vide* Tabla V), y, por medio de un proceso ISC eficiente, el sistema puede transferir su población al estado triplete más bajo de la molécula, $T_1(\pi\pi^*)$, situado a 2.58 eV. El alargamiento del doble enlace $C_3 = C_4$ de la pirona y la localización de la población de espín en dichos átomos de carbono dan fe del carácter reactivo de este enlace, que podrá reaccionar con el doble enlace de la timina $C_5 = C_6$ para formar PMAs. El mecanismo está detallado en la Figura 35, y comprende la evolución del sistema desde el sistema aislado, Pso(T_1)+Tim(S_0), que constituye un estado triplete global de la supermolécula, hacia un cruce singlete triplete, (S_0/T_1)_{STC}, calculado a nivel CASSCF, que conecta con el estado fundamental del PMA.

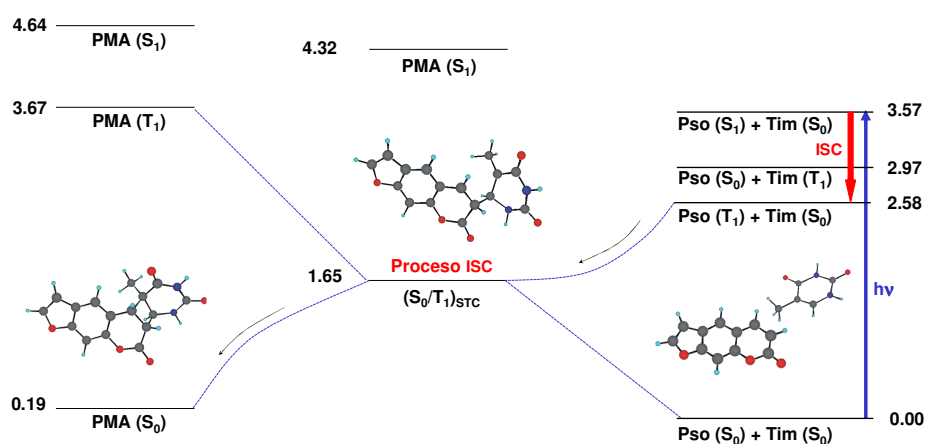


Figura 35. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del PMA en la ruta triplete vía STC. La fotorreacción comienza tras la población del estado T_1 del psoraleno mediante un proceso ISC a partir del estado S_1 .

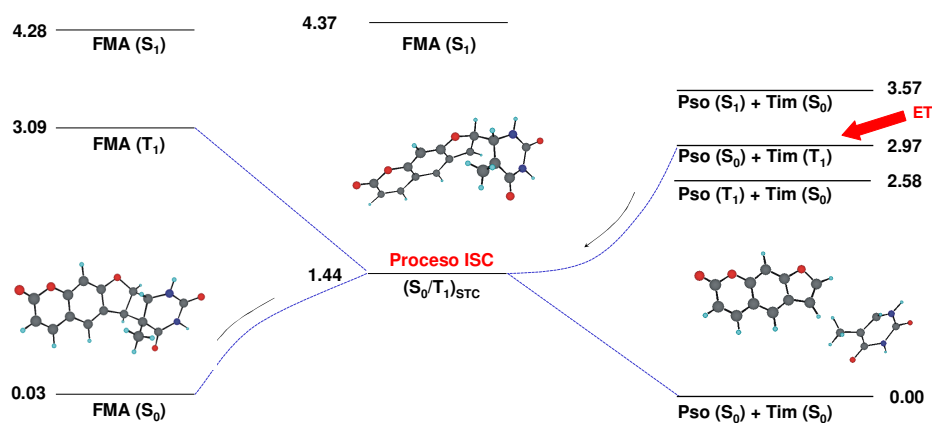


Figura 36. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del FMA en la ruta triplete vía STC. La fotorreacción comienza con la población del estado T_1 de la timina merced a un proceso de *energy transfer* (ET) desde un fotosensibilizador exógeno o endógeno.

En el STC hay un intermedio de reacción en el cual se ha formado un enlace covalente entre dos de los átomos de carbono de los dobles enlaces

reactivos, concretamente el C_3 del psoraleno y el C_6 de la timina, mostrando una longitud de enlace óptima de 1.563 Å, mientras que los otros dos átomos de carbono, C_4 y C_5 , respectivamente, permanecen más alejados, a 2.814 Å (*vide* Figura 37). Este tipo de intermedio, así como la presencia del cruce STC, es típico de las fotorreacciones de cicloadición [2+2] mediadas por triplete, en los casos de entorno químico asimétrico en los dobles enlaces. Por ejemplo, mientras que la fotocicloadición de dos moléculas de eteno conduce a un cruce evitado, sin STC entre los estados S_0 y T_1 , tal característica se pone de manifiesto en el fluoroeteno, donde el átomo de flúor rompe el entorno simétrico del doble enlace [297]. El camino hacia el intermedio STC desde los productos iniciales, localizado casi 0.9 eV por debajo, tendrá lugar sin barrera energética apreciable en muchos casos, como se ha probado en la fotocicloadición de las bases del ADN [297], aunque el proceso depende, en última instancia, de la inserción del fármaco en la hélice del ADN, de la difusión de las dos especies y de la flexibilidad de la estructura del ADN para que se puedan producir orientaciones reactivas.

La Figura 37 muestra las geometrías calculadas para los intermedios STC y los monoaductos ya formados. La estructura de ciclobutano en los monoaductos es muy similar a la encontrada en otras fotocicloadiciones de interés biológico, como las que conducen a los dímeros timina-timina ($T \diamond T$) y citosina-citosina ($C \diamond C$) [297]. Sin embargo, en este caso es más favorable una conformación *trans* con los fragmentos en planos distintos, a diferencia de los dímeros de pirimidina, en los cuales es más estable una conformación tipo *sandwich* debido probablemente al *stacking* [297].

Desde el intermedio STC, y tras el subsiguiente proceso ISC, el sistema evolucionará al estado fundamental del monoaducto PMA, que está situado 0.19 eV por encima de la referencia inicial (estado fundamental de la supermolécula a distancia infinita entre los fragmentos). El término SOC en la estructura STC es

de apenas 0.1 cm^{-1} , pero el efecto aumentará, probablemente, al considerar el acoplamiento vibrónico y los efectos del medio [126,268].

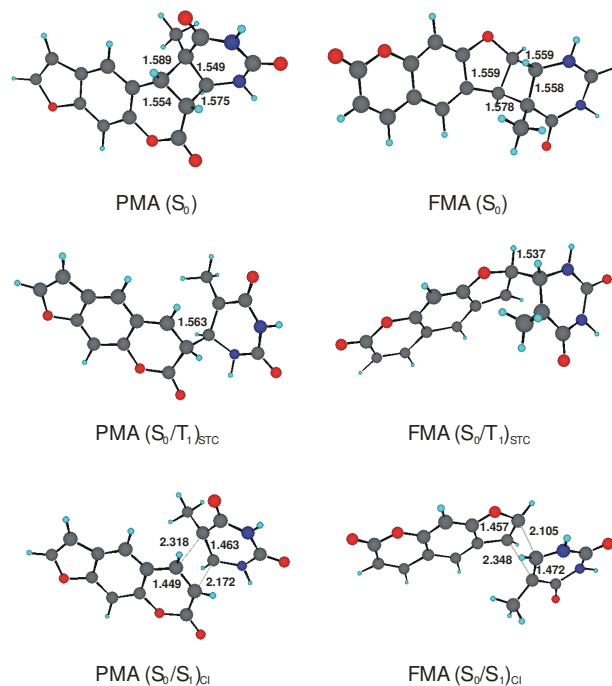


Figura 37. Estructuras optimizadas para el estado fundamental S_0 del PMA y del FMA, los cruces singlete-triplete (S_0/T_1)_{STC} e intersecciones cónicas (S_0/S_1)_{CI}. Las distancias C-C más relevantes vienen dadas en Å.

Por lo que respecta a la formación del FMA a lo largo de la ruta triplete, es improbable que tenga lugar por absorción directa de un fotón por el psoraleno y posterior población del estado T_1 de la molécula, ya que el fragmento de furano apenas es modificado en dicho estado; por tanto, el correspondiente enlace $C'_4 = C'_5$ no puede ser considerado reactivo. Sin embargo, es posible que exista un mecanismo alternativo a través de la timina. Aunque el estado S_1 de la nucleobase está demasiado alto energéticamente para ser poblado con la radiación empleada en la terapia PUVA, el estado T_1 sí puede ser poblado

mediante un proceso de transferencia de energía (*vide* Figura 36) si interacciona con un fotosensibilizador, endógeno o exógeno, eficiente. Entonces, el sistema psoraleno-timina puede evolucionar desde las condiciones iniciales, $Pso(S_0)+Tim(T_1)$, hasta el cruce $(S_0/T_1)_{STC}$ y, tras un proceso ISC, alcanzar el estado fundamental del FMA. El enlace covalente se forma entre los carbonos $C'_5 - C_6$, con una distancia de enlace de 1.537 Å, mientras que la distancia $C'_4 - C_5$ es de 2.964 Å. La estructura del intermedio STC es similar en ambos monoadductos, e implica la formación de un enlace covalente en C_6 , precisamente el átomo de carbono etilénico de la timina que no está unido al grupo metilo, lo cual se puede entender por razones estéricas. En la estructura STC el SOC es tres veces más pequeño que en el PMA, por lo que el proceso ISC será mucho menos eficiente en el FMA. Por todo lo anteriormente expuesto, a lo largo de la ruta triplete será más favorable la formación del PMA que la del FMA.

La estructura electrónica de ambos monoadductos es diferente. Mientras que el FMA presenta unas energías de excitación verticales a los estados triplete y singlete de 3.06 y 4.25 eV, respectivamente, las energías correspondientes en el PMA suben hasta 3.48 eV y 4.45 eV, respectivamente. Ambas excitaciones implican solamente al fragmento del psoraleno. La primera conclusión que podemos extraer es que es el estado $S_1(\pi\pi^*)$ del FMA (y no del PMA, localizado demasiado alto en energía) el más favorable para absorber el segundo fotón que desembocará en la formación del diadducto timina-psoraleno-timina. Esta hipótesis está reforzada por el análisis de las propiedades del estado T_1 . Optimizando el estado excitado triplete más bajo de ambos monoadductos a nivel CASSCF, identificamos que la población de espín está localizada preferentemente en el enlace $C_3 = C_4$ del anillo de pirona en el FMA, mientras que en el PMA está deslocalizada por todo el fragmento de psoraleno (*vide* Figura 38). Por tanto, la formación de diadductos está favorecida en el FMA, ya que el otro doble enlace reactivo, que no reaccionó con la primera timina, es

susceptible de reaccionar con otra molécula de timina en la cadena opuesta del ADN. Este hecho explica el hallazgo experimental de la no formación de diaductos a partir del PMA [140,147].

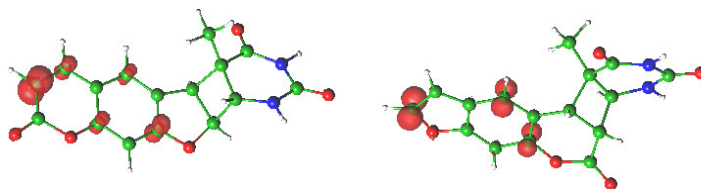


Figura 38. Población de espín en el estado T_1 de los monoadductos (FMA –izquierda–; PMA –derecha–). El FMA presenta densidad en los átomos de carbono del enlace $C_3=C_4$ de la pirona.

La producción de diaductos a partir del FMA puede verse mermada como consecuencia de la fotorreversibilidad desde el FMA hacia las moléculas de psoraleno y timina por separado. De hecho, ciertos experimentos sostienen tal hipótesis. Asimismo, los monoadductos FMA se descomponen en los reactivos originales tras irradiación con luz UV media a 4.89 eV [150]. Además, tanto los mono- como los diaductos pueden descomponerse en sus monómeros originales tras irradiación con longitud de onda UV corta [94,138]. Junto a otros factores, la distribución de aductos en muestras de ADN parece depender también de la longitud de onda de irradiación. El incremento de energía absorbida favorece la formación de diaductos frente a la de monoadductos [148], lo que puede interpretarse de acuerdo con la mayor energía del estado excitado singlete inicialmente poblado del monoadducto (con respecto al psoraleno), tal y como hemos calculado.

Dado que la formación del FMA no es muy favorable a lo largo de la ruta triplete, conviene explorar la formación de ambos monoadductos en la ruta singlete. A pesar de que en el psoraleno la población del estado T_1 a partir del estado S_1 inicialmente poblado es muy eficiente, parte de la población del estado

singlete puede evolucionar hacia una intersección cónica con el estado fundamental, $(S_0/S_1)_{CI}$, que puede comportarse como un canal para un proceso de conversión interna (IC) hacia la formación del monoadducto en estado fundamental. Este tipo de fotorreacción no requiere que los dobles enlaces reactivos se alarguen, como ocurría con los tripletes. Sin embargo, en las estructuras CI, calculadas a nivel CASSCF, observamos que los dobles enlaces reactivos de la timina y del psoraleno se alargan *ca.* 1 Å a partir de su estructura inicial S_1 . La Figura 39 y la Figura 40 muestran los esquemas de formación de los monoadductos a lo largo del *singlet manifold* tras poblarse el estado S_1 del psoraleno. La diferencia energética respecto al canal inicial, $Pso(S_1)+Tim(S_0)$, es menor que en el caso de la ruta triplete, pero aun así la CI es menor en energía, sobre todo en el caso del PMA.

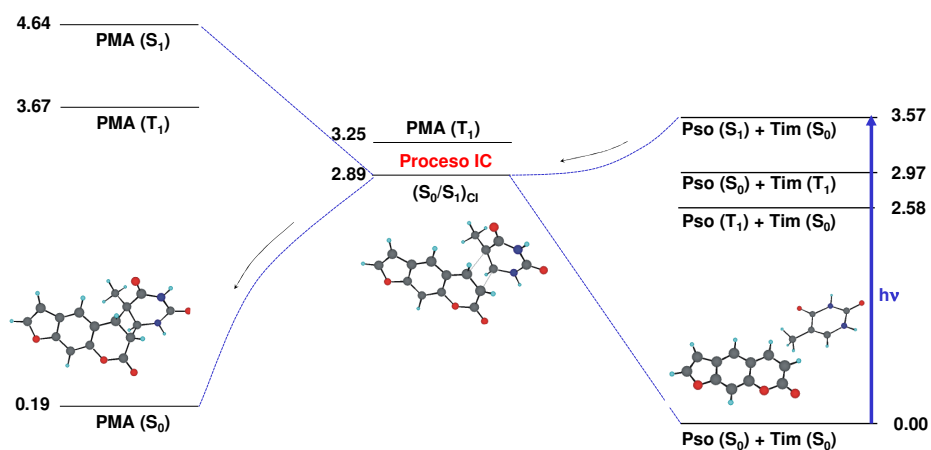


Figura 39. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del PMA vía CI en la ruta singlete. La fotorreacción comienza por población directa del estado S_1 del psoraleno por luz UVA.

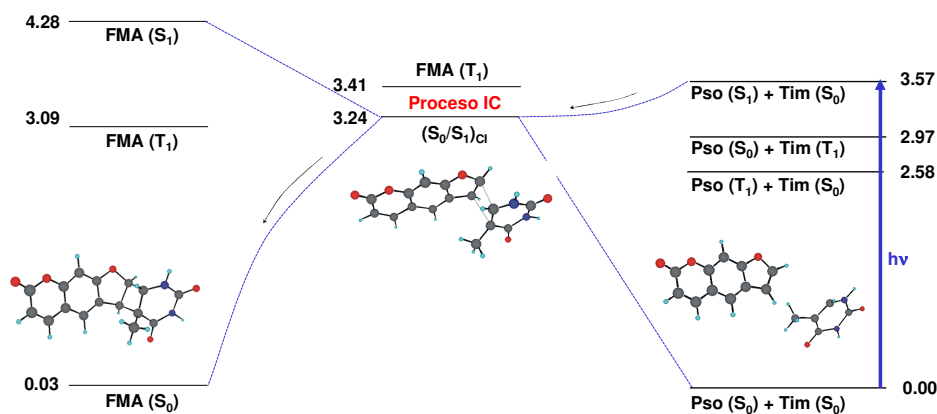


Figura 40. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del FMA vía CI en la ruta singlete. La fotorreacción comienza con la población directa del estado S_1 del psoraleno por luz UVA.

En las cónicas, la estructura del sistema es de tipo romboide, muy similar a otras cicloadiciones [2+2] [297], con los átomos de carbono de los dos fragmentos separados por 2.1-2.3 Å (*vide* Figura 37). A partir de la cónica el sistema puede evolucionar *a posteriori* dando lugar al monoadducto en estado fundamental.

Las fotocicloadiciones [2+2] mediadas por singletes son muy eficientes en otros sistemas biológicos, incluso más que mecanismos que impliquen transiciones prohibidas por el espín. En concreto, los estudios sobre la dimerización de la timina concluyen que esta reacción puede ser calificada como ultrarrápida, formándose los dímeros en ~ 1 ps tras la irradiación, lo que indica un mecanismo de reacción sin apenas barreras energéticas significativas si las bases están convenientemente orientadas en el instante de la absorción de luz [299]. Por tanto, como en la ruta triplete, la eficiencia del proceso dependerá de la orientación de las especies, de su difusión en el medio de reacción y de la flexibilidad del ADN, o incluso de la presencia de fotosensibilizadores que puedan pasar directamente al camino triplete mediante transferencia de energía.

Considerando los cuatro mecanismos propuestos, sugerimos que la formación del PMA tiene lugar principalmente a través de la ruta triplete, mientras que el FMA se formará preferentemente a lo largo de la ruta singlete.

4.2. Estudio de otras furocumarinas

El siguiente objetivo, tras estudiar la molécula de psoraleno, es analizar el resto de furocumarinas que tienen interés clínico: 8-MOP, 5-MOP, TMP, kelina y 3-CPS. Todas ellas son empleadas (o están siendo probadas) en humanos.

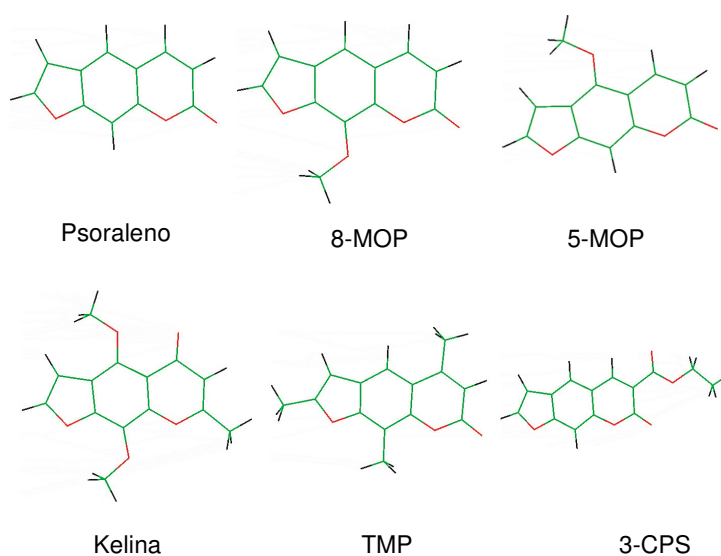


Figura 41. Moléculas de psoraleno, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 5-metoxipsoraleno (5-MOP), kelina, trimetilpsoraleno (TMP) y 3-carbetoxipsoraleno (3-CPS), en estado fundamental.

La fuerte dependencia de las propiedades espectroscópicas respecto del disolvente empleado, y la falta de estudios experimentales modernos, dificultan enormemente la racionalización de sus propiedades. Para el estudio de la fotofísica de estos compuestos, se ha empleado la misma estrategia computacional que en el caso del psoraleno, empleando un espacio activo (*vide* Tabla III). Las propiedades fotofísicas y estructurales más relevantes de las furocumarinas se presentan a continuación.

Tabla VIII. Propiedades fotofísicas del 8-MOP. Energía en eV, momento dipolar en D, y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno (vide Figura 21).

Estado	ΔE		f	d	d_{dir}	TDM_{dir}
	CASSCF	CASPT2				
$1^1A'$	-	-	-	6.78	-41	-
$2^1A'(\pi\pi^*)$	4.51	3.90	0.006	7.33	-37	23
$3^1A'(\pi\pi^*)$	6.30	4.96	0.101	8.85	-17	-13
$1^1A''(n\pi^*)$	4.13	5.01	0.000	2.66	-36	-
$4^1A'(\pi\pi^*)$	6.99	5.33	0.354	7.59	-31	23
$5^1A'(\pi\pi^*)$	6.55	5.54	0.260	5.89	-35	39
$6^1A'(\pi\pi^*)$	7.30	5.62	0.016	7.14	-25	-12
$7^1A'(\pi\pi^*)$	6.84	5.89	0.101	6.41	-19	47
$8^1A'(\pi\pi^*)$	7.16	6.08	0.096	7.52	-30	-87
$9^1A'(\pi\pi^*)$	7.90	6.09	0.051	6.60	-44	-13
$10^1A'(\pi\pi^*)$	7.72	6.12	0.060	5.85	-28	29
$1^3A'(\pi\pi^*)$	3.17	3.16	-	6.75	-42	-
$2^3A'(\pi\pi^*)$	3.73	3.51	-	6.39	-41	-
$3^3A'(\pi\pi^*)$	4.30	3.80	-	7.07	-33	-
$4^3A'(\pi\pi^*)$	6.08	4.48	-	6.50	-23	-
$5^3A'(\pi\pi^*)$	4.77	4.63	-	7.14	-39	-
$6^3A'(\pi\pi^*)$	5.03	4.76	-	6.70	-38	-
$1^3A''(n\pi^*)$	3.97	4.85	-	2.43	-36	-

Tabla IX. Propiedades fotofísicas del 5-MOP. Energía en eV, momento dipolar en D, y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno (vide Figura 21).

Estado	ΔE		f	d	d_{dir}	TDM_{dir}
	CASSCF	CASPT2				
$1^1 A'$	-	-	-	7.79	200	-
$2^1 A'(\pi\pi^*)$	4.53	3.96	0.002	8.15	196	143
$3^1 A'(\pi\pi^*)$	6.35	4.92	0.193	9.78	178	156
$1^1 A''(n\pi^*)$	4.17	5.05	0.001	3.26	202	-
$4^1 A'(\pi\pi^*)$	6.72	5.39	0.154	8.39	200	154
$5^1 A'(\pi\pi^*)$	7.00	5.70	0.273	6.96	190	116
$6^1 A'(\pi\pi^*)$	6.73	5.72	0.042	8.23	191	203
$7^1 A'(\pi\pi^*)$	7.79	6.01	0.223	8.98	188	135
$8^1 A'(\pi\pi^*)$	7.36	6.08	0.175	6.15	197	162
$9^1 A'(\pi\pi^*)$	7.92	6.18	0.248	6.27	220	181
$10^1 A'(\pi\pi^*)$	7.21	6.18	0.042	7.25	195	118
$1^3 A'(\pi\pi^*)$	3.16	3.14	-	7.38	200	-
$2^3 A'(\pi\pi^*)$	3.79	3.60	-	7.59	199	-
$3^3 A'(\pi\pi^*)$	4.40	3.98	-	7.83	198	-
$4^3 A'(\pi\pi^*)$	6.27	4.49	-	8.99	191	-
$5^3 A'(\pi\pi^*)$	4.79	4.67	-	7.84	199	-
$6^3 A'(\pi\pi^*)$	5.09	4.86	-	7.64	199	-
$1^3 A''(n\pi^*)$	4.00	4.89	-	3.33	201	-

Tabla X. Propiedades fotofísicas de la kelina. Energía en eV, momento dipolar en D, y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.

<i>Estado</i>	ΔE		<i>f</i>	<i>d</i>	<i>d_{dir}</i>	<i>TDM_{dir}</i>
	<i>CASSCF</i>	<i>CASPT2</i>				
$1^1A'$	-	-	-	4.41	33	-
$2^1A'(\pi\pi^*)$	5.19	3.52	0.012	5.15	28	118
$1^1A''(n\pi^*)$	3.78	4.00	0.000	2.43	-9	-
$3^1A'(\pi\pi^*)$	6.07	4.06	0.060	7.22	43	71
$4^1A'(\pi\pi^*)$	7.43	5.02	0.152	9.50	20	206
$5^1A'(\pi\pi^*)$	7.85	5.26	0.135	4.74	48	118
$6^1A'(\pi\pi^*)$	7.09	5.34	0.410	4.39	45	192
$7^1A'(\pi\pi^*)$	7.60	5.38	0.187	8.32	19	154
$2^1A'(n\pi^*)$	6.15	5.84	0.000	1.65	35	-
$8^1A'(\pi\pi^*)$	8.07	5.91	0.322	4.60	32	185
$1^3A'(\pi\pi^*)$	3.68	3.05	-	4.29	37	-
$2^3A'(\pi\pi^*)$	4.37	3.43	-	6.03	31	-
$1^3A''(n\pi^*)$	3.95	3.61	-	2.43	-21	-
$3^3A'(\pi\pi^*)$	4.90	4.16	-	4.80	26	-
$4^3A'(\pi\pi^*)$	5.11	4.33	-	4.70	38	-
$5^3A'(\pi\pi^*)$	4.55	4.37	-	3.73	25	-
$6^3A'(\pi\pi^*)$	6.19	4.88	-	4.52	41	-
$2^3A''(n\pi^*)$	5.83	5.13	-	1.61	-88	-

Tabla XI. Propiedades fotofísicas del TMP. Energía en eV, momento dipolar en D, y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.

<i>Estado</i>	ΔE		<i>f</i>	<i>d</i>	<i>d_{dir}</i>	<i>TDM_{dir}</i>
	<i>CASSCF</i>	<i>CASPT2</i>				
$1^1 A'$	-	-	-	6.56	48	-
$2^1 A'(\pi\pi^*)$	5.08	3.57	0.063	7.35	38	-2
$3^1 A'(\pi\pi^*)$	6.20	4.47	0.146	9.77	18	5
$4^1 A'(\pi\pi^*)$	6.89	4.68	0.168	7.31	24	-59
$1^1 A''(n\pi^*)$	5.17	4.92	0.000	1.90	58	-
$5^1 A'(\pi\pi^*)$	7.21	5.08	0.533	8.28	31	3
$6^1 A'(\pi\pi^*)$	7.77	5.69	0.025	8.25	26	0
$7^1 A'(\pi\pi^*)$	7.37	5.75	0.198	6.63	48	12
$8^1 A'(\pi\pi^*)$	7.29	5.88	0.063	7.06	54	-13
$9^1 A'(\pi\pi^*)$	8.24	6.28	0.083	6.14	60	13
$10^1 A'(\pi\pi^*)$	8.38	6.42	0.117	7.40	42	38
$1^3 A'(\pi\pi^*)$	3.54	3.04	-	6.13	49	-
$2^3 A'(\pi\pi^*)$	3.96	3.34	-	6.44	49	-
$3^3 A'(\pi\pi^*)$	4.67	3.61	-	6.95	40	-
$4^3 A'(\pi\pi^*)$	5.04	4.29	-	7.31	38	-
$5^3 A'(\pi\pi^*)$	5.28	4.50	-	6.45	48	-
$6^3 A'(\pi\pi^*)$	6.04	4.52	-	7.29	39	-
$1^3 A''(n\pi^*)$	5.05	4.78	-	2.06	59	-

Tabla XII. Propiedades fotofísicas del 3-CPS. Energía en eV, momento dipolar en D, y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.

Estado	ΔE		f	d	d_{dir}	TDM_{dir}
	CASSCF	CASPT2				
$1^1 A'$	-	-	-	4.01	-45	-
$2^1 A'(\pi\pi^*)$	4.46	3.73	0.030	5.31	-29	15
$3^1 A'(\pi\pi^*)$	6.04	4.38	0.373	9.57	-11	3
$1^1 A''(n\pi^*)$	4.67	4.85	0.000	0.66	66	-
$4^1 A'(\pi\pi^*)$	6.70	5.06	0.448	7.75	-16	-59
$5^1 A'(\pi\pi^*)$	7.01	5.13	0.241	9.17	-27	11
$6^1 A'(\pi\pi^*)$	6.53	5.29	0.040	6.33	-29	-16
$7^1 A'(\pi\pi^*)$	7.39	6.05	0.035	6.43	-20	-3
$8^1 A'(\pi\pi^*)$	8.14	6.17	0.231	9.76	-17	56
$9^1 A'(\pi\pi^*)$	7.85	6.26	0.027	3.83	-52	-30
$2^1 A'(n\pi^*)$	6.82	6.45	0.000	0.91	18	-
$1^3 A'(\pi\pi^*)$	3.34	2.88	-	3.67	-43	-
$2^3 A'(\pi\pi^*)$	3.87	3.32	-	4.43	-43	-
$3^3 A'(\pi\pi^*)$	4.58	3.54	-	5.67	-29	-
$4^3 A'(\pi\pi^*)$	4.98	4.20	-	5.05	-31	-
$5^3 A'(\pi\pi^*)$	5.19	4.43	-	4.32	-43	-
$6^3 A'(\pi\pi^*)$	6.05	4.70	-	5.29	-35	-
$1^3 A''(n\pi^*)$	4.55	4.72	-	0.49	66	-

Tabla XIII. Principales propiedades espectroscópicas de las furocumarinas. Energías en eV y SOC en cm^{-1} .

Compuesto	S_{π}				S_n				T_{π}				T_n			
	E_{VA}	f	T_e	τ_{rad}/ns	E_{VA}	f	T_e	$\tau_{rad}/\mu\text{s}$	E_{VA}	T_e	τ_{rad}/s	SOC	E_{VA}	T_e	τ_{rad}/ms	SOC
Psoraleno	3.98	0.027	3.59	74	5.01	$\approx 10^{-4}$	3.91	3	3.27	2.76	28	$< 10^{-1}$	4.85	3.84	9	46
8-MOP	3.90	0.006	3.50	254	5.01	$\approx 10^{-4}$	3.91	3	3.16	2.72	60	$< 10^{-1}$	4.85	3.84	1	47
5-MOP	3.96	0.002	3.60	971	5.05	$\approx 10^{-4}$	3.95	3	3.14	2.66	95	$< 10^{-1}$	4.89	3.88	0.1	47
Kelina	3.52	0.012	3.26	189	4.00	$\approx 10^{-6}$	3.26	3 ms	3.05	2.83	3.4 h	< 1	3.61	3.03	9	40
TMP	3.57	0.06	3.25	38	4.92	$\approx 10^{-4}$	3.91	3	3.04	2.63	180	$< 10^{-1}$	4.78	3.73	1	46
3-CPS	3.73	0.03	3.05	100	4.84	$\approx 10^{-4}$	3.59	4	2.88	2.40	81	$< 10^{-1}$	4.72	3.58	32	44

Tabla XIV. Longitud de los dobles enlaces de los anillos de furano (F) y pirona (P) según molécula y estado electrónico [a enlace $C_4'C_5'$; b enlace C_3C_4 excepto para la kelina, que es C_2C_3 (vide Figura 5 y Figura 6); c población de espín localizada en cada carbono].

Compuesto	$d(C=C)_F / \text{\AA}^a$					$d(C=C)_P / \text{\AA}^b$				
	S_0	S_{π}	S_n	T_{π}	T_n	S_0	S_{π}	S_n	T_{π}	T_n
Psoraleno	1.348	1.365	1.345	1.344 (0.05,0.00) ^c	1.345	1.342	1.373	1.428	1.469 (0.31,0.73)	1.419
8-MOP	1.346	1.362	1.343	1.342 (0.05,0.00)	1.343	1.341	1.382	1.426	1.469 (0.32,0.76)	1.417
5-MOP	1.345	1.365	1.343	1.343 (0.00,0.04)	1.343	1.342	1.377	1.427	1.467 (0.29,0.78)	1.420
Kelina	1.337	1.352	1.339	1.444 (0.81,0.19)	1.339	1.332	1.328	1.351	1.333 (0.00,0.08)	1.346
TMP	1.348	1.365	1.346	1.345 (0.06,0.14)	1.346	1.345	1.374	1.429	1.475 (0.34,0.66)	1.421
3-CPS	1.343	1.363	1.363	1.342 (0.00,0.02)	1.343	1.344	1.418	1.442	1.472 (0.40,0.71)	1.435

Para comparar todos estos compuestos entre sí y con la molécula parental, hemos destacado las propiedades fotofísicas más relevantes, así como los parámetros estructurales más interesantes desde el punto de vista del mecanismo fototerapéutico, esto es, la longitud de los dobles enlaces de la pirona y del furano (*vide* Tabla XIII y Tabla XIV). Estos guarismos muestran que el estado poblado inicialmente, S_π ($S_1 \pi\pi^*$), es claramente más alto en energía para el psoraleno, 8-MOP y 5-MOP, mientras que las transiciones asociadas no presentan fuerzas de oscilador elevadas. La kelina y el TMP, por otra parte, tienen transiciones asociadas en la zona del UV cercano más intensas, representando una gran ventaja desde el punto de vista fotoquímico. El 3-CPS constituye una situación intermedia. Las propiedades de emisión del estado son similares en todos los casos, mientras que los tiempos radiativos calculados mediante la aproximación de Strickler-Berg [265] tienden a ser cercanos al valor experimental o, como mucho, un orden de magnitud superior (~ 1 -100 ns) [110], lo cual indica la existencia de canales de decaimiento no radiativos. Viendo la Tabla XIV podemos constatar como, al igual que en la molécula parental, el estado S_π está deslocalizado por toda la extensión de la molécula, y no se observa una elongación significativa de ninguno de los dos dobles enlaces reactivos, sea del furano o de la pirona. Sin embargo, el 3-CPS constituye una excepción ya que el enlace $C_3 = C_4$ se alarga en este estado, sin duda por la influencia del sustituyente de etilmetanoato. Otros estados excitados singlete $\pi\pi^*$ han sido obtenidos al mismo nivel de cálculo para los seis sistemas a energías 0.5-1.0 eV mayores que el S_1 , con transiciones asociadas más intensas, pero cuya participación en los procesos fotoquímicos desencadenantes de la acción fotosensibilizadora se estima mucho menor.

Con respecto a los estados $n\pi^*$ más bajos, S_n y T_n , están en todos los casos relacionados con el par solitario del oxígeno carbonílico situado en el anillo de pirona. No hay grandes diferencias entre sus propiedades al pasar de una molécula a otra, salvo en el caso de la kelina, donde las energías de

excitación son *ca.* 1.0 eV menores. No obstante, la kelina posee un esqueleto diferente, lo cual puede ser el origen de este comportamiento excepcional. Ello también afecta a las propiedades de emisión del estado S_n , que en la kelina es isoenergético con el S_1 y muestra un tiempo radiativo relativamente largo. Con respecto al mecanismo de población del estado triplete más bajo, es importante señalar que en la kelina los estados S_π y T_n se encuentran prácticamente degenerados ya en la región Franck-Condon. A pesar de que el SOC entre ambos estados no es muy grande (3 cm^{-1}), esta degeneración puede ser la clave de un mecanismo ISC eficiente hacia el estado T_n , seguido de un proceso de conversión interna hasta el estado $T_\pi (T_1 \pi\pi^*)$.

Finalmente, podemos comparar los resultados obtenidos para el estado T_π . La tendencia es similar en todas las furocumarinas, situándose este estado 0.5-0.7 eV por debajo de cualquier otro estado excitado. Sin embargo, se pueden observar diferencias importantes en la kelina. Esta molécula localiza la población de espín de Mulliken [177,300] del estado T_π en el doble enlace del anillo de furano, $C'_4 = C'_5$, a diferencia de los otros derivados, que hacen lo propio en el anillo de pirona, $C_3 = C_4$, lo cual se pone de manifiesto con el alargamiento de un enlace u otro en el estado optimizado, tal y como se contempla en la Tabla XIV. Esto sugiere que, mientras que los otros derivados forman monoadductos por la pirona (PMA), la kelina formará preferentemente monoadductos por el furano (FMA).

Respecto a las propiedades de emisión, los orígenes de banda electrónicos de fosforescencia obtenidos son muy cercanos (a menos de 0.1 eV) a los valores experimentales del origen de banda vibracional: psoraleno (2.7 eV), 8-MOP (2.68 eV), 5-MOP (2.60 eV) y TMP (2.74 eV) [107]. Por otro lado, los tiempos radiativos de fosforescencia obtenidos se diferencian apenas en un orden de magnitud de los valores experimentales ($\sim 1 \text{ s}$) [110], excepto para la kelina, en la que obtuvimos un valor de 3.4 horas (12240 s). Este hecho refleja,

probablemente, que la aproximación de Strickler-Berg no es válida en este caso, dado que no debe aplicarse si existen canales de decaimiento no radiativo hacia otros estados, como en realidad ocurre. No obstante, la kelina es un sistema muy conveniente al poseer un estado triplete metaestable de tanta duración, siempre y cuando los procesos no radiativos desde dicho estado T_π se conviertan en predominantes.

En resumen, el estudio de la Fotofísica de estos compuestos indica que, a pesar de que no se observan grandes diferencias respecto del psoraleno, estos derivados serán más efectivos en fototerapia a través del estado T_π , bien porque el estado inicial S_1 se puebla más fácilmente (menores energías e intensidades mayores), como en el caso de la kelina, TMP o 3-CPS, o bien porque el estado T_π presenta una vida media más larga.

A partir de la Tabla XV podemos deducir algunos de los cambios que tendrán lugar en la ordenación relativa de los estados cuando consideremos las interacciones con el disolvente.

Tabla XV. Momentos dipolares en Debyes (D) de los estados electrónicos más bajos de las furocumarinas. La diferencia con respecto a cada estado fundamental se da entre paréntesis.

	S_0	$S_1 (\pi\pi^*)$	$S_n (n\pi^*)$	$T_1 (\pi\pi^*)$	$T_n (n\pi^*)$
Psoraleno	6.25	6.50 (+0.25)	2.07 (-4.18)	5.40 (-0.85)	2.15 (-4.10)
8-MOP	6.78	7.33 (+0.55)	2.66 (-4.12)	6.75 (-0.03)	2.77 (-4.01)
5-MOP	7.79	8.15 (+0.36)	3.26 (-4.53)	7.38 (-0.41)	3.33 (-4.46)
Kelina	4.41	5.15 (+0.74)	2.43 (-1.98)	4.29 (-0.12)	2.43 (-1.98)
TMP	6.56	7.35 (+0.79)	1.90 (-4.66)	6.13 (-0.43)	2.06 (-4.50)
3-CPS	4.01	5.31 (+1.30)	0.66 (-3.35)	3.67 (-0.34)	0.49 (-3.52)

En solventes polares como el agua se estabilizarán los estados con mayor momento dipolar. Aunque para obtener conclusiones fidedignas hemos de realizar cálculos químico-cuánticos considerando la presencia de moléculas de disolvente [173,183,301], en primera aproximación podemos analizar los momentos dipolares obtenidos en fase gas: así, el compuesto que *a priori* menos

cambios sufrirá es la kelina, ya que sus estados excitados presentan momentos dipolares muy cercanos al del estado fundamental.

Tal y como hicimos en el caso del psoraleno, nuestro objetivo es hallar un camino eficiente de población del estado excitado triplete más bajo de cada derivado. Dado que el estado S_1 es el único directamente poblado por absorción directa en el rango de radiación UV-A típicamente empleado en fototerapia (3.1-3.9 eV) [82,83,84], éste será nuestro estado de partida.

Un proceso ISC efectivo requiere, como ya hemos comentado, dos condiciones: una diferencia de energía entre estados pequeña y un SOC elevado entre ambos. Siguiendo el mismo razonamiento que con el psoraleno, hemos investigado este proceso entre los estados S_π y T_n . A la geometría Franck-Condon ambas condiciones no son satisfechas, salvo en el caso de la kelina, en la cual la diferencia de energía ($S_\pi - T_n$) es de sólo 0.09 eV y el SOC, aunque pequeño (3 cm^{-1}), es perceptible. Consecuentemente, el proceso ISC mencionado puede ser considerado muy favorable. Es más, teniendo en cuenta los valores obtenidos en los momentos dipolares (*vide* Tabla XIII y Tabla XV), no es probable un gran cambio en este resultado, como ya hemos comentado. En los restantes compuestos, es improbable un ISC directo tras la absorción, especialmente por el *gap*: psoraleno ($\Delta E = 0.87 \text{ eV}$; SOC = 3 cm^{-1}), 8-MOP ($\Delta E = 0.95 \text{ eV}$; SOC = 3 cm^{-1}), 5-MOP ($\Delta E = 0.93 \text{ eV}$; SOC = 3 cm^{-1}), TMP ($\Delta E = 1.21 \text{ eV}$; SOC = 6 cm^{-1}) y 3-CPS ($\Delta E = 0.98 \text{ eV}$; SOC = 4 cm^{-1}). Es más, esta diferencia de energía probablemente aumentará en disolventes polares. En cualquier caso, la molécula evolucionará rápidamente a través de la hipersuperficie del estado S_π y, por tanto, es posible encontrar regiones de la hipersuperficie donde se pueda producir un ISC favorable, en cuanto a valores de SOC y *gap* se refiere. Si dichas regiones son fácilmente accesibles pueden ser el origen de la población del triplete. Por ello, hemos realizado una interpolación lineal en coordenadas internas (LIIC) a partir del mínimo del estado S_π hasta el mínimo del estado S_n en cada furocumarina para analizar los perfiles de los

diferentes estados a lo largo de ese camino, considerado apropiado para encontrar el cruce singlete-triplete, STC, dado que los estados S_n y T_n comparten la misma estructura.

A lo largo del LIIC, el principal cambio geométrico en las estructuras moleculares es el alargamiento del doble enlace $C = O$, debido al cambio de naturaleza de $\pi\pi^*$ a $n_O\pi^*$. Una vez el estado S_π ha sido poblado, el sistema puede evolucionar fácilmente hasta su mínimo, y entonces puede acaecer el fenómeno de la fluorescencia. ¿Es, además, factible la desactivación hacia otros estados?

Empezando por la Figura 42, referente a psoraleno, 8-MOP y 5-MOP, los perfiles obtenidos para los diferentes estados son muy similares. Como ocurre en el psoraleno, los dos últimos no cumplen las condiciones para un ISC eficiente en la región Franck-Condon. El SOC entre el S_π y otros tripletes $\pi\pi^*$ (como T_2 o T_3) son también bajos. En cambio, el SOC entre el estado S_π y el estado T_n es más elevado (3-5 cm^{-1}). El *gap* ($S_\pi - T_n$) es, sin embargo, demasiado elevado como para pensar que pueda haber un ISC eficiente en el mínimo del S_π , esto es, en $(S_\pi)_{MIN}$. Por tanto, hay que analizar el camino LIIC. En todos los compuestos, el único estado que interacciona de forma intensa con el S_π es el T_n . El análisis de la accesibilidad del STC $(S_\pi/T_n)_X$ da buena cuenta de la eficiencia relativa del proceso ISC. En las tres moléculas, el cruce STC tiene lugar entre los puntos 2 y 3. Las barreras aproximadas que el sistema debe superar para alcanzar el estado T_n son: 0.42 eV (Pso), 0.39 eV (8-MOP) y 0.26 eV (5-MOP). Debido a la naturaleza de la interpolación realizada, recordemos que dicha barrera debe ser considerada como un límite superior al valor real (que en el caso del psoraleno es de 0.36 eV). Dado que el 5-MOP presenta la barrera más baja, podemos considerarlo un candidato más idóneo a alcanzar un rendimiento de ISC más eficiente.

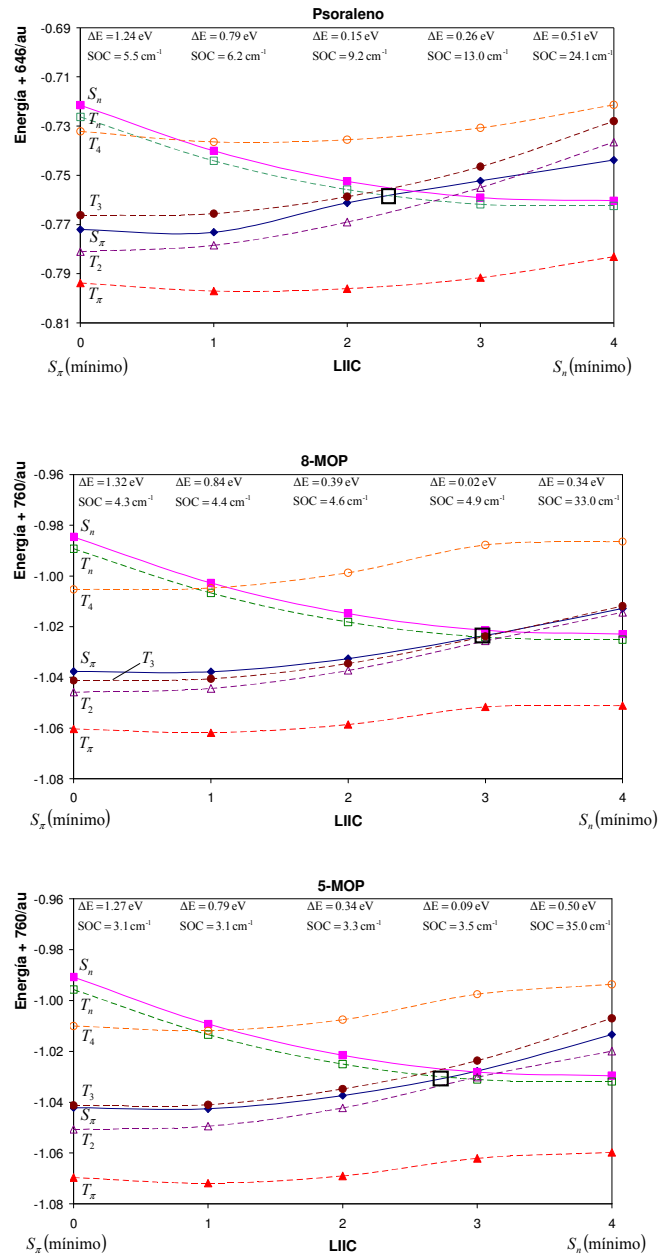


Figura 42. Energías CASPT2 para los estados excitados más bajos de psoraleno, 8-MOP y 5-MOP a lo largo del LIIC. Los singletes se representan con línea sólida, y los tripletes con línea de trazos. Se incluye el gap y el SOC ($S_{\pi}T_n$) en cada paso. También se señala con un cuadrado la posición del cruce ($S_{\pi}T_n$)_X.

Es destacable que a lo largo del LIIC los tres compuestos presenten valores de SOC ($S_\pi - T_n$) crecientes, alcanzando su máximo en el mínimo del S_n , por lo que la región donde el ISC es significativo puede extenderse desde el punto del STC hasta la estructura $(S_n)_{MIN}$.

A partir de los resultados obtenidos para la kelina, TMP y 3-CPS, mostrados en la Figura 43, podemos observar que el TMP y el 3-CPS presentan características similares a los sistemas previos, en particular el largo *gap* ($S_\pi - T_n$) en el mínimo del S_π . Como consecuencia, el STC $(S_\pi/T_n)_X$ tiene lugar avanzando mucho más a lo largo del perfil LIIC, y la correspondiente barrera para alcanzar el susodicho cruce STC a partir de $(S_\pi)_{MIN}$ es tan alta como en el psoraleno en ambas moléculas: 0.41 eV (TMP) y 0.44 eV (3-CPS). Debido a estas barreras energéticas relativamente elevadas, e incluso a pesar de que los SOC son ligeramente superiores a los tres sistemas anteriores, la eficiencia del proceso ISC será probablemente menor que en el caso del psoraleno, 8-MOP y 5-MOP.

El caso de la kelina es excepcional: los estados S_π y T_n están prácticamente degenerados en la región Franck-Condon, al igual que en $(S_\pi)_{MIN}$. El STC $(S_\pi/T_n)_X$ tiene lugar inmediatamente después de dicha estructura, a lo largo del LIIC. Dado que ambos estados están muy próximos en una región extensa del espacio de coordenadas, la barrera calculada de 0.11 eV no es probablemente un valor realista para cuantificar la eficiencia del proceso ISC. Con todo, la kelina presenta el camino de ISC hasta el estado T_n más favorable de todas las furocumarinas.

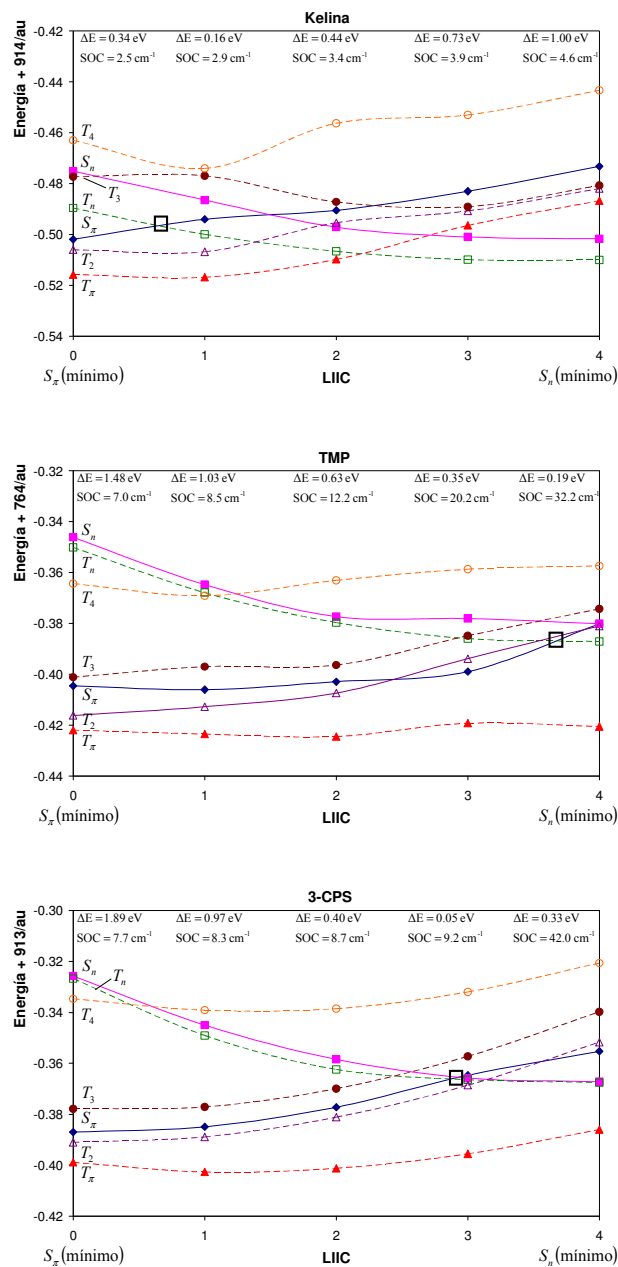


Figura 43. Energías CASPT2 para los estados excitados más bajos de kelina, TMP y 3-CPS a lo largo del LIIC. Los singletes se representan con línea sólida, y los tripletes con línea de trazos. Se incluye el gap y el SOC (S_n-T_n) en cada paso. También se señala con un cuadrado la posición del cruce (S_n-T_n) $_{\chi}$.

la kelina es mucho más bajo en energía, y por ello la intersección cónica $(T_{\pi}/T_n)_{CI}$ puede ser alcanzada sin barrera incluso a lo largo del LIIC, resaltando de este modo la eficiencia del proceso de conversión interna.

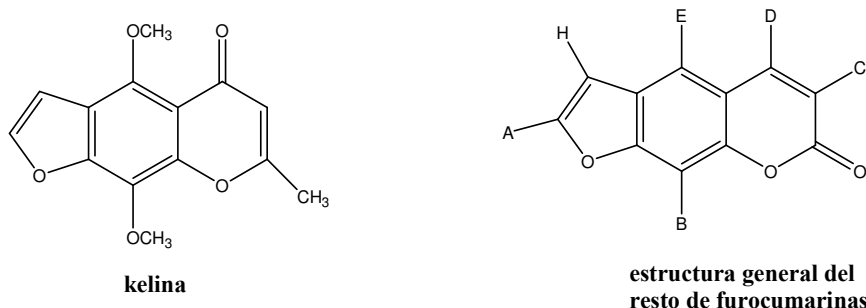


Figura 45. Diferencia entre las estructuras de la kelina y las del resto de furocumarinas estudiadas (psoraleno: A=B=C=D=E=H; 8-MOP: B=OCH₃, A=C=D=E=H; 5-MOP: E=OCH₃, A=B=C=D=H; TMP: A=B=D=CH₃, C=E=H; 3-CPS: C=CO₂CH₂CH₃, A=B=D=E=H).

El mecanismo común propuesto en la Figura 44 para todas las furocumarinas puede variar ligeramente dependiendo de diversos factores. Si el *gap* ($S_{\pi} - T_n$) en la región Franck-Condon (ΔE_1) es suficientemente pequeño, como ocurre con la kelina, un proceso ISC eficiente tendrá lugar cerca de esta región, si los términos del SOC sean suficientemente grandes. En las otras furocumarinas, se debe superar una barrera (ΔE_2) para llegar a una región favorable para el ISC entre los estados S_{π} y T_n . La menor barrera tiene lugar en el 5-MOP y, por tanto, es este compuesto el que presentará un ISC más eficiente. En todos los casos, pero especialmente en la kelina, una vez se puebla el estado T_n la transferencia de energía al estado T_{π} será extremadamente favorable. De acuerdo con este razonamiento, la kelina sería el compuesto más eficiente para la terapia PUVA.

4.3. Transferencia de energía

Los estado excitados más bajos del oxígeno molecular han sido estudiados exhaustivamente, ya que es la molécula más abundante en la corteza terrestre y el segundo constituyente más abundante (alrededor de un 20%) del aire atmosférico. Por todo ello, el oxígeno ha sido objeto de diversos estudios experimentales [221,302,303,304] y teóricos [305].

La configuración electrónica del oxígeno molecular es:

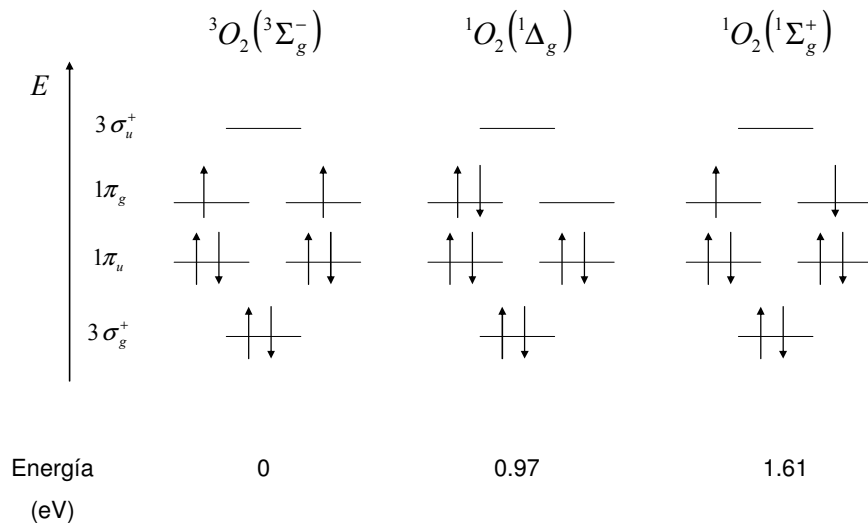
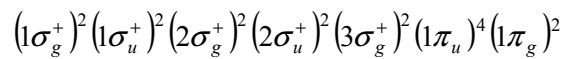


Figura 46. Configuración electrónica y energía experimental de los primeros estados electrónicos de la molécula de oxígeno.

Los estados más bajos del oxígeno son los que van a jugar un papel importante en su fotoquímica. En concreto, nos interesa el primer estado excitado singlete ($^1\Delta_g$), dado que es el protagonista en la terapia fotodinámica (PDT) [72,76,306,307]. Dicho estado se encuentra situado a 0.97 eV. El siguiente estado singlete, de naturaleza $^1\Sigma_g^+$, está a 1.61 eV [302,303,304].

El denominado *efecto fotodinámico* se refiere al daño o destrucción de tejido vivo por acción de la luz visible, en presencia de un fotosensibilizador y de oxígeno molecular [72,77]. El fotosensibilizador debe absorber la luz y excitar el oxígeno molecular presente en el medio celular.

Este efecto fue descubierto a finales del siglo XIX en la *Ludwig-Maximilian University*, donde Oscar Raab trabajaba en el laboratorio de farmacología del profesor H. von Tappeiner examinando el efecto de diversos colorantes sobre paramecios. Observó que empleando concentraciones bajas de acridina como fotosensibilizador, los paramecios morían en presencia de luz solar, pero en la oscuridad sobrevivían [72,308]. Este resultado fue publicado en 1900, y en 1903 von Tappeiner y Jesionek propusieron varias aplicaciones dermatológicas de diversos fotosensibilizadores (por ejemplo, la eosina, que fue el primer compuesto empleado para tratar tumores). En 1904, von Tappeiner y Jodlbauer acuñaron el término *photodynamische wirkung* (acción fotodinámica). En 1909, empleando como modelo la fotohemólisis de eritrocitos, Hasselbach demostró que el fotosensibilizador incrementaba la velocidad de la fotorreacción únicamente en presencia de oxígeno. Durante el siglo XX se fueron proponiendo y sintetizando diversos fotosensibilizadores. En 1976, Weishaupt *et al.* [309] postularon que el oxígeno singlete era el agente citotóxico responsable de la fotoinactivación de células tumorales. Los agentes fotodinámicos han de cumplir una serie de requisitos [72]: debe estar presente un cromóforo que absorba en la región del visible, ultravioleta o infrarrojo cercano; si está implicada la formación de oxígeno singlete, el estado excitado triplete del fotosensibilizador

debe poblarse de forma eficiente mediante un mecanismo de ISC; el estado excitado triplete debe poseer una energía E_T mayor que 0.97 eV (energía del oxígeno singlete); y debe producirse de forma eficiente una transferencia de energía fotosensibilizador $\rightarrow O_2$.

Los avances en PDT dependen de nuestro conocimiento de los fenómenos físicos, químicos y biológicos derivados de las interacciones entre la luz, los tejidos y el fotosensibilizador [310,311]. A diferencia de la radioterapia [61], el principal objetivo no es la modificación del ADN (típicamente los fotosensibilizadores se localizan en/sobre las membranas celulares) [312].

Desde el punto de vista fotoquímico, lo que ocurre es que el oxígeno molecular actúa como *desactivador* de la furocumarina. El mecanismo del *quenching* es complejo, ya que se trata de una reacción entre dos moléculas en las que una o ambas se encuentran en estado excitado. Para que los productos C y D estén en la misma hipersuperficie de energía potencial que los reactantes A y B , el espín total se ha de conservar durante la reacción [239]. Los espines de los reactantes se suman de acuerdo con las reglas del cálculo vectorial, de tal modo que el espín total del estado de transición puede tener los valores siguientes: $(S_A + S_B)$, $(S_A + S_B - 1)$, ..., $|S_A - S_B|$. Lo mismo sucede con los productos: $(S_C + S_D)$, $(S_C + S_D - 1)$, ..., $|S_C - S_D|$. Una reacción puede tener lugar, de acuerdo con la regla de conservación del espín de Wigner-Witmer, si y sólo si los reactantes pueden formar un estado de transición con un espín total que pueda ser obtenido igualmente combinando los espines de los productos. De este modo, se pueden producir los siguientes procesos:



Entre los posibles agentes fotodinámicos, se ha demostrado que ciertas furocumarinas son capaces de interactuar con el oxígeno molecular del medio celular para producir oxígeno en estado excitado singlete (*vide* Figura 7) [75,79,132,154,156,165,313,314]. Es más, se sabe que el oxígeno molecular amortigua (*quenching*) la reacción fotoquímica entre los psoralenos y la timina [164].

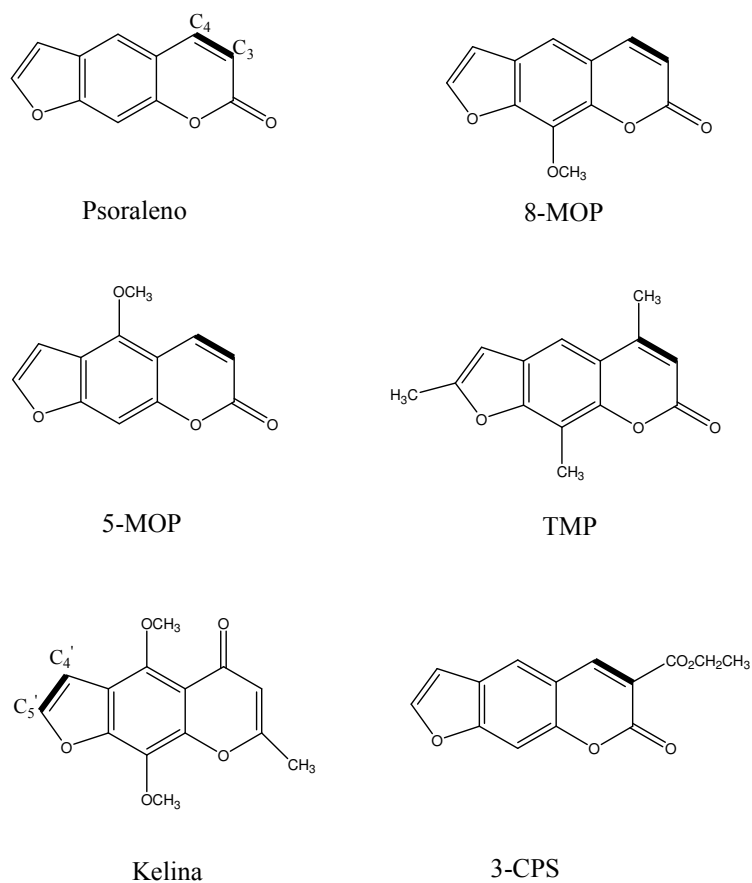


Figura 47. Furocumarinas estudiadas destacando el doble enlace reactivo en estado triplete.

Según la literatura, los productores de oxígeno singlete (y de otros radicales reactivos del oxígeno como $O_2^{\bullet-}$ y HO_2^{\bullet}) más eficientes son el

psoraleno y, sobre todo, el 3-CPS [154]. No obstante, la situación es menos clara con respecto a los otros miembros de la familia [75,79,315,316,317,318]. Algunos autores señalan que el 8-MOP es un buen sensibilizador fotodinámico en disolución acuosa [79,165]. Dado que el 1O_2 y el $O_2^{\bullet-}$ generados por las furocumarinas pueden inducir la fotooxidación de lípidos, es concebible que estas especies reactivas del oxígeno dañen la membrana celular, ejerciendo de esta forma la acción fotodinámica. Existe además un paralelismo entre la producción de oxígeno singlete (por una furocumarina) y la aparición tanto de eritema como de pigmentación en la piel humana. Por otro lado, existen evidencias que apuntan a que la unión del 8-MOP a regiones poli-(dA-dT) dicatenarias inhibe su habilidad para fotosensibilizar por medio de la generación de oxígeno singlete [165], lo que podría apuntar a que ambos mecanismos no son sinérgicos. Sin embargo, en ciertas experiencias se han encontrado valores de producción de oxígeno singlete más elevados para algunas furocumarinas (psoraleno, 8-MOP y 5-MOP) unidas al ADN (o formando un complejo) que para esos mismos compuestos en estado libre [319,320,321].

La interacción entre el oxígeno y las furocumarinas se cree que tiene lugar a través de un proceso relacionado con los anteriormente descritos, denominado transferencia de energía resonante (RET, *resonance energy transfer*), entre el estado excitado triplete más bajo de la furocumarina y el estado fundamental (triplete) del oxígeno molecular. Como resultado, se produce oxígeno singlete y la furocumarina se relaja a su estado fundamental singlete. El proceso se da en virtud de un acoplamiento electrónico entre las dos moléculas dentro de un complejo de colisión [322,323,324,325,326,327,328,329,330]

Un modelo para este tipo de interacción fue introducido por Förster [331] y está basado en la transferencia de energía electrónica entre un dador y un aceptor a una distancia de unos 20-30 Å o incluso más [239,332,333,334,335]. Este proceso, denominado *transferencia de energía dipolo-dipolo* o *transferencia de energía coulombica*, tiene lugar siempre que el espectro de

emisión de un fluoróforo (el dador, D) solapa con el espectro de absorción de otra molécula (el aceptor, A , o amortiguador). No hay un fotón intermediario en el proceso RET (es una transferencia no radiativa). El dador y el aceptor están acoplados por una interacción dipolo-dipolo: el campo eléctrico alrededor de D^* se comporta como un campo generado por un dipolo oscilante clásico que provoca la excitación de A .

Por el contrario, cuando la separación entre dador y aceptor es de 5-10 Å hemos de recurrir al mecanismo de Dexter [336], basado en el intercambio electrónico: asumimos débiles interacciones y solapamiento entre las funciones de onda de D^* y A , una situación que permite aplicar la Regla de Oro de Fermi para transiciones acopladas. Estos procesos han sido estudiados en profundidad teóricamente [337,338,339,340,341,342].

En resumen, Förster desarrolló una teoría para la transferencia de energía singlete-singlete, mientras que Dexter hizo lo propio para el caso triplete-triplete. Los puntos clave de la teoría de Förster-Dexter son [337]:

- ✓ Mientras que para la transferencia de energía singlete-singlete no se anulan ni la interacción coulombiana (inducida por dipolo) ni la interacción de intercambio, para la transferencia de energía triplete-triplete sólo existe la interacción de intercambio.
- ✓ La velocidad de la transferencia inducida por dipolo decrece en función de R^{-6} , mientras que la velocidad de la transferencia inducida por intercambio decrece en función de $e^{(-2R/L)}$, siendo R la separación dador-aceptor y L un radio de Bohr efectivo promedio para los estados excitado y no excitado del dador y del aceptor, respectivamente.
- ✓ La velocidad de la transferencia inducida por dipolo depende de las fuerzas de oscilador de las transiciones radiativas $D^* \rightarrow D$ y $A \rightarrow A^*$, pero

la velocidad de la transferencia inducida por intercambio no depende de estas magnitudes.

La interacción entre el oxígeno y una molécula M debe tener lugar mediante las relaciones que se establecen entre la hipersuperficie de un estado del oxígeno y la hipersuperficie de un estado de dicha molécula. Es necesario estudiar la estructura electrónica del fotosistema $[M-O_2]$ para entender esta interacción [343]. La orientación relativa entre la molécula y el oxígeno no es un problema trivial aunque, en muchos casos, es irrelevante, dado que los potenciales de interacción $[M-O_2]$ suelen ser débiles, y las hipersuperficies de potencial están caracterizadas por múltiples mínimos poco profundos, por lo que es necesario considerar varias orientaciones entre la molécula y el oxígeno. En sistemas fotoquímicos y fotobiológicos, el oxígeno singlete es generado de forma eficiente a través de un proceso de sensibilización, en el cual el $O_2 (^3\Sigma_g^-)$ forma un complejo de colisión con un estado excitado de la molécula M (la cual habría sido previamente irradiada con luz de la adecuada frecuencia). La transferencia de energía dentro del complejo da lugar a la formación de oxígeno singlete.

En la terapia fotodinámica, el mecanismo es una transferencia de energía intermolecular triplete-triplete (TET, *intermolecular Triplet-triplet Energy Transfer*). Este tipo de reacciones son muy comunes para poblar eficientemente los estados triplete de muchas moléculas orgánicas [239,344,345].

La transferencia de energía TET es un proceso de intercambio de energía y espín entre un par de moléculas. Así, podemos ver este proceso como dos transferencias electrónicas simultáneas con diferente espín ($\alpha \rightarrow \alpha$, $\beta \rightarrow \beta$) que tiene lugar a distancias dador-aceptor de menos de 10 Å.

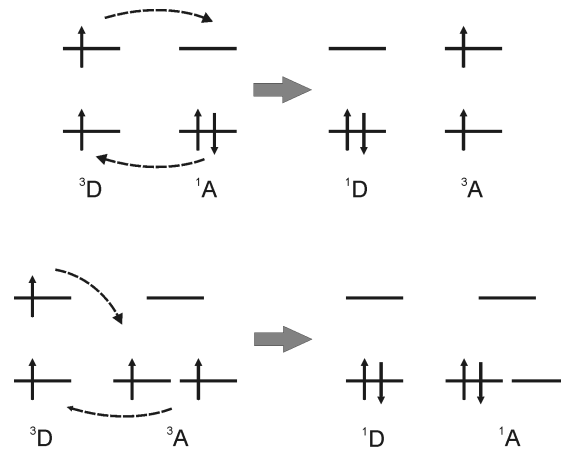
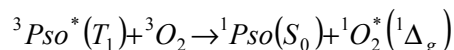


Figura 48. La transferencia de energía T-T es el resultado de dos transferencias electrónicas simultáneas entre el dador (D) y el aceptor (A).

En el proceso TET el mecanismo de Förster no contribuirá porque a distancias cortas la aproximación coulombica no se cumple y, además, las transiciones estarán prohibidas por dipolo eléctrico [346]. El acoplamiento electrónico no es el único factor clave del proceso, sino también la condición de resonancia; esto es, la energía disponible en el dador ha de ser igual o superior que la requerida para poblar el estado excitado del aceptor. Si es éste el caso, el proceso está controlado por difusión y es exotérmico. En caso contrario, si la energía del aceptor es menor que la del dador, el proceso es endotérmico y termodinámicamente desfavorable. Esto implica que hay una barrera energética cuya altura dependerá de la naturaleza del aceptor, sea clásico (para sistemas rígidos) o no clásico (sistemas flexibles que pueden encontrarse en conformaciones muy favorables para un TET no vertical muy eficiente), con un correspondiente mayor o menor decaimiento en la velocidad del proceso, respectivamente [347,348].

En nuestro caso, el proceso TET que tiene lugar entre el psoraleno y el oxígeno molecular es:



donde el psoraleno en estado triplete es el dador, y el oxígeno es el aceptor. Ya hemos comentado que el estado singlete del oxígeno se encuentra a 0.97 eV [302,303,304]. A tenor de los resultados previos sobre las furocumarinas aisladas, éstas presentan un estado excitado T_1 como mínimo 1.4 eV por encima del estado ${}^1\Delta_g$ del oxígeno, lo cual hace que el proceso TET sea exotérmico y controlado por difusión, comportándose el oxígeno molecular como un aceptor clásico, rígido.

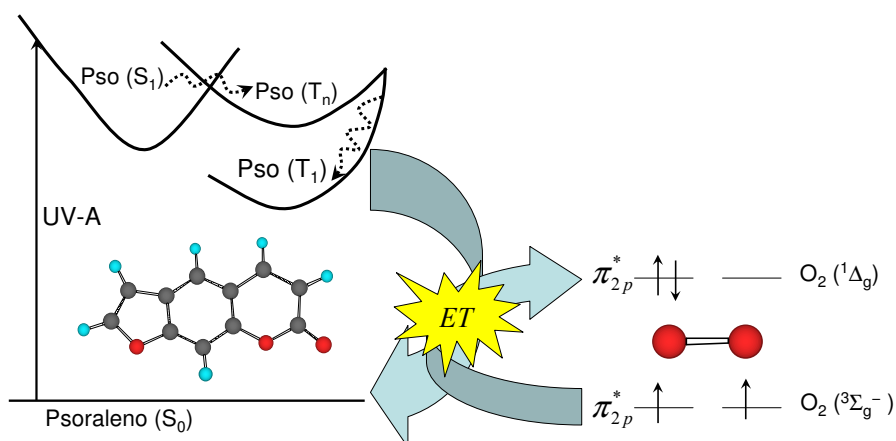


Figura 49. Esquema del proceso TET que tiene lugar entre el psoraleno y el oxígeno.

Tabla XVI. Energías de los estados excitados implicados en el proceso TET, con respecto al estado fundamental de la furocumarina a la geometría Franck-Condon.

Molécula	Geometría	Estado	E (eV)
O ₂	T ₀ (estado fundamental)	S ₁ (¹ Δ _g)	1.09 (<i>exp.</i> 0.97)
	T ₀ (estado fundamental)	S ₂ (¹ Σ _g ⁺)	1.76 (<i>exp.</i> 1.61)
Psoraleno	T ₁	S ₁	3.56
	T ₁	T ₁	2.29
8-MOP	T ₁	S ₁	3.45
	T ₁	T ₁	2.33
5-MOP	T ₁	S ₁	3.56
	T ₁	T ₁	2.28
TMP	T ₁	S ₁	3.15
	T ₁	T ₁	2.24
Kelina	T ₁	S ₁	3.39
	T ₁	T ₁	2.42
3-CPS	T ₁	S ₁	3.11
	T ₁	T ₁	2.14

Dado que nuestro objetivo es analizar los diferentes factores que influyen en el TET entre las furocumarinas y el oxígeno, con el fin de evaluar la generación de oxígeno singlete, hemos de tener en cuenta dos aspectos básicos. En primer lugar, las velocidades de la transferencia de energía dador-aceptor serán estimadas a partir de las magnitudes de los correspondientes acoplamientos electrónicos, calculando las curvas de energía potencial del sistema [furocumarina-O₂] con respecto a la distancia entre los dos fragmentos. En segundo lugar, y dado que la eficiencia de la reacción también depende de la capacidad del fotosensibilizador para poblar eficientemente su estado excitado triplete más bajo, la velocidad de población del triplete será estimada a partir del

SOC del correspondiente cruce entre sistemas que tiene lugar en cada furocumarina.

En el régimen de acoplamiento débil, en el cual la interacción electrónica es menor que la energía de reorganización vibracional, la velocidad del proceso TET, k_{TET} , entre el dador y el aceptor, puede ser caracterizada empleando la Regla de Oro de Fermi (*vide* Ecuación 17):

$$k_{TET} = \frac{1}{\tau_{TET}} = \frac{2\pi}{\hbar} \left| \langle \psi_i | \hat{H} | \psi_j \rangle \right|^2 \rho_E = \frac{2\pi}{\hbar} (H')^2 \rho_E$$

Ecuación 20

donde el elemento matricial del Hamiltoniano, H' , es la parte electrónica de la transferencia de energía (*i.e.*, el acoplamiento electrónico) y ρ_E es la densidad de estados vibracionales en los estados inicial y final y su solapamiento espectral. Para obtener el valor de los tiempos de vida del proceso, consideramos unos valores de $\rho_E = 200 \text{ eV}^{-1}$ y $(2\pi/\hbar) = 9.55 \times 10^{15} \text{ eV}^{-1} \text{ s}^{-1}$. El valor de ρ_E fue estimado a partir de estudios llevados a cabo para la molécula de psoraleno, en los cuales se calculaban explícitamente factores vibrónicos [268].

El cálculo de H' es la parte crucial en la determinación de la velocidad del proceso TET. La extensión del acoplamiento controla el proceso de transferencia energética, específicamente el paso de un estado a otro, y se puede tomar como una medida de la eficiencia del proceso. Se han desarrollado diferentes procedimientos [338,339,340] basados en cálculos diabáticos de dímeros localizados, densidades de transición para el monómero o momentos dipolares de transición, y también se han empleado procedimientos basados en cálculos considerando el sistema como una supermolécula, tanto en el caso singlete-singlete [349] como triplete-triplete [346]. De entre todos los procedimientos, el método más preciso es el basado en la diferencia de energía en el dímero, considerado como una supermolécula, en el cual el valor del

acoplamiento se obtiene como la mitad de la separación energética (*gap*) entre los estados involucrados en la interacción [346,349]. La precisión se fundamenta en la calidad del método químico-cuántico utilizado para llevar a cabo los cálculos de la estructura electrónica, cosa la cual está garantizada en el presente estudio por el uso del método CASPT2.

Sin embargo, el proceso de generación de oxígeno singlete no depende exclusivamente de la eficiencia del TET desde el estado triplete de la furocumarina, sino que también depende de la eficiencia en la población de dicho estado triplete. Como ya se ha visto en anteriores secciones de esta Tesis, el paso crucial para poblar la ruta triplete en fase gas es el ISC entre los estados $S_{\pi}(\pi\pi^*)$ y $T_n(n\pi^*)$, los dos estados excitados singlete $\pi\pi^*$ y triplete $n\pi^*$ más bajos. El estado $T_n(n\pi^*)$ evoluciona después hacia el triplete más bajo, $T_{\pi}(\pi\pi^*)$, a través de un proceso de conversión interna que es esencialmente ultrarrápido y sin barrera. Así, la estimación de la constante cinética del proceso ISC, k_{ISC} , puede ser obtenida como:

$$k_{ISC} = \frac{2\pi}{\hbar} |H_{SO}|^2 \rho_E$$

Ecuación 21

donde H_{SO} es el término de acoplamiento espín-órbita para la transición no radiativa $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$. Además de este parámetro, la posible presencia de barreras energéticas en las hipersuperficies puede afectar significativamente al valor de k_{ISC} , que puede ser corregido empleando el término exponencial de Arrhenius dentro del marco de la teoría del estado de transición [350,351,352,353,354]. Podemos evaluar cualitativamente estos efectos utilizando la siguiente expresión:

$$k'_{ISC} = k_{ISC} e^{-\Delta E/RT}$$

Ecuación 22

donde k_{ISC} es obtenida mediante la Ecuación 21, ΔE es la energía de la barrera desde el estado inicial singlete al estado triplete, R es la constante de gases ideales y T , la temperatura (298 K). En este contexto, ΔE es, aproximadamente, la diferencia de energía entre el estado $S_{\pi}(\pi\pi^*)$, poblado a la geometría Franck-Condon, y el triplete $T_n(n\pi^*)$ en el punto de cruce $(S_{\pi}/T_n)_X$, considerando que la energía obtenida inicialmente para poblar S_{π} estará disponible, como mínimo, para superar la barrera y poblar T_n . En caso de que haya energía en exceso o, dicho de otro modo, barreras negativas, consideraremos que tal diferencia de energía es cero.

A tenor de los resultados anteriormente descritos, todas las furocumarinas presentan un estado triplete mucho más alto en energía que el estado $^1\Delta_g$ del oxígeno (*vide* Tabla XVI) por lo que el proceso es claramente exotérmico y, por ende, termodinámicamente favorable y controlado por difusión.

Para construir la supermolécula [furocumarina-O₂] se dispuso el oxígeno en una disposición *FF* (*face-to-face*, cara a cara, considerada como la más favorable atendiendo a estudios previos sobre los sistemas etileno-etileno, etileno-O₂ y etileno- ión metaniminio [259]) con respecto al doble enlace reactivo de cada furocumarina, donde se localiza la densidad de espín del triplete. Cada átomo de oxígeno se situó equidistante de su correspondiente átomo de carbono vecino.

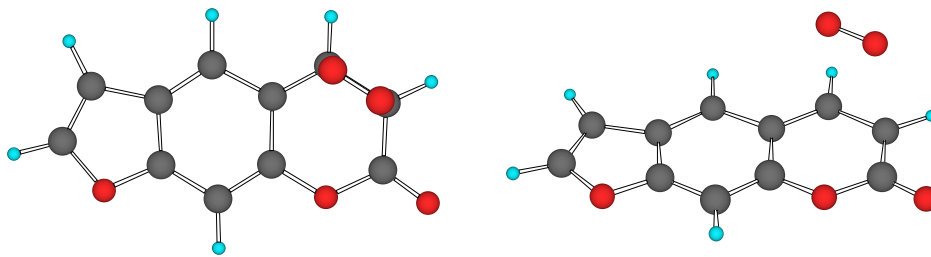


Figura 50. Disposición *FF* de la supermolécula [psoraleno-O₂].

El acoplamiento triplete-triplete que da pie al proceso TET fue calculado, a diferentes distancias psoraleno-oxígeno, como la diferencia de energía entre los dos estados protagonistas del proceso en cada punto con respecto al infinito, donde se supone un acoplamiento nulo. Considerando la supermolécula (psoraleno+O₂) como un todo, hemos tomado la diferencia de energía entre el estado fundamental y los estados 1 ¹A (¹Δ_g del O₂) y 4 ¹A (estado *T*₁ del psoraleno). Estas asignaciones se hicieron analizando la configuración de las funciones de onda CASSCF de los estados electrónicos.

Dentro de la innovadora estrategia que se va a seguir para evaluar la eficiencia del proceso TET, el acoplamiento electrónico *H'* se obtiene como la mitad de la diferencia $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$ (*vide* Figura 51), donde ϵ_∞ y ϵ_i son las diferencias de energía entre los estados 4 ¹A y 1 ¹A a distancia infinita (10 Å) y a cada una de las distancias consideradas (5, 3.5, 3, 2.75, 2.5 y 2.25 Å). El acoplamiento representa la perturbación introducida en cada estado por la interacción dentro del dímero. Es importante destacar lo ventajosa que es dicha definición, puesto que los resultados son independientes del número de estados considerados.

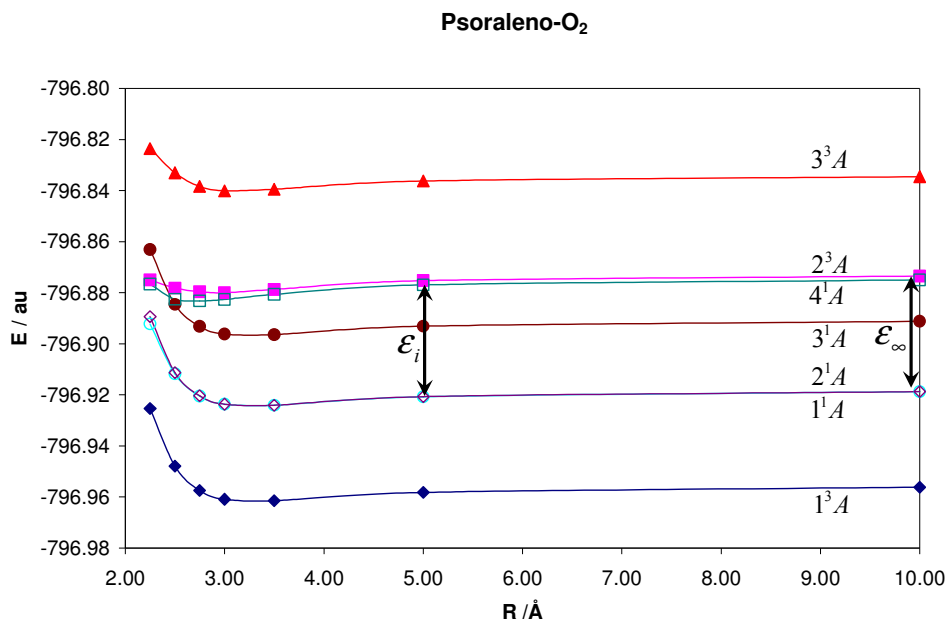


Figura 51. Curvas de energía potencial de los estados excitados más bajos de la supermolécula [Psoraleno-O₂] en función de la distancia entre ambos fragmentos (R). El acoplamiento H' se obtiene como la mitad de la diferencia de energía $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$ entre el estado inicial 4^1A (T_1 del psoraleno y $^3\Sigma_g^-$ del oxígeno) y el estado final 1^1A (S_0 del psoraleno y $^1\Delta_g$ del oxígeno) de la supermolécula a distancia infinita (ϵ_∞ , situación de acoplamiento nulo) y la correspondiente a cada distancia (ϵ_i).

Los resultados obtenidos muestran que las diferencias entre las diferentes furocumarinas, respecto a su interacción con el oxígeno molecular, son poco significativas. A distancias mayores de 3 Å, la extensión del acoplamiento es pequeña y muy similar en todos los casos, conduciendo a tiempos de vida del orden de los picosegundos. La inclusión de más contribuciones vibracionales en el cálculo de las constantes cinéticas incrementaría su valor absoluto. A distancias cortas, destacan la kelina y el TMP como los compuestos que presentan un mayor acoplamiento, sobre todo respecto al 3-CPS, que da los resultados más bajos.

Tabla XVII. Acoplamientos (H'), constantes cinéticas (k_{TET}) y tiempos de vida (τ_{TET}) del proceso TET entre cada furocumarina y el O_2 .

$R / \text{Å}$	H' / eV	k_{TET} / s^{-1}	τ_{TET} / s	H' / eV	k_{TET} / s^{-1}	τ_{TET} / s	H' / eV	k_{TET} / s^{-1}	τ_{TET} / s
	<i>Psoraleno</i>			<i>8-MOP</i>			<i>5-MOP</i>		
10.00	0.0000	–	–	0.0000	–	–	0.0000	–	–
5.00	0.0012	1.43×10^9	6.98×10^{-10}	0.0028	7.35×10^9	1.36×10^{-10}	0.0020	3.71×10^9	2.69×10^{-10}
3.50	0.0038	1.41×10^{10}	7.10×10^{-11}	0.0033	1.07×10^{10}	9.39×10^{-11}	0.0044	1.82×10^{10}	5.50×10^{-11}
3.00	0.0357	1.21×10^{12}	8.23×10^{-13}	0.0370	1.31×10^{12}	7.65×10^{-13}	0.0388	1.44×10^{12}	6.97×10^{-13}
2.75	0.0870	7.23×10^{12}	1.38×10^{-13}	0.0909	7.88×10^{12}	1.27×10^{-13}	0.0921	8.11×10^{12}	1.23×10^{-13}
2.50	0.1966	3.69×10^{13}	2.71×10^{-14}	0.2067	4.08×10^{13}	2.45×10^{-14}	0.2025	3.92×10^{13}	2.55×10^{-14}
2.25	0.3833	1.40×10^{14}	7.13×10^{-15}	0.4101	1.61×10^{14}	6.23×10^{-15}	0.3707	1.31×10^{14}	7.62×10^{-15}
	<i>Kelina</i>			<i>TMP</i>			<i>3-CPS</i>		
10.00	0.0000	–	–	0.0000	–	–	0.0000	–	–
5.00	0.0015	2.29×10^9	4.37×10^{-10}	0.0028	7.56×10^9	1.32×10^{-10}	0.0020	3.70×10^9	2.70×10^{-10}
3.50	0.0051	2.49×10^{10}	4.01×10^{-11}	0.0023	5.14×10^9	1.94×10^{-10}	0.0031	9.21×10^9	1.09×10^{-10}
3.00	0.0387	1.43×10^{12}	6.98×10^{-13}	0.0379	1.37×10^{12}	7.29×10^{-13}	0.0330	1.04×10^{12}	9.61×10^{-13}
2.75	0.0948	8.59×10^{12}	1.16×10^{-13}	0.0996	9.47×10^{12}	1.06×10^{-13}	0.0805	6.19×10^{12}	1.61×10^{-13}
2.50	0.2283	4.98×10^{13}	2.01×10^{-14}	0.2417	5.58×10^{13}	1.79×10^{-14}	0.1816	3.15×10^{13}	3.18×10^{-14}
2.25	0.5197	2.58×10^{14}	3.88×10^{-15}	0.5257	2.64×10^{14}	3.79×10^{-15}	0.3406	1.11×10^{14}	9.02×10^{-15}

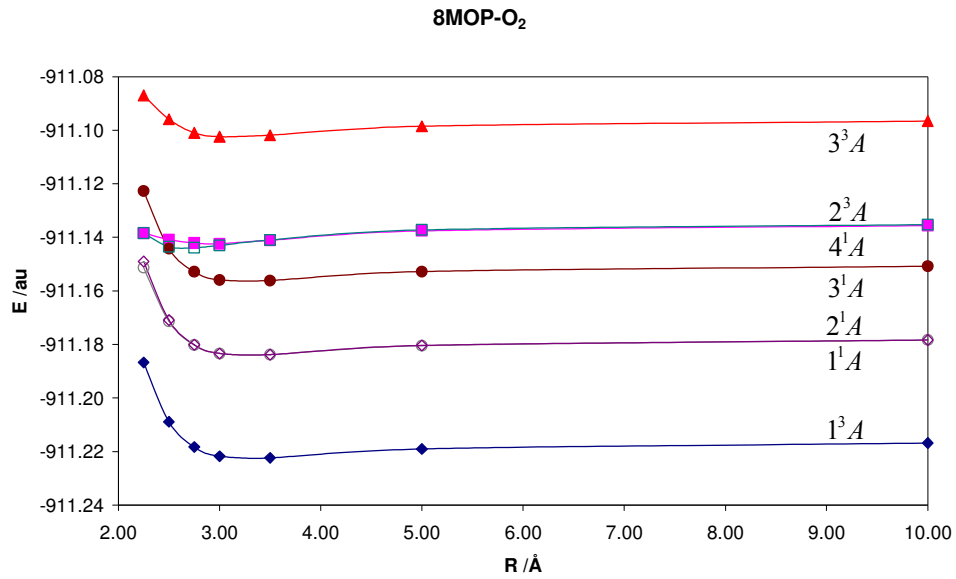


Figura 52. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [8MOP-O₂] con la distancia entre los fragmentos.

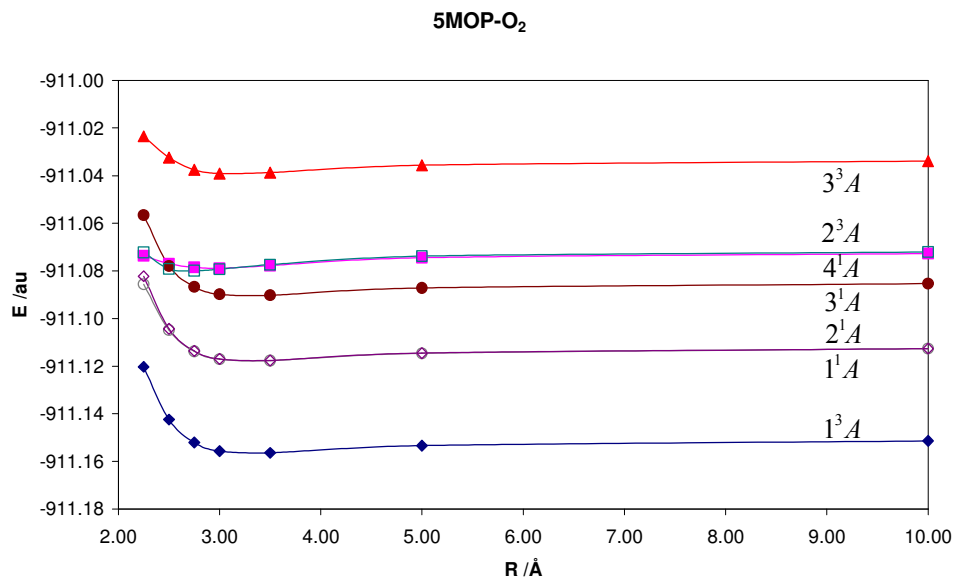


Figura 53. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [5MOP-O₂] con la distancia entre los fragmentos.

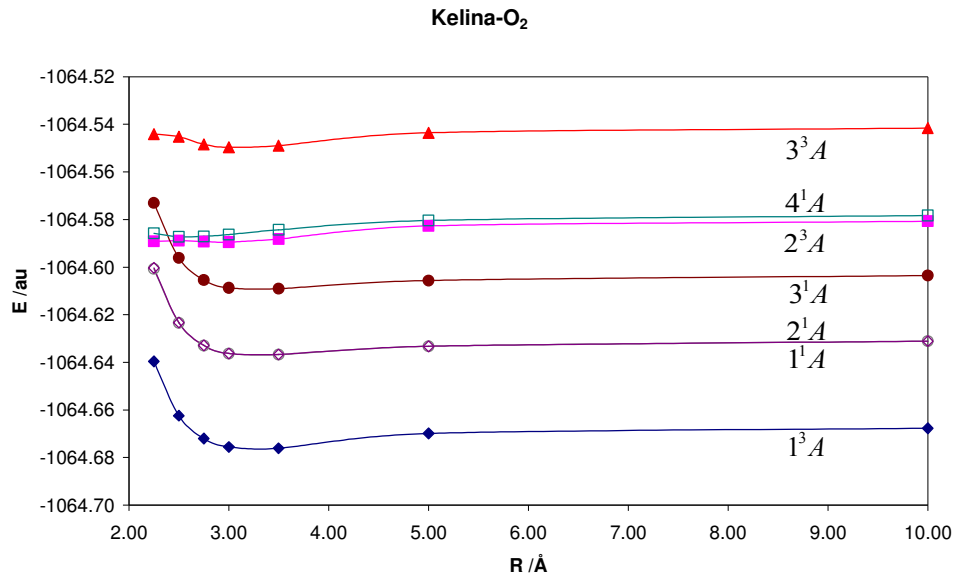


Figura 54. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [Kelina-O₂] con la distancia entre los fragmentos.

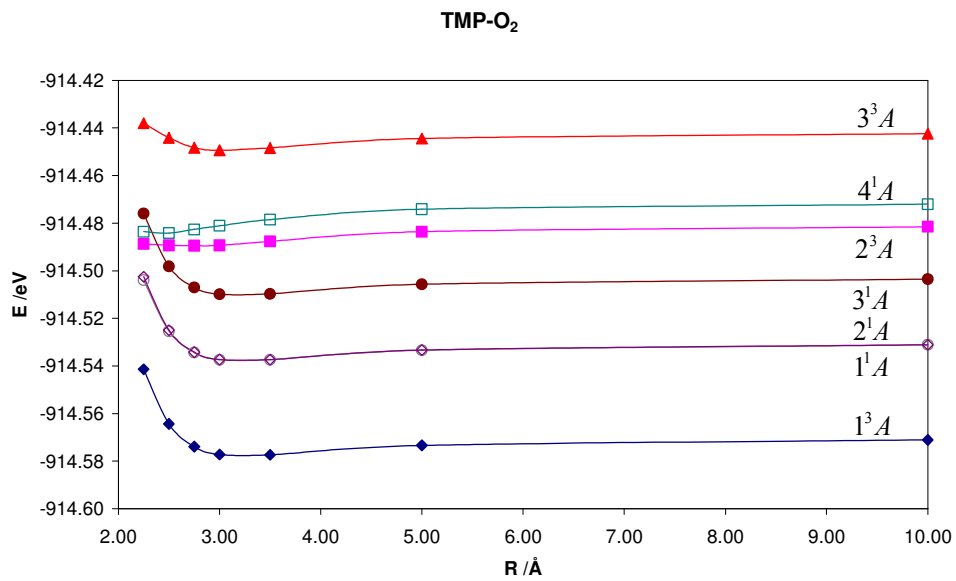


Figura 55. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [TMP-O₂] con la distancia entre los fragmentos.

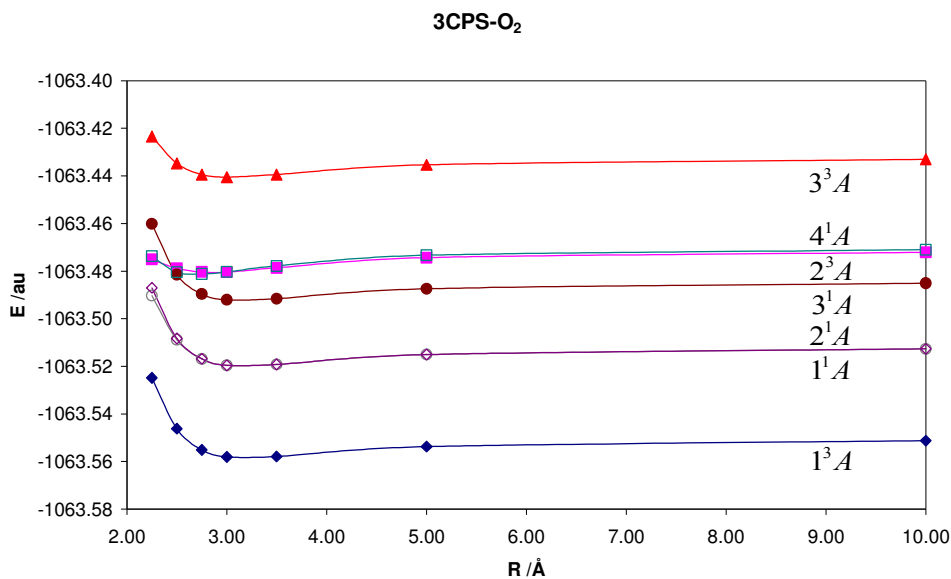


Figura 56. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [3CPS-O₂] con la distancia entre los fragmentos.

Este procedimiento puede considerarse válido en un régimen de acoplamiento débil, ya que los estados interaccionantes permanecen *cuasi*-diabáticos, esto es, con funciones de onda claramente localizadas en cada uno de los monómeros. Así, esta aproximación se relaciona con las teorías sobre la transferencia electrónica en marcos diabáticos [355,356,357]. Por debajo de 2.5 Å, en el rango de formación de un complejo de colisión, es improbable que los resultados obtenidos sean precisos. Los estados se encontrarán fuertemente perturbados y lejos del marco *cuasi*-diabático, mostrando una fuerte deslocalización y mezcla configuracional en la función de onda CASSCF, y la aproximación de Condon ya no es válida.

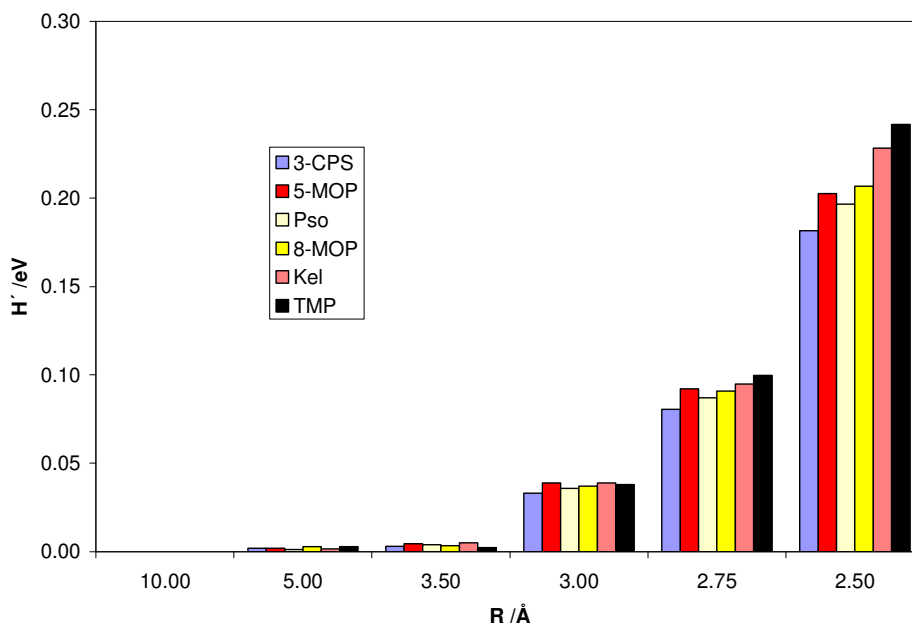


Figura 57. Comparación entre los acoplamientos electrónicos (H') que dan lugar al proceso TET entre una furocumarina y el oxígeno molecular a cada distancia entre los fragmentos R .

En la Figura 57 se presenta una comparación gráfica para los valores de los acoplamientos en función de la furocumarina estudiada y de la distancia. Si bien se aprecian diferencias muy pequeñas, es posible ordenar estos compuestos en función de la eficiencia del proceso TET, de la siguiente forma: 3-CPS < psoraleno < 8-MOP < 5-MOP < kelina < TMP. Ahora bien, las diferencias no son suficientemente significativas como para distinguir claramente entre estas moléculas. Es más, esta tendencia no concuerda con las obtenidas experimentalmente, muchas de ellas medidas, en cualquier caso, en fases condensadas. Como ya se ha señalado, salvo ciertos resultados contradictorios, el 3-CPS y el psoraleno son los mejores generadores de oxígeno singlete [75,79,156,165,315,316], justo al contrario de lo obtenido aquí. Incluso si se incluyeran los efectos del solvente, no se espera una variación importante en el orden obtenido.

Por tanto, podemos concluir que el factor del acoplamiento electrónico no es, en este caso, el elemento crucial para diferenciar la capacidad fotosensibilizadora (por generación de oxígeno singlete) de las diferentes furocumarinas. Este mismo resultado se ha obtenido en recientes estudios en los que se usaba un mismo aceptor para una serie de dadores de estructura muy parecida. El valor del acoplamiento electrónico no se desviaba significativamente de un valor característico promedio de toda la serie [348], y sólo se espera que cambie de una serie de dadores a otra con diferente estructura tipo. Si el acoplamiento electrónico no es el efecto que controla la diferente eficiencia del proceso TET en moléculas con estructuras similares, tal como las furocumarinas, debemos desviar nuestra atención a otros aspectos del proceso, como la eficiencia de cada molécula como fotosensibilizador (esto es, la población eficiente del estado excitado triplete más bajo), que está también relacionada con su capacidad global como compuesto fototerapéutico, tal y como se ha destacado anteriormente al estudiar la interacción furocumarina-timina.

La Ecuación 21 fue empleada inicialmente para calcular las constantes cinéticas del proceso ISC $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$ que desemboca en la población de la ruta triplete en cada furocumarina. Los factores de acoplamiento espín-órbita (H_{SO}) entre estos dos estados en la región de cruce y las constantes cinéticas de ISC (k_{ISC}) vienen dadas en la Tabla XVIII.

Al obtener las constantes cinéticas empleando la Ecuación 21 hemos considerando sólo los factores de acoplamiento espín-órbita para ponderar la eficiencia del proceso. Obviamente, TMP, psoraleno y 3-CPS presentan las constantes cinéticas más grandes, al ser el acoplamiento más importante en estas moléculas. Sin embargo, para analizar más adecuadamente las constantes cinéticas, debemos considerar también las barreras energéticas asociadas al proceso, cosa la cual se introduce con la Ecuación 22.

Tabla XVIII. Constantes cinéticas (k) y tiempos de decaimiento (τ) del proceso de cruce entre sistemas (ISC) entre los estados S_π y T_n .

<i>Furocumarina</i>	$\Delta E / eV^a$	H_{SO} / cm^{-1}^b	k_{ISC} / s^{-1}^c	k'_{ISC} / s^{-1}^d	τ_{ISC} / ns^e
<i>Psoraleno</i>	0.03	9.2	3.58×10^9	1.11×10^9	0.90
<i>8-MOP</i>	-0.01	4.9	1.02×10^9	1.02×10^9	0.98
<i>5-MOP</i>	-0.10	3.5	5.18×10^8	5.18×10^8	1.93
<i>Kelina</i>	-0.19	2.9	3.56×10^8	3.56×10^8	2.81
<i>TMP</i>	0.09	32.2	4.39×10^{10}	1.32×10^9	0.76
<i>3-CPS</i>	-0.24	9.2	3.58×10^9	3.58×10^9	0.28

^a Barrera de energía desde el S_π (en la región Franck-Condon) al T_n (en la región de cruce $S_\pi T_n$).

^b Términos de acoplamiento espín-órbita en la región de cruce $S_\pi T_n$.

^c Constantes cinéticas ISC obtenidas usando la Ecuación 21.

^d Constantes cinéticas ISC obtenidas usando la Ecuación 22. Las barreras negativas se consideran nulas.

^e Tiempos de decaimiento ISC. Inversas de las constantes cinéticas obtenidas con la Ecuación 22.

A diferencia de lo que discutimos en la Sección 4.2 de esta Tesis, al considerar como barrera la diferencia de energía entre el mínimo del estado S_π y el punto de cruce $(S_\pi/T_n)_X$ (vide Figura 44), la presente aproximación tiene en cuenta el exceso de energía disponible en el sistema desde el estado poblado inicialmente S_π (a la geometría Franck-Condon) hasta el punto de cruce. Tal aproximación es más adecuada si nuestro objetivo es discutir valores de constantes cinéticas.

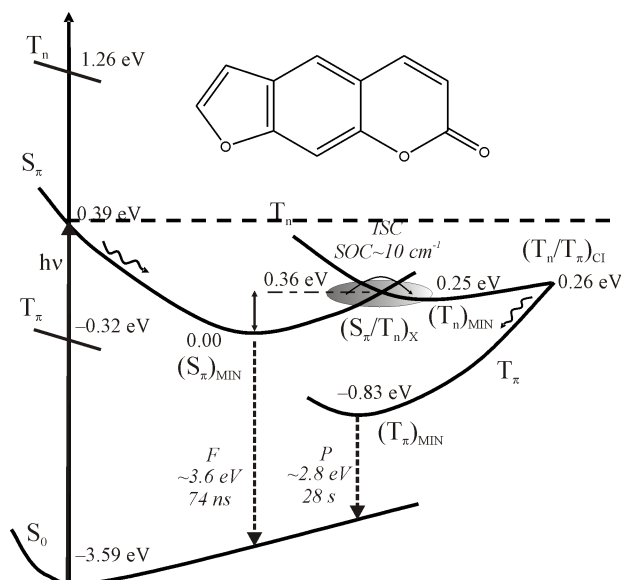


Figura 58. Mecanismo general de población de la ruta triplete de las furocumarinas. Se ha señalado con línea discontinua la consideración de la nueva barrera energética, desde el estado S_{π} (vertical) al cruce $S_{\pi}-T_n$.

La mayor parte de las furocumarinas estudiadas poseen su estado inicialmente poblado, S_{π} , por encima de la energía del punto de cruce, lo cual conduce a barreras negativas. En tales casos, dado que el sistema posee energía suficiente para alcanzar la región ISC y se trata de un proceso exotérmico, la barrera energética en la Ecuación 22 se considera nula.

Una vez considerados todos los factores, las constantes cinéticas ISC y los tiempos de vida (en el rango de los nanosegundos) permiten establecer un orden aproximado de eficiencia entre los diferentes compuestos: Kelina < 5-MOP < 8-MOP < Psoraleno < TMP < 3-CPS. Este orden difiere del propuesto en la Sección 4.2 al considerar la definición de la barrera de modo diferente. Este orden concuerda en gran medida con el orden obtenido experimentalmente, tal y como se puede observar en la Tabla XIX. Esta concordancia refuerza la aproximación de emplear tanto los términos de acoplamiento espín-órbita como las barreras energéticas.

Tabla XIX. Comparación entre el orden de las furocumarinas respecto a su eficiencia fotodinámica (generación de oxígeno singlete) obtenido en este estudio y los datos bibliográficos experimentales.

<i>Eficiencia del proceso</i>	<i>Ref.</i>
<i>Teoría^a</i>	
Kelina < 5-MOP < 8-MOP < Psoraleno < TMP < 3-CPS	
<i>Experimento</i>	
Kelina < 8-MOP < Psoraleno < 5-MOP	318
TMP ≈ 5-MOP ≈ 8-MOP << Psoraleno < 3-CPS	316
5-MOP < 8-MOP < Psoraleno < TMP	75
8-MOP < 5-MOP < TMP < Kelina < 3-CPS	320
5-MOP < 8-MOP < Psoraleno < 3-CPS	321
5-MOP < TMP < 8-MOP < Psoraleno	315

^a Los resultados teóricos están basados en la eficiencia estimada del proceso ISC $S_{\pi}(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$, que es la etapa crucial en la población del estado triplete más bajo de la furocumarina, $T_{\pi}(\pi\pi^*)$, fenómeno que inicia el proceso TET.

Por tanto, podemos concluir que es la población del estado excitado triplete más bajo, protagonista de la acción fototerapéutica, la clave de la efectividad fotosensibilizadora de las furocumarinas (teniendo en cuenta sus semejanzas estructurales), tanto en lo referente a la reacción con la timina del ADN, como en lo referente a la interacción con el oxígeno molecular. En ese sentido, el 3-CPS es el fotosensibilizador más eficiente. A continuación, en orden de eficiencia de mayor a menor, encontramos el TMP, el psoraleno, el 5-MOP, el 8-MOP y la kelina. Hemos de entender esta ordenación como eficiencia en cuanto a poblar el estado triplete más bajo (en fase gas). Por supuesto, hay otras propiedades que hay que tener en cuenta a la hora de administrar estos fármacos a un paciente (como, por ejemplo, su farmacodinámica y farmacocinética).

4.4. Estudio de los dímeros de timina

El estudio de la interacción de la radiación con el ADN ha despertado un gran interés en las últimas décadas, tal y como hemos comentado en el apartado C del Exordio. Ello ha motivado un buen número de estudios, experimentales y teóricos, sobre los mecanismos de desexcitación ultrarrápida de las bases del ADN (*vide* Sección 4.1.3).

En procesos de desactivación bimoleculares se puede formar un *excímero* [239], que se representa por (MM^*) . Se observa que al aumentar la concentración de la especie M decrece el rendimiento cuántico de fluorescencia. Esto implica que es la propia molécula la que se “autoamortigua” (*self-quenching*) a sí misma. El excímero está constituido por dos moléculas idénticas, pero una de ellas se encuentra en su estado fundamental y la otra en estado excitado.

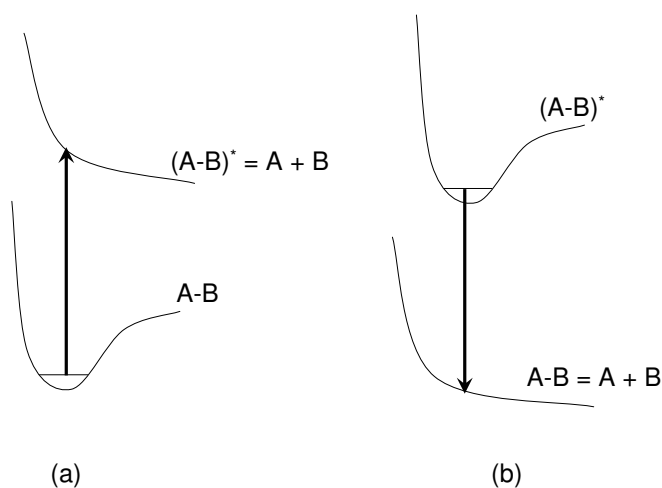


Figura 59. (a) La molécula no excitada se encuentra en un estado enlazado, mientras que si se excita pasa a un estado disociativo, por lo que la molécula disociará en estado excitado. (b) Un excímero es una combinación de átomos que existe solamente en estado excitado y que se disocia tan pronto como elimina su energía de excitación.

Se sabe que la formación de los dímeros de timina por irradiación con luz UV [134, 279] es una de las lesiones más frecuentes del ADN. El dímero no puede acomodarse en una doble hélice y, por tanto, la replicación y la expresión génica se bloquean hasta que desaparece la lesión por la acción de la ADN fotoliasa. El tipo de radiación UV más agresivo para el ADN es la de 260 nm, ya que es absorbida con suma facilidad, y al estar presente en la luz solar es la principal responsable del cáncer de piel si la lesión no es reparada [53].

La formación y las propiedades físicas y químicas de estos dímeros han despertado un gran interés en los últimos años [135,284,259,358,359,360,361].

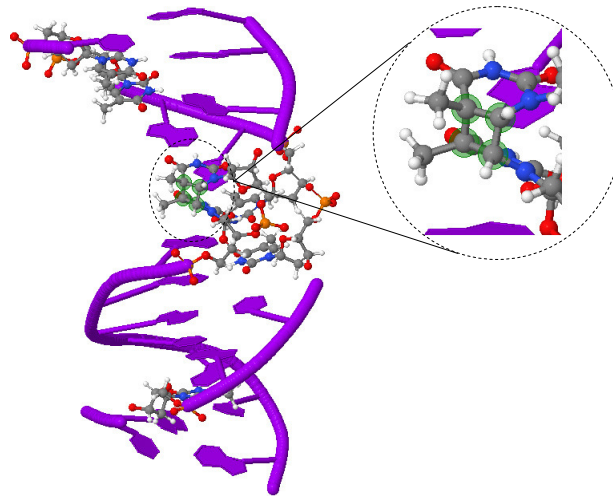


Figura 60. La fotocicloaddición entre dos timinas contiguas, dando lugar a estructuras tipo ciclobutano, es una lesión frecuente en el ADN. En la imagen ampliada se observa claramente el dímero, constituido por el puente de ciclobutano que une ambas moléculas de timina. Sistema visualizado con el programa Jmol a partir de una estructura obtenida por RMN [362] almacenada en el *Protein Data Bank*.

En contraste con los emplazamientos timina-timina (TT), que no son realmente centros mutagénicos en sí mismos, las secuencias citosina-citosina (CC) son fuentes de mutación CC a TT, aunque los fotoproductos resultantes (C\searrowC) se producen con rendimientos bajos [136]. La espectroscopia de

femtosegundo ha permitido comprobar que la dimerización de la timina es una fotorreacción ultrarrápida en la cual los dímeros $T\langle\rangle T$ se forman en ~ 1 ps tras iluminación UV, apuntando a una reacción en estado excitado que debe transcurrir aproximadamente sin barrera *para bases que estén adecuadamente orientadas en el momento de la absorción de luz*. [299]. Desde un punto de vista teórico, se han analizado aspectos relevantes de la fotocicloaddición [2+2] para formar el correspondiente ciclobutano (que constituye el dímero de pirimidinas) en los casos de la timina [262,363] y de la citosina [297]. Esta fotorreacción no adiabática concertada es una fotocicloaddición [2+2] que se produce a través de una intersección cónica (CI) entre el primer estado excitado singlete y el estado fundamental, $(S_1/S_0)_{CI}$, que está relacionada con el esperado canal o *funnel* para el decaimiento no radiativo ultrarrápido que conduce a la formación de $T\langle\rangle T$ y $C\langle\rangle C$.

Sin embargo, hay una pregunta que no ha sido contestada hasta la fecha: *¿por qué la formación fotoinducida de $T\langle\rangle T$ es globalmente más eficiente que la de $C\langle\rangle C$?* Dado que la eficiencia de la fotodimerización depende marcadamente de varios factores (las condiciones experimentales, la secuencia de nucleótidos y el tipo de conformación del ADN, A o B), la respuesta no es trivial. Por tanto, vamos a analizar el diferente comportamiento fotoquímico de los sitios TT y CC en función de su estructura electrónica. Se puede anticipar que *la relativa estabilidad de los excímeros formados con respecto al emplazamiento de la cónica $(S_1/S_0)_{CI}$ es el punto clave, a nivel molecular, para entender la distinta eficiencia de formación de los dímeros $T\langle\rangle T$ y $C\langle\rangle C$.*

La Figura 61 reúne los principales hallazgos para TT y, para comparar, también se han incluido los resultados correspondientes a CC [297], obtenidos anteriormente al mismo nivel de cálculo.

Los resultados obtenidos han sido corregidos con el método *counterpoise*, a fin de evitar el BSSE. Esta corrección es esencial en la discusión de energías de enlace. De ahí que los denominemos CASPT2 (12,12)+BSSE.

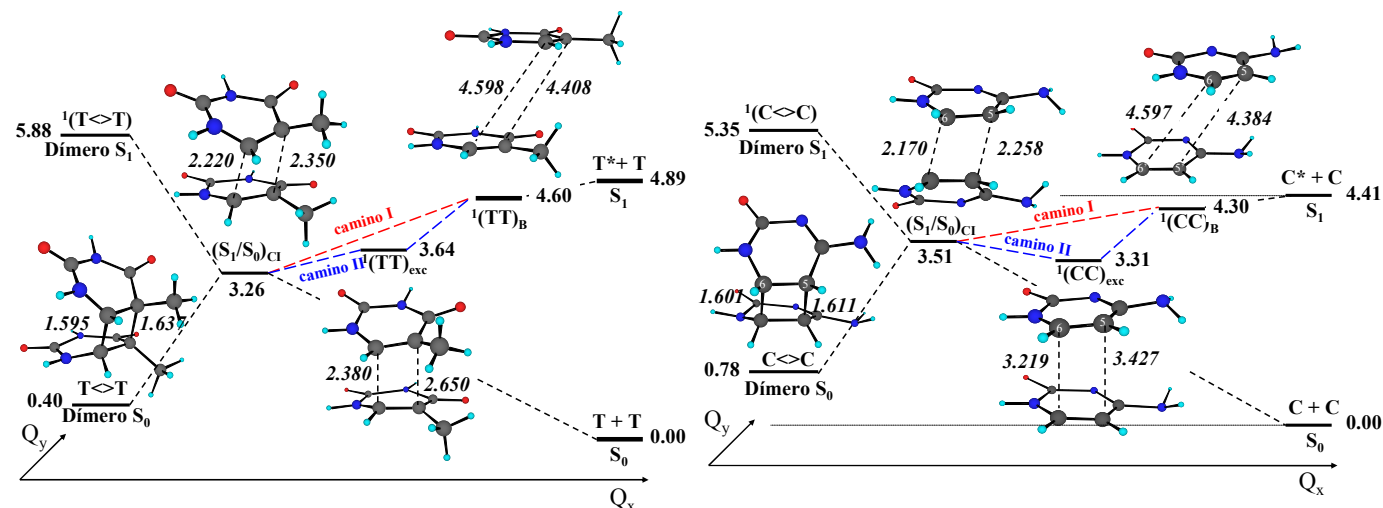


Figura 61. Energías relativas (en eV) calculadas a nivel CASTP2(12,12) + BSSE, con respecto a las dos moléculas de timina no interaccionantes en estado fundamental, para el estado excitado más bajo (S_1) en el estado fundamental de la disposición B-ADN, ${}^1(TT)_B$, a la geometría relajada del excímero deslocalizado, ${}^1(TT)_{exc}$, y a la estructura del dímero $T \triangleleft T$ en estado fundamental (izquierda). También se incluyen la intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$, el estado fundamental del dímero, y la transición más baja del monómero. Los principales parámetros geométricos intermoleculares (distancias C-C en Å) aparecen en cursiva. A la derecha aparece el correspondiente esquema para la citosina. La coordenada Q_x está relacionada principalmente con la distancia intermolecular promedio, mientras que Q_y está asociada con los restantes grados de libertad del sistema.

La energía de enlace E_b fue obtenida como [298]:

$$E_b(TT^*) = E_T + E_{T^*} - E_{T^*T}$$

Ecuación 23

donde E_T y E_{T^*} son los valores de energía total para los estados fundamental (T) y excitado (T^*) de la timina a la geometría de equilibrio del estado fundamental de la timina, y E_{T^*T} representa la energía total del dímero (T^*T) a una geometría dada. La energía de enlace corregida por *counterpoise* es:

$$E_b^{CP}(T^*T) = E_b(T^*T) - [BSSE^{CP}(T^*T)]$$

Ecuación 24

El sustraendo es la corrección *counterpoise*, que la hallamos como:

$$\begin{aligned} [BSSE^{CP}(T^*T)] = & E_{T^*}(T, R = \infty) - E_{T^*}(T, R = T^*T) + \\ & + E_T(T^*, R = \infty) - E_T(T^*, R = T^*T) \end{aligned}$$

Ecuación 25

En el término $[BSSE^{CP}(T^*T)]$ la geometría de los monómeros conserva la correspondiente al dímero. Por tanto, la notación $E_{T^*}(T, R = T^*T)$ indica la energía de T^* calculada con los orbitales fantasma (*ghost functions*) de T a la geometría de T^*T , mientras que en $E_{T^*}(T, R = \infty)$ los orbitales fantasma de T están a distancia infinita de T^* . De esta manera se tiene en cuenta la variación de la geometría en el tratamiento BSSE.

La energía de enlace para el estado $1(TT)_B$ es 0.29 eV (diferencia de energía entre el estado S_1 de las moléculas no interaccionantes, $T^* + T$, y la energía del $1(TT)_B$). Este valor es aproximadamente el triple del obtenido para

$^1(\text{CC})_{\text{B}}$ [297]. En el estado fundamental TT en la forma B-ADN, la transición al estado excitado singlete más bajo (situado, como ya hemos dicho, a 4.60 eV) se desplaza ligeramente al rojo comparada con la transición al estado excitado singlete más bajo del monómero (4.89 eV). Por otro lado, el gap ($S_2 - S_1$) es 0.1 eV mayor para TT que para CC, lo cual refleja un acoplamiento más eficiente entre los dos estados en TT. Si el sistema TT está en la forma correspondiente al B-ADN en el momento de la irradiación, el camino desde $^1(\text{TT})_{\text{B}}$ hacia el canal $(S_1/S_0)_{\text{CI}}$ (camino 1, en la Figura 61) puede ser relacionado con el camino real de decaimiento que tiene lugar en el biopolímero, que se predice sin barrera considerando los cálculos de energía derivados de la interpolación lineal entre estas dos geometrías [363]. Esto también se cumple para disposiciones similares a la forma B tanto en geometría como en energía. Dado que el esqueleto del ADN es flexible, movimientos como la subida del apilamiento (*stacking*), oscilaciones de torsión y doblamientos de la hélice provocarán que un par determinado de pirimidinas se encuentre en una geometría favorable para formar el dímero. El apilamiento π favorece claramente la formación de estados excímeros. En concreto, la estructura más favorable para producir un excímero estable corresponde a la geometría idealizada tipo sandwich [297]. Por tanto, el excímero deslocalizado relajado, $^1(\text{TT})_{\text{exc}}$, correspondiente a dicha geometría, presenta el mayor solapamiento entre los monómeros, y por tanto la energía de enlace calculada (1.25 eV, que es la diferencia de energía entre el estado S_1 de las moléculas no interaccionantes, $\text{T}^* + \text{T}$, y la energía del $^1(\text{TT})_{\text{exc}}$) es considerablemente mayor que la correspondiente al $^1(\text{TT})_{\text{B}}$ (que recordemos que era de 0.29 eV). Independientemente de cómo llegue el sistema al estado $^1(\text{TT})_{\text{exc}}$, éste puede ser directamente desactivado a través del funnel en un proceso sin barrera energética (el camino 2, en la Figura 61).

La situación en CC es algo distinta. Para alcanzar la CI, el estado $^1(\text{CC})_{\text{exc}}$ ha de superar una barrera de 0.2 eV. La presencia de una barrera no implica, sin embargo, que el proceso global de formación de $\text{C} \leftrightarrow \text{C}$ esté

prohibido. Simplemente predice que la existencia de estados excímeros estables por debajo del punto $(S_1/S_0)_{CI}$ provoca el decremento del rendimiento de formación del fotoproducto en la ruta singlete, dado que se requerirá un exceso de energía vibracional para superar la barrera. A consecuencia de ello, la producción de $C \diamond C$ es menos efectiva que la formación de $T \diamond T$. Es decir, la diferencia fundamental a nivel molecular del diferente rendimiento de formación de los dímeros es que en el caso de TT el excímero se encuentra por *encima* de la cónica, mientras que en el caso de CC el excímero se encuentra por *debajo* de la cónica. Todo esto se pone de manifiesto en la Figura 62.

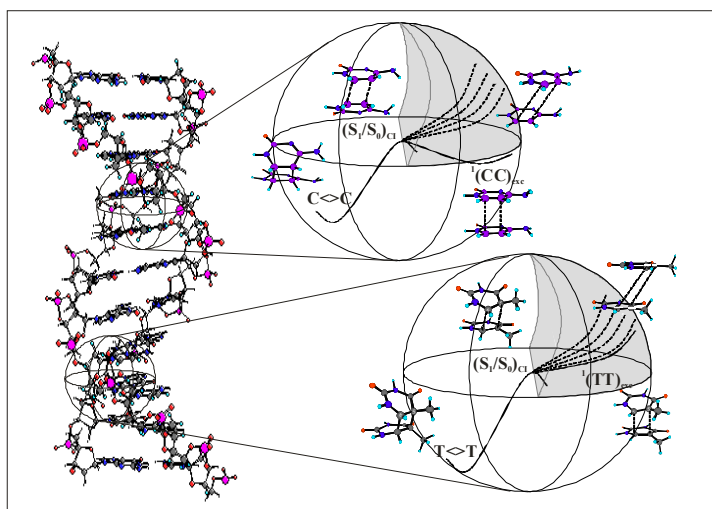


Figura 62. Esquema del proceso de fotodimerización para el dímero de citosina π -stacked (arriba) y para el de timina (abajo) a lo largo de la ruta singlete. Los volúmenes sombreados en la esfera representan regiones de la cadena de ADN con orientaciones reactivas, en los cuales el camino de decaimiento yace por encima de la intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$.

La falta de excímeros estables representa un potencial intrínseco del sistema TT para producir fotoproductos de forma eficiente. Para este sistema no se encontró ninguna estructura cuyo estado S_1 se encontrase por debajo de la cónica, tal y como se ha comprobado experimentalmente [364]. Por tanto, podemos concluir que en TT cualquier disposición estructural es proclive a ser

una *orientación reactiva* en el momento de la irradiación de luz. Y podemos definir una orientación reactiva como aquella que *esté energéticamente por encima de la cónica*. Por el contrario, en los sitios CC un cierto porcentaje de orientaciones no será reactivo debido a la existencia de excímeros $^1(CC)$. Experimentalmente, se ha observado que la adenina y la citosina presentan una tendencia similar en la formación de excímeros, por lo que se puede emplear un modelo cinético común en oligonucleóticos que contengan estas bases, a saber, cada excitación en una base apilada (*stacked*) decae al excímero, mientras que cada excitación en una base no apilada (*unstacked*) decae por conversión interna al estado fundamental del monómero [364,365].

Los sitios CC presentan, sin embargo, una característica única: la cónica $(S_1/S_0)_{CI}$ que conduce a la formación del fotoproducto $C \diamond C$ tiene lugar en el mismo rango de energías que la correspondiente al monómero. Esto provoca que en la citosina ambos decaimientos sean competitivos, haciendo que la producción de $C \diamond C$ sea menos efectiva. Esto no ocurre en la timina.

Tabla XX. Localización energética de los puntos de intersección cónica para el monómero y el dímero de las bases citosina y timina.

	$(S_1/S_0)_{CI}^{\text{monómero}}$	$(S_1/S_0)_{CI}^{\text{dímero}}$
Citosina	3.60 eV	3.51 eV
Timina	4.00 eV	3.26 eV

Además, se espera que el estado S_1 juegue un papel más relevante en la fotorreversibilidad directa de sitios CC que en secuencias TT, dado que la fuerza de oscilador asociada para la transición del primero es algo más elevada (0.070 vs. 0.024), estando localizados los estados $^1(C \diamond C)$ y $^1(T \diamond T)$ a 4.57 eV y 5.28 eV, respectivamente (éstas son las diferencias de energía entre los estado S_0 y S_1 del dímero correspondiente, como se puede ver en la Figura 61). De este modo, el estado $^1(CC)_{\text{exc}}$ puede ser repoblado dentro del rango UV medio.

Una vieja máxima mía dice que, cuando has eliminado lo imposible, lo que queda, por muy improbable que parezca, tiene que ser la verdad.

Sir Arthur Conan Doyle. *La corona de berilos (Las aventuras de Sherlock Holmes, 1892).*

En ciencia la explicación más sencilla, o la más simple, es la que debe aceptarse.

William Ockham

5. Conclusiones

The more outstanding conclusions have already been highlighted in previous chapters. However, it seems adequate to summarize them now.

All of the studied furocoumarins (psoralen, 8-MOP, 5-MOP, khellin, TMP, and 3-CPS) show similar photophysical properties. The lowest-lying valence singlet state absorbs, with more or less intensity, in the energy range employed in phototherapy, and the lifetime for the lowest triplet excited state, T_π , is large enough to exert its photosensitizing action, in agreement with the literature. Moreover, the lowest-lying triplet excited state of each molecule has an enlargement of one of the two reactive double bonds.

Taking into account the qualitative El-Sayed rules, a direct ISC between S_π and T_π states is unlikely to happen at the Franck-Condon region because neither energy gaps (too large) nor SOC elements (too small) are suitable. Hence the process may well take place along the relaxation path of S_π .

Our calculations point out that the population mechanism of the T_π is: $S_\pi \xrightarrow{\text{STC}} T_n \xrightarrow{\text{CI}} T_\pi$. In the parent molecule, psoralen, we have characterized the structures at the crossings (a singlet-triplet crossing and a conical intersection). In the other furocoumarins, we suggest that these crossings actually exist according to the energies obtained along the LIIC (Linear Interpolation in Internal Coordinates) paths (between S_π and S_n minima). Khellin and 5-MOP show the lowest barrier to reach the STC region. Such a barrier was computed as the energy difference between the minimum of S_π and the singlet-triplet crossing, $(S_\pi/T_n)_X$. Only khellin shows clearly a crossing between S_π and T_n , on the one hand, and T_n and T_π , on the other hand, reflecting the high photosensitizing effectiveness of this compound. However, the choice of the barrier is not unique. If we take into account the excess vibrational energy at the Franck-Condon region, the order of photosensitizing ability is different. This point will be discussed later.

In addition, the triplet state of all the furocoumarins, except khellin, is localized in the pyrone moiety, which is in agreement with both the enlargement of the corresponding double bond and the Mulliken spin population. Khellin, with a different chemical structure, shows the spin density localized in the furan reactive double bond. Since there are two possible monoadducts to be formed owing to the existence of two (in principle) reactive double bonds in each furocoumarin, all of the compounds form PMA (pyrone-monoadduct) through the T_π state of the furocoumarin, whereas khellin forms FMA (furan-monoadduct).

We have rationalized so far the formation of only one monoadduct (FMA in khellin and PMA in the rest). So, it is conceivable that the T_π of thymine is the protagonist of the formation of the other monoadduct in each case. Regarding the population of the lowest triplet state of thymine, there are three competitive mechanisms from the initially populated singlet state by means of STC processes: (i) ${}^1\pi\pi^* \rightarrow ({}^3n_o\pi^*/{}^1\pi\pi^*)_{STC} \rightarrow ({}^3n_o\pi^*/{}^3\pi\pi^*)_{CI}$; (ii) ${}^1\pi\pi^* \rightarrow ({}^3\pi\pi^*/{}^1\pi\pi^*)_{STC}$; and (iii) ${}^1n_o\pi^* \rightarrow ({}^1n_o\pi^*/{}^3\pi\pi^*)_{STC}$. The dependence of the quantum yield of ISC with the wavelength could be interpreted as the result of the contribution of the three mechanisms in the population of the lowest excited triplet state.

Next the formation of both monoadducts in parent psoralen has been studied. We suggest some mechanisms to explain this [2+2] photocycloaddition. Whereas PMA would be formed through the triplet manifold, FMA will be formed through the singlet manifold. As regards PMA, the process begins with the direct activation of $S_1(\pi\pi^*)$ state of psoralen, followed by a fast ISC process to the triplet manifold of this molecule. As a result, the $T_1(\pi\pi^*)$ state is populated. Next, the system evolves to an intermediate species with a covalent simple bond between psoralen and thymine, whose lowest triplet state and the singlet manifold are connected via STC, $(S_0/T_1)_{STC}$. The ISC process that takes place through this crossing between hypersurfaces yields the monoadduct in its

ground state. Since the furan double bond is not reactive in the $T_1(\pi\pi^*)$ state of psoralen, an alternative way to form FMA along the triplet manifold is to populate the T_1 of thymine due to the action of another photosensitizer. Nevertheless, this process may be less favourable than the formation of PMA.

Considering the singlet manifold, both monoadducts may well be formed favourably following a barrierless mechanism that begins with the population of the lowest singlet excited state of psoralen and finishes in the ground state of the monoadduct by means of a conical intersection, $(S_0/S_1)_{CI}$. Therefore FMA minimum is probably reached through this way.

In connection with these findings, it is probable that the diadduct is formed from the monoadduct in its lowest singlet state, after the absorption of one photon by the latter and subsequent ISC to T_1 state. In FMA, the spin density is concentrated in the reactive double bond of the pyrone moiety, whereas in PMA is delocalized. What is more, the S_1 state of FMA is lower in energy than that of the PMA, in agreement with experimental findings. Accordingly, FMA may be more prone to form diadducts than PMA. Additionally, it is understandable that systems with important steric repulsions, such as 3-CPS, or with a different π structure in the ring, like khellin, yield FMA preferentially and do not react with a thymine placed in the opposite strand of DNA to form diadducts, so the undesired side effects connected to crosslinks between the two strands of DNA are avoided.

The other side of PUVA therapy is the photosensitization via generation of singlet oxygen. We have analyzed this phenomenon in the light of TET (triplet-triplet energy transfer) theory. Employing the Fermi's Golden Rule, we have estimated TET rate constants and lifetimes. To this end, we have considered the system [furocoumarin- O_2] as a supermolecule, and the strength of the electronic coupling between the protagonist states (the lowest triplet excited state of the former, acting as a donor, and the triplet ground state of the latter, acting as an acceptor) has been evaluated within the energy-gap approximation.

Additionally, the estimated values for the electronic coupling, TET rate constants and lifetimes are similar for all the systems (FC-O₂; FC = psoralen, 8-MOP, 5-MOP, khellin, TMP and 3-CPS) and the determined rates do not follow the reported tendencies (obtained experimentally). Consequently, the electronic coupling factor does not permit rationalizing the differential efficiency in the generation of singlet oxygen by the furocoumarins, because it is similar for donors with closely-related structures.

Therefore, the key point in this process is probably the population of the lowest-lying triplet excited state of the donor, that is, the furocoumarin molecule. In other words, we have to resort to the same feature as in the case of the formation of furocoumarin-thymine adducts. In this case, we have not only taken into account the strength of the spin-orbit coupling related to the intersystem crossing (ISC) process between the initially excited singlet state and the triplet manifold, but we have also analyzed the effect on the ISC rates of the energy barrier required to access the triplet state. The main difference with respect to our previous study is that we have considered now the excess (vibrational) energy available in the system from the initially populated electronic state S_{π} (at the Franck-Condon geometry) to the singlet-triplet crossing structure, $(S_{\pi}/T_n)_X$. The qualitative estimation of the efficiency of the ISC process leads us to suggest an order for the efficiency of the singlet oxygen generation in the different furocoumarins for PUVA therapy: khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS. In this respect, from all compounds studied here, 3-CPS can be predicted as the best photosensitizer, followed by TMP and psoralen. 5-MOP and khellin would not be, on the other hand, so efficient. The determined tendencies seem to agree with most of the experimental determinations in aqueous solution based on the production of reactive singlet oxygen.

Another photocycloaddition reaction, similar to the formation of psoralen-thymine adducts, is the formation of thymine dimers. Such a lesion is

crucial for the understanding of the source of several diseases. Comparing the formation of T \leftrightarrow T with cytosine dimers, we can conclude that, at molecular level, the key point is the location of the conical intersection (S_1/S_0)_{CI}. There is a close connection between the differences in the formation yield of T \leftrightarrow T and C \leftrightarrow C, which has been proved experimentally, and the following three features: (i) TT has more reactive orientations than CC; (ii) photoreversibility by direct absorption to S_1 is expected to be less efficient for TT; and (iii) in CC, the funnel toward C \leftrightarrow C becomes competitive with the funnel that mediates the internal conversion of the cytosine molecule (that is, the monomer), whereas in TT the decay of the excited monomer is only relevant for unstacked thymine bases.

To summarize, a comprehensive analysis of the photosensitizing power of the family of furocoumarins (both the photocycloaddition with thymine and the generation of singlet oxygen) is addressed by using high-level *ab initio* computational techniques. We conclude that 3-CPS is the best photosensitizer, which is very interesting since this compound is incapable of forming diadducts and, consequently, the unwanted secondary effects linked to them. However, we have to be cautious: the present results, studied on quantum-chemical grounds and at molecular level, are directly comparable with the gas-phase context. Aspects such as solvent effects, synthesis, pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerance by patients..., are out of the scope of this research.

Regarding the formation of monoadducts and diadducts, the population of T_π in thymine has been initially studied. Once we have determined how the triplet state of both reactants is populated, the formation of both monoadducts, FMA and PMA, is analyzed. Finally, within the framework of a [2+2] photocycloaddition mechanism, certain experimental findings related to the formation of thymine dimers are rationalized.

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Regiones del espectro de interés químico y fenómenos moleculares asociados.	96
Tabla II. Cinética fotoquímica elemental.....	108
Tabla III. Espacio activo empleado para los cálculos de las furocumarinas, considerando las representaciones irreducibles (a' , a'') del grupo puntual C_s . El orbital a' incluido es el par solitario del oxígeno carbonílico presente en la estructura principal del compuesto. Dicha elección se basó en el análisis de los orbitales y de sus energías en cálculos SCF y RASSCF.....	125
Tabla IV. Energías de excitación ΔE (eV), fuerzas de oscilador f , momentos dipolares d (D), dirección del momento dipolar d_{dir} y dirección del momento dipolar de transición TDM_{dir} (grados) en el psoraleno a la geometría optimizada S_0	135
Tabla V. Energías de excitación medidas experimentalmente y calculadas (en eV) y tiempos de vida de emisión (τ_{rad}) relevantes en la fotofísica del psoraleno. E_{VA} : energía de absorción vertical; T_e : origen de banda electrónico (adiabático); E_{VE} : energía de emisión vertical; Abs_{max} : máximo de absorción experimental; T_0 : origen de banda experimental; E_{max} : máximo experimental de emisión.....	139
Tabla VI. Propiedades espectroscópicas para los estados excitados singletes y tripletes más bajos de la timina.	152
Tabla VII. Corrección BSSE (en eV) para cada monoadducto y cada geometría. Podemos observar que tales correcciones son significativas.....	162
Tabla VIII. Propiedades fotofísicas del 8-MOP. Energía en eV, momento dipolar en D , y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno (vide Figura 21).	172
Tabla IX. Propiedades fotofísicas del 5-MOP. Energía en eV, momento dipolar en D , y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno (vide Figura 21).	173
Tabla X. Propiedades fotofísicas de la kelina. Energía en eV, momento dipolar en D , y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.....	174
Tabla XI. Propiedades fotofísicas del TMP. Energía en eV, momento dipolar en D , y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.....	175
Tabla XII. Propiedades fotofísicas del 3-CPS. Energía en eV, momento dipolar en D , y ángulos en grados referidos a la orientación del psoraleno.....	176

<i>Tabla XIII. Principales propiedades espectroscópicas de las furocumarinas. Energías en eV y SOC en cm^{-1}.</i>	177
<i>Tabla XIV. Longitud de los dobles enlaces de los anillos de furano (F) y pirona (P) según molécula y estado electrónico [a enlace C_4C_5; b enlace C_3C_4 excepto para la kelina, que es C_2C_3 (vide Figura 5 y Figura 6); c población de espín localizada en cada carbono]</i>	177
<i>Tabla XV. Momentos dipolares en Debyes (D) de los estados electrónicos más bajos de las furocumarinas. La diferencia con respecto a cada estado fundamental se da entre paréntesis.</i>	180
<i>Tabla XVI. Energías de los estados excitados implicados en el proceso TET, con respecto al estado fundamental de la furocumarina a la geometría Franck-Condon.</i> .	197
<i>Tabla XVII. Acoplamientos (H'), constantes cinéticas (k_{TET}) y tiempos de vida (τ_{TET}) del proceso TET entre cada furocumarina y el O_2.</i>	203
<i>Tabla XVIII. Constantes cinéticas (k) y tiempos de decaimiento (τ) del proceso de cruce entre sistemas (ISC) entre los estados S_π y T_n.</i>	209
<i>Tabla XIX. Comparación entre el orden de las furocumarinas respecto a su eficiencia fotodinámica (generación de oxígeno singlete) obtenido en este estudio y los datos bibliográficos experimentales.</i>	211
<i>Tabla XX. Localización energética de los puntos de intersección cónica para el monómero y el dímero de las bases citosina y timina.</i>	219

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Placa en memoria de Planck en la Humboldt-Universität (Berlin).</i>	34
<i>Figura 2. Dispersión de la luz por un prisma: la luz de longitud de onda más corta, al refractarse, se desvía más que la luz de longitud de onda más larga, ya que el índice de refracción depende de la longitud de onda. En su célebre experiencia, Newton empleó dos prismas observando el diferente ángulo de refracción según el color de la luz.</i>	38
<i>Figura 3. Estructura del ADN. Estos modelos han sido visualizados con el programa Jmol a partir de una estructura obtenida por difracción de rayos X almacenada en el Protein Data Bank.</i>	41
<i>Figura 4. Estatua en honor de la Reina Alexandra, erigida en 1908 en el jardín del Royal London Hospital (Whitechapel), en el cual se constituyó un Light Department en los albores del siglo XX. Abajo se ve la inscripción de la estatua, en la cual se destaca la labor de la esposa de Eduardo VII en traer a Inglaterra el remedio de Finsen contra el lupus.</i>	53
<i>Figura 5. Familia de las furocumarinas.</i>	56
<i>Figura 6. Mecanismo Tipo III: interacción psoraleno-timina en tres pasos. La terapia PUVA está basada en este tipo de interacción del fotosensibilizador (en este caso, la molécula de psoraleno) con el ADN.</i>	59
<i>Figura 7. Mecanismo Tipo II: interacción psoraleno-oxígeno.</i>	63
<i>Figura 8. La fototerapia engloba todos los casos en los que la luz es empleada con fines terapéuticos. La fotoquimioterapia es un subconjunto de la misma (con la condición de emplear un fármaco exógeno), y la terapia PUVA es un caso particular de fotoquimioterapia, al igual que la PDT.</i>	64
<i>Figura 9. Métodos cuánticos ab initio.</i>	82
<i>Figura 10. Método CASSCF.</i>	83
<i>Figura 11. Método RASSCF.</i>	85
<i>Figura 12. Expansión polielectrónica (CI) y monoelectrónica (conjunto de base). La función de onda total, Φ, se expresa como combinación lineal de las funciones de onda polielectrónicas Ψ_b, Ψ_a^r, etc... A su vez, cada una de estas funciones es un producto antisimetrizado y normalizado de espín-orbitales, χ_i. Cada espín orbital está constituido</i>	

por una función de onda monoeléctronica, ψ_i , y una función de espín, ω . Cada función monoeléctronica es combinación lineal de una serie de funciones de base, ϕ_μ , que suelen ser funciones gaussianas contraídas, CGTFs, esto es, combinaciones lineales de un conjunto de funciones primitivas, g_κ 89

Figura 13. En la contracción segmentada, no todas las primitivas contribuyen a todas las funciones contraídas. En la contracción general, todas las funciones primitivas forman parte de todas las funciones contraídas, con lo que la base es más flexible y constituye un verdadero conjunto de orbitales atómicos..... 90

Figura 14. Espectro electromagnético..... 95

Figura 15. Diagrama de Jablonski, tiempos de vida comunes de los procesos fotofísicos y posibles caminos de desexcitación del primer estado excitado singlete y triplete. 103

Figura 16. Energías verticales y orígenes de banda. Estados vibracionales representados por la letra ν 106

Figura 17. Parámetros espectroscópicos básicos (entre paréntesis figura la geometría optimizada a la cual se realiza el cálculo)..... 106

Figura 18. Mínimo (izquierda) y punto de silla (derecha) en una hipersuperficie de potencial..... 111

Figura 19. Esquema de los procesos moleculares fotofísicos y fotoquímicos más relevantes..... 112

Figura 20. Representación topológica de una intersección cónica entre dos estados electrónicos..... 114

Figura 21. Molécula de psoraleno con los átomos numerados (abajo) y distancias de enlace en angstroms correspondiente al mínimo del estado fundamental (arriba). La flecha define los ángulos positivos de la dirección del momento dipolar y del momento dipolar de transición con respecto al eje largo de pseudosimetría de la molécula. 134

Figura 22. Densidad electrónica diferencial para las principales transiciones de valencia en el psoraleno (en el mínimo del estado fundamental). La densidad electrónica se desplaza, tras interactuar con la radiación, desde las zonas oscuras hasta las zonas claras..... 137

Figura 23. Molécula de psoraleno optimizada en diferentes estados electrónicos. Arriba: $2^1A'$ ($S_1, \pi\pi^*$); abajo: $1^1A''$ ($S_n, n\pi^*$). Las distancias vienen dadas en Å..... 140

Figura 24. Molécula de psoraleno optimizada en diferentes estados electrónicos. Arriba: $1^3A'$ ($T_1, \pi\pi^*$); abajo: $1^3A''$ ($T_n, n\pi^*$). Las distancias vienen dadas en Å..... 141

Figura 25. Densidad de espín para los tripletes más bajos en el psoraleno, calculada a la geometría optimizada del estado fundamental.	142
Figura 26. Energías calculadas a nivel CASPT2 para los estados excitados más bajos del psoraleno a lo largo del LIIC entre los mínimos del S_{π} y del S_n . Las líneas continua y a trazas representan, respectivamente, estados singlete y triplete. Se han incluido también las diferencias de energía (ΔE) y términos de acoplamiento espín-órbita (SOC) entre S_{π} y T_n a las geometrías interpoladas.	147
Figura 27. Geometrías del psoraleno en el punto de STC ($(S_{\pi}/T_n)_X$ –arriba- y en el punto de CI ($(T_n/T_{\pi})_{CI}$ –abajo-).	148
Figura 28. Esquema de la fotofísica en fase gas del psoraleno. Las energías están referidas a $(S_{\pi})_{MIN}$, tomado como origen de energías.	149
Figura 29. Evolución del estado fundamental y de los estados excitados singlete más bajos de la timina a partir de la geometría Franck-Condon a lo largo del MEP $^1(\pi\pi^* HL)$	153
Figura 30. Fotoquímica de la timina y población del triplete.	154
Figura 31. Evolución del MEP desde el STC ($^3n_O\pi^*/^1\pi\pi^*$) _{STC} hasta el mínimo ($^3n_O\pi^*$) _{min}	155
Figura 32. Evolución del MEP a lo largo del estado $^3(\pi\pi^*)$ desde la cónica ($^3n_O\pi^*/^3\pi\pi^*$) _{CI} al mínimo ($^3\pi\pi^*$) _{min}	155
Figura 33. Evolución del MEP a lo largo del estado $^3(\pi\pi^*)$ desde el cruce singlete-triplete ($gs/^3\pi\pi^*$) _{STC} hasta alcanzar el mínimo $^3(\pi\pi^*)$ _{min}	157
Figura 34. Monoaductos y diaducto psoraleno-timina.	159
Figura 35. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del PMA en la ruta triplete vía STC. La fotorreacción comienza tras la población del estado T_1 del psoraleno mediante un proceso ISC a partir del estado S_1	163
Figura 36. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del FMA en la ruta triplete vía STC. La fotorreacción comienza con la población del estado T_1 de la timina merced a un proceso de energy transfer (ET) desde un fotosensibilizador exógeno o endógeno.	163
Figura 37. Estructuras optimizadas para el estado fundamental S_0 del PMA y del FMA, los cruces singlete-triplete ($(S_0/T_1)_{STC}$ e intersecciones cónicas ($(S_0/S_1)_{CI}$). Las distancias C-C más relevantes vienen dadas en Å.	165

- Figura 38. Población de espín en el estado T_1 de los monoadductos (FMA –izquierda-; PMA –derecha-). El FMA presenta densidad en los átomos de carbono del enlace $C_3=C_4$ de la pirona. 167
- Figura 39. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del PMA vía CI en la ruta singlete. La fotorreacción comienza por población directa del estado S_1 del psoraleno por luz UVA. 168
- Figura 40. Mecanismo fotoquímico propuesto para la formación del FMA vía CI en la ruta singlete. La fotorreacción comienza con la población directa del estado S_1 del psoraleno por luz UVA. 169
- Figura 41. Moléculas de psoraleno, 8-metoxipsoraleno (8-MOP), 5-metoxipsoraleno (5-MOP), kelina, trimetilpsoraleno (TMP) y 3-carbetoipsoraleno (3-CPS), en estado fundamental. 171
- Figura 42. Energías CASPT2 para los estados excitados más bajos de psoraleno, 8-MOP y 5-MOP a lo largo del LIIC. Los singletes se representan con línea sólida, y los tripletes con línea de trazos. Se incluye el gap y el SOC ($S_{\pi}T_n$) en cada paso. También se señala con un cuadrado la posición del cruce ($S_{\pi}T_n$)_x. 183
- Figura 43. Energías CASPT2 para los estados excitados más bajos de kelina, TMP y 3-CPS a lo largo del LIIC. Los singletes se representan con línea sólida, y los tripletes con línea de trazos. Se incluye el gap y el SOC ($S_{\pi}T_n$) en cada paso. También se señala con un cuadrado la posición del cruce ($S_{\pi}T_n$)_x. 185
- Figura 44. Esquema del mecanismo de la población del estado T_{π} en las furocumarinas. 186
- Figura 45. Diferencia entre las estructuras de la kelina y las del resto de furocumarinas estudiadas (psoraleno: $A=B=C=D=E=H$; 8-MOP: $B=OCH_3$, $A=C=D=E=H$; 5-MOP: $E=OCH_3$, $A=B=C=D=H$; TMP: $A=B=D=CH_3$, $C=E=H$; 3-CPS: $C=CO_2CH_2CH_3$, $A=B=D=E=H$). 187
- Figura 46. Configuración electrónica y energía experimental de los primeros estados electrónicos de la molécula de oxígeno. 188
- Figura 47. Furocumarinas estudiadas destacando el doble enlace reactivo en estado triplete. 191
- Figura 48. La transferencia de energía T-T es el resultado de dos transferencias electrónicas simultáneas entre el dador (D) y el aceptor (A). 195
- Figura 49. Esquema del proceso TET que tiene lugar entre el psoraleno y el oxígeno. 196

- Figura 50. Disposición FF de la supermolécula [psoraleno-O₂]..... 201
- Figura 51. Curvas de energía potencial de los estados excitados más bajos de la supermolécula [Psoraleno-O₂] en función de la distancia entre ambos fragmentos (R). El acoplamiento H' se obtiene como la mitad de la diferencia de energía $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$ entre el estado inicial 4^1A (T_1 del psoraleno y $^3\Sigma_g^-$ del oxígeno) y el estado final 1^1A (S_0 del psoraleno y $^1\Delta_g$ del oxígeno) de la supermolécula a distancia infinita (ϵ_∞ situación de acoplamiento nulo) y la correspondiente a cada distancia (ϵ_i)..... 202
- Figura 52. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [8MOP-O₂] con la distancia entre los fragmentos..... 204
- Figura 53. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [5MOP-O₂] con la distancia entre los fragmentos..... 204
- Figura 54. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [Kelina-O₂] con la distancia entre los fragmentos..... 205
- Figura 55. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [TMP-O₂] con la distancia entre los fragmentos. 205
- Figura 56. Evolución de los estados excitados más bajos de la supermolécula [3CPS-O₂] con la distancia entre los fragmentos..... 206
- Figura 57. Comparación entre los acoplamientos electrónicos (H') que dan lugar al proceso TET entre una furocumarina y el oxígeno molecular a cada distancia entre los fragmentos R..... 207
- Figura 58. Mecanismo general de población de la ruta triplete de las furocumarinas. Se ha señalado con línea discontinua la consideración de la nueva barrera energética, desde el estado S_π (vertical) al cruce $S_\pi-T_n$ 210
- Figura 59. (a) La molécula no excitada se encuentra en un estado enlazado, mientras que si se excita pasa a un estado disociativo, por lo que la molécula disociará en estado excitado. (b) Un excímero es una combinación de átomos que existe solamente en estado excitado y que se disocia tan pronto como elimina su energía de excitación..... 212
- Figura 60. La fotocicloaddición entre dos timinas contiguas, dando lugar a estructuras tipo ciclobutano, es una lesión frecuente en el ADN. En la imagen ampliada se observa claramente el dímero, constituido por el puente de ciclobutano que une ambas moléculas de timina. Sistema visualizado con el programa Jmol a partir de una estructura obtenida por RMN almacenada en el Protein Data Bank. 213
- Figura 61. Energías relativas (en eV) calculadas a nivel CASTP2(12,12) + BSSE, con respecto a las dos moléculas de timina no interaccionantes en estado fundamental, para

el estado excitado más bajo (S_1) en el estado fundamental de la disposición B-ADN, $^1(TT)_B$, a la geometría relajada del excímero deslocalizado, $^1(TT)_{exc}$, y a la estructura del dímero $T \langle \rangle T$ en estado fundamental (izquierda). También se incluyen la intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$, el estado fundamental del dímero, y la transición más baja del monómero. Los principales parámetros geométricos intermoleculares (distancias C-C en Å) aparecen en cursiva. A la derecha aparece el correspondiente esquema para la citosina. La coordenada Q_x está relacionada principalmente con la distancia intermolecular promedio, mientras que Q_y está asociada con los restantes grados de libertad del sistema. 215

Figura 62. Esquema del proceso de fotodimerización para el dímero de citosina π -stacked (arriba) y para el de timina (abajo) a lo largo de la ruta singlete. Los volúmenes sombreados en la esfera representan regiones de la cadena de ADN con orientaciones reactivas, en los cuales el camino de decaimiento yace por encima de la intersección cónica $(S_1/S_0)_{CI}$ 218

SIGLAS MÁS FRECUENTES

3-CPS	3-carbetoipsoraleno
5-MOP	5-metoxipsoraleno
8-MOP	8-metoxipsoraleno
ANOs	Atomic Natural Orbitals
BSSE	Basis Set Superposition Error
CASPT2	Complete Active Space Perturbation Theory to Second order
CASSCF	Complete Active Space Self-Consistent Field
CI	Configuration Interaction//Conical Intersection
DFT	Density Functional Theory
FCI	Full Configuration Interaction
FMA	Furan-monoadduct
HF	Hartree-Fock
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
IC	Internal Conversion
ISC	Intersystem Crossing
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MEP	Minimum Energy Path
MO	Molecular Orbital
MO-LCAO	Molecular Orbitals as Linear Combination of Atomic Orbitals
PMA	Pyrone-monoadduct
PUVA	Psoralen + UV-A
RASSCF	Restricted-Active Space Self-Consistent Field
SOC	Spin-Orbit Coupling
SOME	Spin-Orbit Matrix Element
STC	Singlet-Triplet Crossing
TET	Triplet-triplet Energy Transfer
TMP	Trimetilpsoraleno
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] J.Ordóñez, V.Navarro, J.M.Sánchez Ron. **Historia de la Ciencia**. Colección Austral. Editorial Espasa-Calpe. 4ª edición. 2005.
- [2] P.Strathern. **El sueño de Mendeléiev: de la alquimia a la química**. Siglo XXI de España Editores. 2000.
- [3] I.Asimov. **Breve historia de la química**. Alianza Editorial. 2004.
- [4] Real Academia Española: www.rae.es
- [5] A. Frova. **Por qué sucede lo que sucede**. Alianza Editorial. 1999.
- [6] F.Vinagre, M.R.Mulero, J.F.Guerra. **Cuestiones curiosas de química**. Alianza Editorial. 2003.
- [7] C.Mans. **Tortilla quemada: 23 raciones de Química cotidiana**. Col·legi Oficial de Químics de Catalunya. 7ª edición. 2007.
- [8] I.Asimov. **Cien preguntas básicas sobre la ciencia**. Alianza Editorial. 2002.
- [9] P.Davies. **El universo desbocado. Del Big Bang a la catástrofe final**. Biblioteca Científica Salvat. Salvat Editores. 1988.
- [10] S.L.Salas, E.Hille, G.J.Etgen. **Calculus de una y varias variables**. Volúmenes I y II. Editorial Reverté. 4ª edición. 2003.
- [11] D.S.Sivia, S.G.Rawlings. **Foundations of Science Mathematics**. Oxford Chemistry Primers. Oxford University Press. 1999.
- [12] A.Estévez, J.Enciso. **Matemáticas**. Editorial McGraw-Hill. Colección Schaum. 2ª edición. 2005.
- [13] G.Ramis, M.C.García. **Quimiometría**. Editorial Síntesis. 2001.
- [14] J.C.Slater. **Physics and the Wave Equation**. *Bull. Am. Math. Soc.* 52 (1946) 392.
- [15] S.Ríos. **Matemática aplicada**. Editorial Paraninfo. 1975.
- [16] P.A.Tipler. **Física para la ciencia y la tecnología**. Volúmenes I y II. Editorial Reverté. 4ª edición. 2001.
- [17] J.A.Fidalgo, M.R.Fernández. **Física General**. Editorial Everest. 8ª edición. 2000.
- [18] J.Català. **Física**. Fundación García Muñoz. 1988.
- [19] P.Atkins. **El Dedo de Galileo. Las diez grandes ideas de la ciencia**. Editorial Espasa Calpe. 2003.
- [20] A.Vian, J.Ocón. **Elementos de Ingeniería Química (Operaciones Básicas)**. Colección Ciencia y Técnica. Editorial Aguilar. 5ª edición. 1979.
- [21] V.Gandia. **Manual de Termodinámica**. Servei de Publicacions de la Universitat de València. 1998.
- [22] J.A Rodríguez, J.J.Ruiz, J.S.Urieta. **Termodinámica química**. Editorial Síntesis. 1999.
- [23] D.Jou, J.E.Llebot. **Introducción a la Termodinámica de procesos biológicos**. Labor Universitaria. 1989.

-
- [24] J.J.Novoa. **Química Física Aplicada**. Colección Manubus. Cálamo Producciones Editoriales. 2ª edición revisada y actualizada. 2002.
- [25] O.Mó, M.Yáñez. **Enlace químico y estructura molecular**. Colección Manubol. J.M. Bosch Editor. 2000.
- [26] J. R.Oppenheimer. **Electron Theory: Description and Analogy**. *Physics Today* (July 1957) 12.
- [27] A.Einstein. **Sobre la teoría de la relatividad especial y general**. Alianza Editorial. 1984.
- [28] S. W.Hawking. **Historia del tiempo. Del big bang a los agujeros negros**. Editorial Crítica. 1988.
- [29] P.W.Atkins, R.S.Friedman. **Molecular Quantum Mechanics**. Oxford University Press. 3rd edition. 1997.
- [30] F.Pilar. **Elementary Quantum Chemistry**. Dover Publications, Inc. 2001.
- [31] J.Bertrán, V.Branchadell, M.Moreno, M.Sodupe. **Química cuántica**. Editorial Síntesis. 2000.
- [32] M.Tegmark, J.A.Wheeler. **Cien años de misterios cuánticos**. *Temas 31 Fenómenos Cuánticos. Investigación y Ciencia* (1er trimestre 2003) 20.
- [33] W.D.Callister,Jr. **Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales**. Volúmenes I y II. Editorial Reverté. 1993.
- [34] M.W.Hanna. **Mecánica Cuántica para Químicos**. Fondo Educativo Interamericano. 1985.
- [35] G.B.Arffen, H.J.Weber. **Mathematical Methods for Physicists**. Elsevier Academic Press. 6th edition. 2005.
- [36] J.De Burgos. **Álgebra Lineal y Geometría Cartesiana**. Editorial McGraw-Hill. 2ª edición. 2000.
- [37] M.M.Woolfson, M.S.Woolfson. **Mathematics for Physics**. Oxford University Press. 2007.
- [38] E.Schrödinger. **An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules**. *Phys. Rev.* 28 (1926) 1049.
- [39] A.Udías Vallina. **Historia de la Física. De Arquímedes a Einstein**. Editorial Síntesis. 2004.
- [40] J.Moncho. **La estructura atómica**. Colección Ciencia Hoy. Editorial Santillana. 1998.
- [41] F.Sotres, A.Moreno. **Experimentum crucis de Óptica Física en la Enseñanza Secundaria**. *Revista Española de Física* 21 -3- (2007) 53.
- [42] R.P.Crease. **El prisma y el péndulo. Los diez experimentos más bellos de la ciencia**. Editorial Crítica. 2003.
- [43] M.N.O.Sadiku. **Elements of Electromagnetics**. Oxford University Press. 3rd edition. 2001.
- [44] S.W.Hawking. **El universo en una cáscara de nuez**. Editorial Crítica. 2001.
- [45] G.Delgado, A.Dobado (Coord. Edit.). **Annus Mirabilis de Einstein 1905**. Secretaría General del Senado (Dirección de Estudios y Documentación/Departamento de Publicaciones) y Real Sociedad Española de Física (RSEF). 2007.
- [46] R.Guardiola, E.Higón, J.Ros. **Métodes numèrics per a la física**. Universitat de València. 3ª edició. 2002.
- [47] G.F.Simmons. **Ecuaciones diferenciales. Con aplicaciones y notas históricas**. Editorial McGraw-Hill. 2ª edición. 1993.

- [48] L.Pauling, E.B.Wilson, Jr. **Introduction to Quantum Mechanics with Applications to Chemistry**. Dover Publications, Inc. 1985.
- [49] R.P.Feynman. **Electrodinámica cuántica. La extraña teoría de la luz y la materia**. Colección Alianza Universidad. Alianza Editorial. 1988.
- [50] G.Roque. **Color y luz**. *Temas 27 El Color*. *Investigación y Ciencia* (1er trimestre 2002) 4.
- [51] H.Moysés Nussenzveig. **Teoría del arco iris**. *Temas 6 La ciencia de la luz*. *Investigación y Ciencia*. P.2.
- [52] F.Aragón de la Cruz. **Historia de la Química. De Lavoisier a Pauling**. Editorial Síntesis. 2004.
- [53] J.Watson, F.Crick. **Molecular Structure of Nucleic Acids**. *Nature* 4356 (1953) 737.
- [54] L.Stryer, J.M.Berg, J.L.Tymoczko. **Bioquímica**. Editorial Reverté. 5ª edición. 2003.
- [55] M.D.Moltó, L.I.Pascual. **Però, què és això de la genètica?**. Servei de Publicacions de la Universitat de València. 1999.
- [56] E.Macià. **El cristal aperiódico de la vida**. *Revista Iberoamericana de Física* (Noviembre 2006) 7.
- [57] Jmol: un visor Java de código abierto para estructuras químicas en tres dimensiones. <http://www.jmol.org/>
- [58] H.R.Drew, R.M.Wing, T.Takano, C.Broka, S.Tanaka, K.Itakura, R.E.Dickerson. **Structure of a B-DNA dodecamer: conformation and dynamics**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 2179.
- [59] Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [60] A.Horta. **Macromoléculas**. Tomos 1 y 2. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 1991.
- [61] J.Roselló, L.Brualla, L.Núñez, F.Sánchez. **Física y tratamiento con radiaciones ionizantes en radioterapia**. *Revista Española de Física* 23 -1- (2009) 33.
- [62] J.L.Sebastián, S.Muñoz, M.Sancho, J.M.Miranda. **Medición de radiación en seres vivos**. *Investigación y Ciencia* (Febrero 2006) 46.
- [63] R.de Nalda, L.Bañares. **El Láser en las Ciencias de la Vida**. *Revista Española de Física* 21 -3- (2007) 36.
- [64] A.Requena, J.Zúñiga. **Espectroscopía**. Pearson Prentice-Hall. 2004.
- [65] A.Lorente, M.J.Fernández. **Interacciones no covalentes con el ADN**. *Anales de Química*, 104 -4- (2008) 280.
- [66] J.S.Casas, V.Moreno, A.Sánchez, J.L.Sánchez, J.Sordo. **Química Bioinorgánica**. Editorial Síntesis. 2002.
- [67] F.Ballester, J.M.Udías. **Física Nuclear y Medicina**. *Revista Española de Física*. 22 -1- (2008) 29.
- [68] A.Muñoz, F.Blanco, G.García. **Efectos de la radiación en sistemas biomoleculares**. *Revista Española de Física*. 22 -1- (2008) 31.
- [69] J.A.Gallego-Juárez. **La Acústica en las Ciencias de la Vida**. *Revista Española de Física*. 22 -1- (2008) 25.
- [70] J.R.Bertomeu Sánchez, A.García Belmar. **La revolución química. Entre la historia y la memoria**. Publicaciones de la Universidad de Valencia. 2006.

- [71] P.Gutiérrez Bueno. **Prontuario de Química, Farmacia y Materia Médica, dividido en tres secciones.** Madrid. Imprenta de Villalpando. 1815.
- [72] R.Bonnett. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy.** Advanced Chemistry Texts. Gordon & Breach Science, Amsterdam. 2000.
- [73] M.Weichenthal, T.Schwarz. **Phototherapy: How does UV work?.** *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 21 (2005) 260.
- [74] The Nobel Foundation: <http://www.nobel.org>
- [75] P.C.Joshi, M.A.Pathak. **Production of singlet oxygen and superoxide radicals by psoralens and their biological significance.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 638.
- [76] Y.N.Konon, R.Gurny, E.Alléman. **State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66 (2001) 89.
- [77] R.Bonnett. **Photosensitizers of the Porphyrin and Phtalocianine Series for Photodynamic Therapy.** *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19.
- [78] A.M.Rouhi. **Let there be light and let it heal.** *Chem. Eng. News* 76 (1998) 22.
- [79] N.J.De Mol, M.J.Beijensbergen van Henegouwen. **Relation between some photobiological properties of furocoumarins and their extent of singlet oxygen production.** *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 815.
- [80] H.Meffert, F.Böhm, E.Bauer. **Cellular membranes as possible main target of combined photochemotherapy.** *Stud. Biophys.* 94 (1983) 41.
- [81] B.R.Scott, M.A.Pathak, G.R.Mohn. **Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions.** *Mut. Res.* 39 (1976) 29.
- [82] P.-S.Song, K.J.Tapley, Jr. **Photochemistry and Photobiology of Psoralens.** *J. Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 1177.
- [83] E.Ben-Hur, P.-S.Song. **The Photochemistry and Photobiology of Furocoumarins (Psoralens).** *Adv. Rad. Biol.* 11 (1984) 131.
- [84] D.Averbeck. **Recent Advances in Psoralen Phototoxicity Mechanism.** *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 859.
- [85] J.Llano, J.Raber, L.A.Eriksson. **Theoretical study of phototoxic reactions of psoralens.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 154 (2003) 235.
- [86] J.Cadet, P.Vigny. **Photochemistry of nucleic acids** in: H. Morrison (Ed.) *Bioorganic Photochemistry I.* John Wiley & Sons, New Jersey. 1990.
- [87] M.Ochsner. **Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39 (1997) 1.
- [88] S.K.Pushpan, S.Venkatraman, V.G.Anand, J.Sankar, D.Parneswaran, S.Ganesan, T.K.Chandrashekar. **Porphyrins in Photodynamic Therapy – A Search for Ideal Photosensitizers.** *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* 2 (2002) 187.
- [89] G.Jori. **Far-red-absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumours.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 62 (1992) 371.
- [90] W.L.Fowlks. **The chemistry of the psoralens.** *J. Invest. Dermatol.* 32 (1959) 249.

- [91] M.A.Pathak, J.H.Fellman. **Activating and Fluorescent Wave-lengths of Furocoumarins: Psoralens.** *Nature* (London) 185 (1960) 382.
- [92] M.A.Pathak, T.B.Fitzpatrick. **The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14 (1992) 3.
- [93] J.E.Hearst. **Photochemistry of the Psoralens.** *Chem. Res. Toxic.* 2 (1989) 69.
- [94] N.Kitamura, S.Kohtani, R.Nagakaki. **Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis.** *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 6 (2005) 168.
- [95] B.J.Parsons. **Psoralen Photochemistry.** *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 813.
- [96] F.Dall'Acqua, P.Martelli. **Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 8 (1991) 235.
- [97] A.B.Lerner, C.R.Denton, T.B.Fitzpatrick. **Clinical and Experimental Studies with 8-Methoxypsoralen in Vitiligo** *J. Invest. Dermatol.* 20 (1953) 50.
- [98] J.A.Parrish, T.B.Fitzpatrick, L.Tanenbaum, M.A.Pathak. **Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxsalen and longwave ultraviolet light.** *N. Eng. J. Med.* 291 (1974) 1207.
- [99] H.Van Weelden, E.Young, J.C.Van der Leun. **Therapy of psoriasis: comparison of photochemotherapy and several variants of phototherapy.** *Br. J. Dermatol.* 103 (1980) 1.
- [100] W.L.Morison. **Psoralen ultraviolet: A therapy in 2004.** *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20 (2004) 315.
- [101] E.Bisagni. **Synthesis of psoralens and analogues.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14 (1992) 23.
- [102] P.-S.Song, S.C.Shim, W.W.Mantulin. **The Electronic Spectra of Psoralens in Their Ground and Triplet Excited States.** *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 315.
- [103] M.Collet, M.Hoebeke, J.Piette, A.Jakobs, L.Lindqvist, A.Van de Vorst. **Photosensitized generation of hydroxyl radical by eight new sulfur and selenium analogs of psoralen.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 35 (1996) 221.
- [104] W.W.Mantulin, P.-S.Song. **Excited States of Skin-Sensitizing Coumarins and Psoralens. Spectroscopic Studies.** *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5122.
- [105] T.A.Moore, M.L.Harter, P.-S.Song. **Ultraviolet spectra of coumarins and psoralens.** *J. Mol. Spectrosc.* 40 (1971) 144.
- [106] E.Yeagers, L.Augenstein. **Absorption and emission spectra of psoralen and 8-methoxy-psoralen in powders and in solutions.** *J. Invest. Dermatol.* 44 (1965) 181.
- [107] H.Matsumoto, Y.Ohkura. **Studies of the Absorption Spectra of Some Psoralens.** *Chem. Pharm. Bull.* 11 (1978) 3433.
- [108] H.K.Kang, E.J.Shin, S.C.Shim. **Comparison of Photophysical and Photochemical Properties of Khellin and 8-Methoxypsoralen.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 12 (1991) 554.
- [109] M.Sasaki, T.Sakata, M.Sukigara. **Photochemical study on the photochemotherapy. I. Solvent effect on fluorescence spectrum of 8-methoxypsoralen.** *Chem. Lett.* (1977) 701.
- [110] T.Sa e Melo, A.Maçanita, M.Prieto, M.Bazin, J.C.Ronfard-Haret, R.Santus. **Photophysical behaviour of 5-methoxypsoralen in dioxane-water mixtures.** *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 429.

- [111] T.Lai, B.T.Lim, E.C.Lim. **Photophysical Properties of Biologically Important Molecules Related to Proximity Effects: Psoralens.** *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7631.
- [112] M.Craw, R.V.Bensasson, J.C.Ronfard-Haret, M.T.Sa E Melo, T.G.Truscott. **Some photophysical properties of 3-carbethoxypsoralen, 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen triplet states.** *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 611.
- [113] H.Matsumoto, A.Isobe. **Solvent Effect on the Emission Spectra and the Fluorescence Quantum Yields of Psoralens.** *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 603.
- [114] D.J.Yoo, H.D.Park, A.R.Kim, Y.S.Rho, S.C.Shim. **Photophysical properties of new psoralen derivatives: Psoralens linked to adenine through polymethylene chains.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 1315.
- [115] M.L.Borges, L.Latterini, F.Elisei, P.F.Silva, R.Borges, R.S.Becker, A.L.Maçanita. **Photophysical Properties and Photobiological Activity of the Furanochromones Visnagin and Khellin.** *Photochem. Photobiol.* 67 (1998) 184.
- [116] P.Vigny, F.Gaboriau, M.Duquesne, E.Bisagni, D.Averbeck. **Spectroscopic properties of psoralen derivatives substituted by carboxy groups at the 3,4 and/or 4', 5' reaction site.** *Photochem. Photobiol.* 30 (1979) 557.
- [117] J.H.Kim, S.W.Oh, Y.S.Lee, S.C.Shim. **Theoretical Studies on the Photocycloaddition Reaction of Psoralen with Thymidine.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 8 (1987) 298.
- [118] H.P.Spielmann, T.J.Dwyer, S.S.Sastry, J.E.Hearst, D.E.Wemmer. **DNA structural reorganization upon conversion of a psoralen furan-side monoadduct to an interstrand cross-link: Implications for DNA repair.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 2345.
- [119] C.Lai, H.Chao, J.E.Hearst, L.Corash, H.Luo, H.Luo, Y.Wang. **Quantitative Analysis of DNA Interstrand Cross-Links and Monoadducts Formed in Human Cells Induced by Psoralens and UVA Irradiation.** *Anal. Chem.* 80 (2008) 8790.
- [120] S.El-Gogary, G.Grabner, G.Köhler. **Photoreactivity of psoralen derivatives in micelles: The roles of hydrophobicity and heavy atom substitution.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 92 (2008) 185.
- [121] E.Yeargers, L.Augenstein. **Molecular orbital calculations of photosensitizing psoralen derivatives.** *Nature* (London) 212 (1966) 251.
- [122] G.G.Aloisi, F.Elisei, S.Moro, G.Miolo, F.Dall'Acqua. **Photophysical Properties of the Lowest Excited Singlet and Triplet States of Thio- and Seleno-psoralens.** *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 506.
- [123] N.E.Koval'skaya, I.V.Sokolova. **The Nature of Electronically Excited States and Photoprocesses in Psoralen Molecules and Their Complexes.** *High Energy Chem.* 36 (2001) 193.
- [124] A.Nakata, T.Baba, H.Takahashi, H.Nakai. **Theoretical Study on the Excited States of Psoralen Compounds Bonded to a Thymine Residue.** *J. Comp. Chem.* 25 (2004) 179.
- [125] J.Tatchen, M.Kleinschmidt, C.M.Marian. **Electronic excitation spectra and singlet-triplet coupling in psoralen and its sulfur and selenium analogs.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 167 (2004) 201.
- [126] J.Tatchen, C.M. Marian. **Vibronic absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra of psoralen: a quantum chemical investigation.** *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 2133.
- [127] R.Boggia, M.Fanciullo, L.Finzi, O.Incani, L.Mosti. **DNA-psoralens molecular recognition using molecular dynamics.** *Il Farmaco* 54 (1999) 202.

- [128] H.Nakai, Y.Yamauchi, A.Nakata, T.Baba, H.Takahashi. **Ab initio molecular dynamics study on the excitation dynamics of psoralen compounds.** *J. Chem. Phys.* 119 (2003) 4223.
- [129] T.M.El-Gogary, E.M.El-Gendy. **Noncovalent attachment of psoralen derivatives with DNA: Hartree-Fock and density functional studies on the probes.** *Spectrochimica Acta A* 59 (2003) 2635.
- [130] J.-P.Demaret, S.Brunie, J.-P.Ballini, P.Vigny. **Geometry of intercalation of psoralens in DNA approached by molecular mechanics.** *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 7.
- [131] T.M.El-Gogary, G.Koehler. **Interaction of psoralens with DNA-bases (II): An ab initio quantum chemical, density functional theory and second-order Møller-Plesset perturbational study.** *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* 895 (2009) 57.
- [132] J.C.Ronfard-Haret, D.Averbeck, R.V.Bensasson, E.Bisagni, E.J.Land. **Some properties of the triplet excited state of the photosensitizing furocoumarin: 3-carbethoxypsoralen.** *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 479.
- [133] K.P.C.Vollhardt, N.E.Schore. **Química Orgánica. Estructura y función.** Editorial Omega. 3ª edición. 2000.
- [134] M.Aida, M.Kaneko, M.Dupuis. **Radiation-induced DNA damage and repair: An approach from ab initio MO method** in: J. Leszczynski (Ed.) *Computational Molecular Biology*. Volumen 8. Elsevier, Amsterdam. 1999.
- [135] B.Durbeej, L.A.Eriksson. **On the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-irradiated DNA: Why are Thymines More Reactive?** *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 159.
- [136] T.Douki, J.Cadet. **Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.** *Biochemistry* 40 (2001) 2495.
- [137] L.Musajo, G.Rodighiero, F.Dall'Acqua. **Evidences of a Photoreaction of the Photosensitizing Furocoumarins with DNA and with Pyrimidine Nucleosides and Nucleotides.** *Experientia XXI/1* (1964) 24.
- [138] M.S.Rocha, N.B.Viana, O.N.Mesquita. **DNA-psoralen interaction: A single molecule experiment.** *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 9679.
- [139] E.J.Land, F.A.P.Rushton, R.L.Beddoes, J.M.Bruce, R.J.Cernik, S.C.Dawson, O.S.Mills. **A [2+2] Photo-adduct of 8-Methoxypsoralen and Thymine: X-Ray Crystal Structure; a Model for the Reaction of Psoralens with DNA in the Phototherapy of Psoriasis.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1982) 22.
- [140] D.Kanne, K.Straub, J.E.Hearst, H.Rapoport. **Isolation and Characterization of Pyrimidine-Psoralen-Pyrimidine Photodiadducts from DNA.** *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6754.
- [141] D.Kanne, K.Straub, H.Rapoport, J.E.Hearst. **Psoralen-Deoxyribonucleic Acid Photoreaction. Characterization of the Monoaddition Products from 8-Methoxypsoralen and 4,5',8-Trimethylpsoralen.** *Biochem.* 21 (1982) 861.
- [142] J.Cadet, L.Voituriez, F.Gaboriau, P.Vigny, S.Della Negra. **Characterization of photocycloaddition products from reaction between thymidine and the monofunctional 3-carbethoxypsoralen.** *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 363.
- [143] J.Blais, J.C.Ronfard-Haret, P.Vigny, J.Cadet, L.Voituriez. **Triplet excited states of 4'-5'-photomonoadducts of 3-carbethoxypsoralen and 8-methoxypsoralen with DNA nucleosides.** *Photochem. Photobiol.* 42 (1985) 599.

- [144] A.Moysan, F.Gaboriau, P.Vigny, L.Voituriez, J.Cadet. **Chemical structure of 3-carbethoxypsoralen-DNA photoadducts.** *Biochimie* 68 (1986) 787.
- [145] P.Saenz-Mendez, R.C.Guedes, D.J.V.A.dos Santos, L.A.Eriksson. **Theoretical study of sequence selectivity and preferred binding mode of psoralen with DNA.** *Res. Lett. Phys. Chem.* 2007 (2007) 60623.
- [146] J.W.Tessman, S.T.Isaacs, J.E.Hearst. **Photochemistry of the Furan-Side 8-Methoxypsoralen-Thymidine Monoadduct Inside the DNA Helix. Conversion to Diadduct and to Pyrone-Side-Monoadduct.** *Biochem.* 24 (1985) 1669.
- [147] T.Sa e Melo, P.Morriere, R.Santus, L.Dubertret. **Photoreactivity of 5-methoxypsoralen with calf thymus DNA upon excitation in the UVA.** *Photochem. Photobiophys.* 7 (1984) 121.
- [148] D.Kanne, H.Rapoport, J.E.Hearst. **8-Methoxypsoralen-Nucleic Acid Photoreaction. Effect of Methyl Substitution on Pyrone vs. Furan Photoaddition.** *J. Med. Chem.* 27 (1984) 531.
- [149] R.V.Bensasson, C.Salet, E.J.Land, F.A.P.Rushton. **Triplet excited state of the 4'-5' photoadduct of psoralen and thymine.** *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 129.
- [150] L.Musajo, F.Bordin, R.Bevilacqua. **Photoreactions at 3655 Å linking the 3-4 double bond of furocoumarins with pyrimidine bases.** *Photochem. Photobiol.* 6 (1967) 927.
- [151] M.Sasaki, F.Meguro, E.Kumazawa, H.Fujita, H.Kakishima, T.Sakata. **Evidence for uptake of 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen by cellular nuclei.** *Mut. Res.* 197 (1988) 51.
- [152] L.Musajo, F.Bordin, G.Caporale, S.Marciani, G.Rigatti. **Photoreactions at 3655 Å between pyrimidine bases and skin-photosensitizing furocoumarins.** *Photochem. Photobiol.* 6 (1967) 711.
- [153] D.Vedaldi, S.Caffieri, F.Dall'Acqua, L.Andreassi, L.Bovalini, P.Martelli. **Khellin, a naturally occurring furochromone, used for the photochemotherapy of skin diseases: mechanism of action.** *Il Farmaco Ed. Sc.* 43 (1987) 333.
- [154] P.C.Joshi, M.A.Pathak. **Photophysical and photobiological properties of 3-carbethoxypsoralen.** *Indian J. Biochem. Biophys.* 32 (1995) 63.
- [155] P.Morriere, H.Hönigsmann, D.Averbeck, M.Dardalhon, G.Hüppe, B.A.Bernhard Ortel, R.Santus, L.Dubertret. **Phototherapeutic, Photobiologic, and Photosensitizing Properties of Khellin.** *J. Invest. Dermatol.* 90 (1988) 720.
- [156] C.N.Knox, E.J.Land, T.G.Truscott. **Singlet oxygen generation by furocoumarin triplet states- I. Linear furocoumarins (psoralens).** *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 359.
- [157] C.Sousa, A.M.Botelho de Rego, T.Sá e Melo. **Singlet oxygen reactivity in water-rich solvent mixtures.** *Quim. Nova* 31 (2008) 1392.
- [158] W.H.Elliott, D.C.Elliott. **Biochemistry and Molecular Biology.** Oxford University Press. 3rd edition. 2005.
- [159] L.Pecorino. **Molecular Biology of Cancer.** Oxford University Press. 2005.
- [160] M. Hotokka, B.Roos, P.Siegbahn. **CASSCF Study of Reaction of Singlet Molecular Oxygen with Ethylene. Reaction Paths with C_2 , and C_S symmetry.** *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5263.
- [161] P.W. Atkins. **Química Física.** Editorial Omega. 6ª edición. 1999.
- [162] I.N.Levine. **Fisicoquímica.** Volúmenes I y II. Editorial McGraw-Hill. 5ª edición. 2004.

- [163] D.Skoog, F.James, T.Nieman. **Principios de Análisis Instrumental**. Editorial McGraw-Hill. 5ª edición. 2000.
- [164] R.Bevilacqua, F.Bordin. **Photo-C4-cycloaddition of psoralen and pyrimidine bases: effect of oxygen and paramagnetic ions**. *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 191.
- [165] W.Poppe, L.I.Grossweiner. **Photodynamic sensitization by 8-methoxypsoralen via the singlet oxygen mechanism**. *Photochem. Photobiol.* 22 (1975) 217.
- [166] P.Davies. **Superfuerza**. Biblioteca Científica Salvat. Salvat Editores. 1988.
- [167] J.D. Barrow. **Las constantes de la Naturaleza**. Editorial Crítica. 2005.
- [168] J.S.Trefill. **De los átomos a los quarks**. Biblioteca Científica Salvat. Salvat Editores. 1988.
- [169] E.Schrödinger. **What is an elementary particle?**. *Endeavour* 9 (1950) 109.
- [170] W.Heisenberg. **The nature of elementary particles**. *Physics Today* (March 1976) 32.
- [171] M.Rivas. **A vueltas con el espín**. *Revista Española de Física.* 20 -3- (2006) 14.
- [172] R.Eisberg, R.Resnick. **Física Cuántica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos y partículas**. Editorial Limusa. Grupo Noriega Editores. 2002.
- [173] P.-O.Widmark, B.O.Roos (Eds.). **European Summerschool of Quantum Chemistry 2005**. Books I, II, III. Lund University. 2005.
- [174] T.Helgaker, P.Jørgensen, J.Olsen. **Molecular Electronic-Structure Theory**. John Wiley & Sons. 2004.
- [175] S.C.Chapra, R.P.Canale. **Métodos numéricos para ingenieros con programas de aplicación**. Editorial McGraw-Hill. 4ª edición. 2003.
- [176] I.N.Levine. **Química Cuántica**. Editorial Prentice-Hall. 5ª edición. 2001.
- [177] A.Szabo, N.S.Ostlund. **Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory**. Dover Publications, Inc. 1996.
- [178] T. Kato. **Fundamental Properties of Hamiltonian Operators of Schrödinger Type**. *Trans. Amer. Math. Soc.* 70 (1951) 195.
- [179] C.C.J. Roothaan. **New Developments in Molecular Orbital Theory**. *Rev. Mod. Phys.* 23 (1951) 69.
- [180] M.R.Spiegel, J.Schiller, R.A.Srinivasan. **Probabilidad y Estadística**. Serie Schaum. Editorial McGraw-Hill. 2ª edición. 2001.
- [181] M.Merchán. **Determinación de orbitales moleculares óptimos en una aproximación monodeterminantal a la función de onda**. Departamento de Química Física. Universidad de Valencia. 1987.
- [182] J.Casabó. **Estructura atómica y enlace químico**. Editorial Reverté. 1996.
- [183] J.Andrés, J.Bertrán (Eds.). **Química Teórica y Computacional**. Colección Ciencias Experimentales. Universitat Jaume I. 2000.
- [184] J.M.Mercero, J.M.Matxain, X.López, D.M.Cork, A.Largo, L.A.Eriksson, J.M.Ugalde. **Theoretical Methods that Help Understanding the Structure and Reactivity of Gas Phase Ions**. *Int. J. Mass Spectrom.* 240 (2005) 37.
- [185] J.A.Pople. **Nobel Lecture: Quantum chemical models**. *Rev. Mod. Phys.* 71 (1998) 1267.

- [186] J.C.Slater. **The Electronic Structure of Atoms – The Hartree-Fock Method and Correlation.** *Rev. Mod. Phys.* 35 (1963) 484.
- [187] B.O.Roos, K.Andersson, M.P.Fülscher, P.-Å.Malmqvist, L.Serrano-Andrés, K.Pierloot, M.Merchán. **Multiconfigurational perturbation theory: Applications in electronic spectroscopy** in: I. Prigogine, I.; S.A. Rice (Eds.) *Advances in Chemical Physics: New Methods in Computational Quantum Mechanics, Vol. XCIII.* Eds. John Wiley & Sons, New York.1996.
- [188] M.Merchán, L.Serrano-Andrés. **Ab Initio Methods for Excited States** in: M. Olivucci (Ed.) *Computational Photochemistry.* Elsevier, Amsterdam. 2005.
- [189] L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Quantum chemistry of the excited state: 2005 overview.** *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* 729 (2005) 99.
- [190] B.O.Roos, P.R.Taylor. **A complete active space SCF method (CASSCF) using a density matrix formulated super-CI approach.** *Chem. Phys.* 48 (1980) 157.
- [191] J.Almlöf, A.V.Nemukhin, A.Heiberg. **Treatment of Excited States in the CASSCF Method: Application to BO.** *Int. J. Quantum Chem.* 20 (1981) 655.
- [192] B.O.Roos, P.Linse. **A simple method for the evaluation of the second-order perturbation energy from external double-excitations with a CASSCF reference wavefunction.** *Chem. Phys.* 66 (1982) 197.
- [193] P.E.M.Siegbahn, J.Almlöf, A.Heiberg, B.O.Roos. **The complete active space SCF (CASSCF) method in a Newton-Raphson formulation with application to the HNO molecule.** *J. Chem. Phys.* 74 (1992) 2384.
- [194] P.-Å.Malmqvist, B.O.Roos. **The CASSCF State Interaction Method.** *Chem. Phys. Lett.* 155 (1989) 189.
- [195] K.Andersson, P.-Å.Malmqvist, B.O.Roos, A.J.Sadlej, K.Wolinski. **Second-Order Perturbation Theory with a CASSCF Reference Function.** *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 5483.
- [196] K.Andersson, P.-Å.Malmqvist, B.O.Roos. **2nd-order perturbation-theory with a complete active space self-consistent field reference function.** *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 1218.
- [197] K.Andersson, B.O.Roos. **Multiconfigurational Second-Order Perturbation Theory: A Test of Geometries and Binding Energies.** *Int. J. Quantum Chem.* 45 (1993) 591.
- [198] B.O.Roos, K.Andersson. **Multiconfigurational perturbation theory with level shift – the Cr2 potential revisited.** *Chem. Phys. Lett.* 245 (1995) 215.
- [199] B.O.Roos, K.Andersson, M.P.Fülscher, L.Serrano-Andrés, K.Pierloot, M.Merchán, V.Molina. **Applications of level shift corrected perturbation theory in electronic spectroscopy.** *J. Mol. Struct. (Theochem)* 388 (1996) 257.
- [200] N.Forsberg, P.-Å.Malmqvist. **Multiconfigurational Perturbation Theory with Imaginary Level Shift.** *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 196.
- [201] L.Serrano-Andrés, M.Merchán, I.Nebot-Gil, R.Lindh, B.O.Roos. **Towards an accurate molecular orbital theory of excited states: Ethene, butadiene, and hexatriene.** *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3151.
- [202] M.Rubio, B.O.Roos, L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Theoretical study of the electronic spectrum of magnesium-porphyrin.** *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 7202.
- [203] L.Serrano-Andrés, M.Merchán, A.C.Borin. **A three-state model for the photophysics of adenine.** *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6559.

- [204] L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Photostability and Photoreactivity in Biomolecules: Quantum Chemistry of Nucleic Acid Base Monomers and Dimers** in: Shukla, M. K.; Leszczynski, J. (Eds.) *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*. Springer, The Netherlands. 2008.
- [205] A.D.Becke. **Density Functional Thermochemistry. 3. The Role of Exact Exchange**. *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [206] A.Dreuw, M.Head-Gordon. **Single-Reference ab Initio Methods for the Calculation of Excited States of Large Molecules**. *Chem. Rev.* 105 (2005) 4009.
- [207] S.Grimme, M.Waletzke. **A combination of Kohn-Sham density functional theory and multi-reference configuration interaction methods**. *J. Chem. Phys.* 111 (1999) 5645.
- [208] R.C. Raffenetti. **General contraction of Gaussian atomic orbitals: Core, valence, polarization, and diffuse basis sets; Molecular integral evaluation**. *J. Chem. Phys.* 58 (1973) 4452.
- [209] E.R.Davidson, D.Feller. **Basis Set Selection for Molecular Calculations**. *Chem. Rev.* 86 (1986) 681.
- [210] I.Shavitt. **The History and Evolution of Gaussian Basis Sets**. *Isr. J. Chem.* 33 (1993) 357.
- [211] F.Jensen. **Introduction to Computational Chemistry**. John Wiley & Sons. 2001.
- [212] R.Pou-Amérgo. **Construcción, calibrado y aplicaciones de conjuntos de base de orbitales naturales atómicos para los metales de la primera serie de transición**. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 1995.
- [213] J.A.Pople. **Molecular Orbital Methods in Organic Chemistry**. *Accounts Chem. Res.* 3 (1970) 217.
- [214] J.Almlöf, P.R.Taylor. **General contraction of Gaussian basis sets. I. Atomic natural orbitals for first- and second-row atoms**. *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 4070.
- [215] J.Almlöf, P.R.Taylor. **Atomic Natural Orbital (ANO) Basis Sets for Quantum Chemical Calculations**. *Adv. Quant. Chem.* 22 (1991) 301.
- [216] P.-O.Widmark, P.-Å.Malmqvist, B.O.Roos. **Density matrix averaged atomic natural orbital (ANO) basis sets for correlated molecular wave functions**. *Theor. Chim. Acta* 77 (1990) 291.
- [217] S.F.Boys, F.Bernardi. **The calculation of small molecular interactions by the difference of separate total energies. Some procedures with reduced errors**. *Mol. Phys.* 19 (1970) 553.
- [218] F.B.Van Duijneveldt, J.G.C.M. Van Duijneveldt-Van de Ridjt, J.H. Van Lenthe. **State of the Art in Counterpoise Theory**. *Chem. Rev.* 94 (1994) 1873.
- [219] I.N.Levine. **Espectroscopia Molecular**. Editorial AC. 1980.
- [220] J.Planelles, I.Climente, J.G.Díaz. **Espectroscòpia**. Publicacions de la Universitat Jaume I. 2002.
- [221] D.C.Harris, M.D.Bertolucci. **Symmetry and Spectroscopy. An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy**. Dover Publications, Inc. 1989.
- [222] E.B.Wilson,Jr., J.C.Decius, P.C.Cross. **Molecular Vibrations. The Theory of Infrared and Raman Vibrational Spectra**. Dover Publications, Inc. 1980.
- [223] L.Serrano-Andrés. **Estudio teórico del espectro electrónico de sistemas orgánicos**. Tesis doctoral. Departamento de Química Física. Universidad de Valencia. 1994.
- [224] D.C.Harris. **Análisis Químico Cuantitativo**. Grupo Editorial Iberoamérica. 1992.

- [225] R.S.Mulliken. **Band Spectra and Chemistry**. *Chem. Rev.* 6 (1930) 503.
- [226] L.Smart, E.Moore. **Química del estado sólido: una introducción**. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana. 1995.
- [227] D.F.Shriver, P.W.Atkins, C.H.Langford. **Química Inorgánica**. Volúmenes 1 y 2. Editorial Reverté. 1998.
- [228] K.Wittel, S.P.McGlynn. **The Orbital Concept in Molecular Spectroscopy**. *Chem. Rev.* 77 (1977) 745.
- [229] L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Spectroscopy: Applications** in: Schleyer, PvR. *et al.* (Eds.) *Encyclopedia of Computational Chemistry*. Wiley, Chichester. 2004.
- [230] L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Vida y Luz. Una Perspectiva Químico-Cuántica**. *Anales de Química*, 100 -3- (2004) 16.
- [231] M.Hamermesh. **Group Theory and its application to physical problems**. Addison-Wesley Publishing Company. 1962.
- [232] H.H.Jaffé, M.Orchin. **Simetría en Química**. Editorial Alhambra. 1967.
- [233] D.M.Bishop. **Group Theory and Chemistry**. Dover Publications, Inc. 1993.
- [234] F.A.Cotton. **La teoría de grupos aplicada a la química**. Editorial Limusa. 2ª edición. 1977.
- [235] T.Azumi, K.Matsuzaki. **What does the term “vibronic coupling” mean?**. *Photochem. Photobiol.* 25 (1977) 315.
- [236] S.J.Strickler. **Spectroscopic Effects of a Breakdown of the Born-Oppenheimer Approximation**. *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 2149.
- [237] S.J.Strickler, R.A.Berg. **Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules**. *J. Chem. Phys.* 37 (1962) 814.
- [238] J.L.McHale. **Molecular Spectroscopy**. Prentice-Hall, Upper Saddle River. 1999.
- [239] M.Klessinger, J.Michl. **Excited States and Photochemistry of Organic Molecules**. VCH Publishers. 1995.
- [240] J.Michl. **Photochemical Reactions of Large Molecules. I. A Simple Physical Model of Photochemical Reactivity**. *Mol. Photochem.* 4 (1972) 243.
- [241] J.Michl. **Photochemical Reactions of Large Molecules. II. Application of the Model to Organic Photochemistry**. *Mol. Photochem.* 4 (1972) 257.
- [242] J.Michl. **Photochemical Reactions of Large Molecules. III. Use of Correlation Diagrams for Prediction of Energy Barriers**. *Mol. Photochem.* 4 (1972) 287.
- [243] E.Teller. **The crossing of potencial surfaces**. *J. Phys. Chem.* 41 (1) (1937) 109.
- [244] G.Herzberg, H.C.Longuet-Higgins. **Intersection of Potential Energy Surfaces in Polyatomic Molecules**. *Discuss. Faraday Soc.* 35 (1963) 77.
- [245] M.Klessinger. **Conical intersections and the Mechanism of Singlet Photoreactions**. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 549.
- [246] F.Bernardi, M.Olivucci, M.A.Robb. **Potential energy surface crossings in organic photochemistry**. *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 321.

- [247] K.Andersson, M.Barysz, A.Bernhardsson, M.R.A.Blomberg, P.Boussard, D.L.Cooper, T.Fleig, M.P.Fülscher, B.Hess, G.Karlström, R.Lindh, P.-Å.Malmqvist, P.Neogrady, J.Olsen, B.O.Roos, A.J.Sadlej, B.Schimmelpfennig, M.Schütz, L.Seijo, L.Serrano-Andrés, P.E.Siegbahn, J.Stålring, T.Thorsteinsson, V.Veryazov, U.Wahlgren, and P.-O.Widmark. **MOLCAS, Version 6.0**. Department of Theoretical Chemistry, Chemical Center, University of Lund, P.O.B. 124, S-221 00 Lund, Sweden 2002.
- [248] G.Karlström, R.Lindh, P.-Å.Malmqvist, B.O.Roos, U.Ryde, V.Veryazov, P.-O.Widmark, M.Cossi, B.Schimmelpfennig, P.Neogrady, L.Seijo. **MOLCAS: a program package for computational chemistry**. *Comp. Mat. Sci.* 28 (2003) 222.
- [249] V.Veryazov, P.O.Widmark, L.Serrano-Andrés, R.Lindh, B.O.Roos. **2MOLCAS as a development platform for quantum chemistry software**. *Int. J. Quantum Chem.* 100 (2004) 626.
- [250] M.J.Frisch, G.W.Trucks, H.B.Schlegel, G.E.Scuseria, M.A.Robb, J.R.Cheeseman, V.G.Zakrzewski, J.A.Montgomery, Jr., R.E.Stratmann, J.C.Burant, S.Dapprich, J.M.Millam, A.D.Daniels, K.N.Kudin, M.C.Strain, O.Farkas, J.Tomasi, V.Barone, M.Cossi, R.Cammi, B.Mennucci, C.Pomelli, C.Adamo, S.Clifford, J.Ochterski, G.A.Petersson, P.Y.Ayala, Q.Cui, K.Morokuma, D.K.Malick, A.D.Rabuck, K.Raghavachari, J.B.Foresman, J.Cioslowski, J.V.Ortiz, B.B.Stefanov, G.Liu, A.Liashenko, P.Piskorz, I.Komaromi, R.Gomperts, R.L.Martin, D.J.Fox, T.Keith, M.A.Al-Laham, C.Y.Peng, A.Nanayakkara, C.González, M.Challacombe, P.M.W.Gill, B.Johnson, W.Chen, M.W.Wong, J.L.Andrés, M.Head-Gordon, E.S.Replogle, J.A.Pople. **Gaussian 98, revision A.6**. Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 1998.
- [251] G.Schaftenaar, J.H.Noordik. **Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures**. *J. Comp.-Aided Mol. Des.* 14 (2000) 123.
- [252] R.E.Buntrock. **ChemOffice ultra 7.0**. *J. Chem. Inform. Comp. Sci.* 42 (2002) 1505.
- [253] L.Serrano-Andrés, M.Merchán, A.C.Borin. **Adenine and 2-aminopurine: Paradigms of modern theoretical photochemistry**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 8691.
- [254] M.Merchán, L.Serrano-Andrés, M.A.Robb, L.Blancafort. **Triplet-state formation along the ultrafast decay of excited singlet cytosine**. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 1820.
- [255] B.O.Roos, P.-Å.Malmqvist. **Relativistic quantum chemistry: the multiconfigurational approach**. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (2004) 2919.
- [256] S.J.Strickler, R.A.Berg. **Relationship between Absorption Intensity and Fluorescence Lifetime of Molecules**. *J. Chem. Phys.* 37 (1962) 814.
- [257] M.Merchán, L.Serrano-Andrés, M.A.Robb, L.Blancafort. **Triplet-State Formation along the Ultrafast Decay of Excited Cytosine**. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 1820.
- [258] L.Serrano-Andrés, R.Lindh, B.O.Roos, M.Merchán. **Theoretical Study of the Electronic Spectrum of all-trans-1,3,5,7-octatetraene**. *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9360.
- [259] G.Olaso-González. **Estudio teórico de procesos fotoinducidos en sistemas biológicos**. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 2009.
- [260] L.De Vico, M.Olivucci, R.Lindh. **New general tools for constrained geometry optimizations**. *J. Chem. Theory Comput.* 1 (2005) 1029.
- [261] X.-J.Lu, W.K.Olson. **3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures**. *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5108.
- [262] M.Boggio-Pasqua, G.Groenhof, L.V.Schafer, H.Grubmuller, M.A.Robb. **Ultrafast deactivation channel for thymine dimerization**. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10996.

- [263] L.Serrano-Andrés, M.Merchán, R.Lindh. **Computation of conical intersections by using perturbation techniques.** *J. Chem. Phys.* 122 (2005) 104107.
- [264] D.J.Tozer, R.D.Amos, N.C.Handy, B.O.Roos, L.Serrano-Andrés. **Does density functional theory contribute to the understanding of excited states of unsaturated organic compounds?.** *Mol. Phys.* 97 (1999) 859.
- [265] Ò.Rubio-Pons, L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **A theoretical insight into the photophysics of acridine.** *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 9664.
- [266] M.A.El-Sayed. **Spin-Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics.** *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 2834.
- [267] P.Avouris, W.M.Gelbart, M.A.El-Sayed. **Nonradiative electronic relaxation under collision-free conditions.** *Chem. Rev.* (Washington D.C.) 77 (1977) 793.
- [268] J.Tatchen, N.Gilka, C.M.Marian. **Intersystem Crossing Driven by Vibronic Spin-Orbit Coupling: A Case Study on Psoralen.** *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5209.
- [269] W.A.Wassam,Jr., E.C.Lim. **Proximity effect in radiationless transitions.** *J. Chem. Phys.* 68 (1978) 433.
- [270] M.Merchán, L.Serrano-Andrés. **Ultrafast internal conversion of excited cytosine via the lowest $\pi\pi^*$ electronic singlet state.** *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8108.
- [271] J.H.Kim, S.H.Shon. **Theoretical Studies on the Photochemical Reaction of Psoralen with Purine and Pyrimidine Base.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 13 (1992) 173.
- [272] J.H.Kim, S.H.Shon, G.S.Lee, S.K.Yang, S.W.Hong. **Theoretical Studies on the Photochemical Reaction of Psoralen. Photocycloaddition of Angelicin with Thymine.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 14 (1993) 487.
- [273] J.H.Kim, S.H.Shon, S.K.Yang. **Theoretical Studies on the Photochemical Reaction of Psoralen Derivatives.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 15 (1994) 597.
- [274] J.H.Kim, S.H.Shon, S.K.Yang, I.H.Cho, S.W.Hong. **Theoretical Studies on the Photochemical Reaction of Monofunctional Psoralen Derivatives with Thymine.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 18 (1997) 123.
- [275] T.M.El-Gogary, G.Koehler. **Interaction of psoralens with DNA-bases (I). An *ab initio* quantum chemical, density functional theory and second-order Møller-Plesset perturbational study.** *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* 808 (2007) 97.
- [276] A.Nakata, T.Baba, H.Nakai. **Theoretical Design of Monofunctional Psoralen Compounds in Photochemotherapy.** *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 80 (2007) 1341.
- [277] B.H.Johnston, M.A.Johnson, C.B.Moore, J.E.Hearst. **Psoralen-DNA Photoreaction: Controlled Production of Mono- and Diadducts with Nanosecond Ultraviolet Laser Pulses.** *Science* 197 (1977) 906.
- [278] R.V.Bensasson, E.J.Land, C.Salet. **Triplet excited state of furocoumarins: Reaction with nucleic acid bases and amino acids.** *Photochem. Photobiol.* 27 (1978) 273.
- [279] J.Eisinger, R.G.Shulman. **Excited Electronic States of DNA.** *Science* 161 (1968) 1311.
- [280] M.Tanaka, S.Nagakura. **Electronic Structures and Spectra of Adenine and Thymine.** *Theoret. Chim. Acta* 6 (1966) 320.
- [281] G.N.Ten, V.I.Baranov. **Analysis of Electronic-Vibronic Spectra of Uracil, Thymine, and Cytosine.** *Opt. and Spect.* 97 (2004) 195.

- [282] J.Lorentzon, M.Fülscher, B.O.Roos. **Theoretical Study of the Electronic Spectra of Uracil and Thymine.** *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 9265.
- [283] M.Merchán, R.González-Luque, T.Climent, L.Serrano-Andrés, E.Rodríguez, M.Reguero, D.Peláez. **Unified Model for the Ultrafast Decay of Pyrimidine Nucleobases.** *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 26471.
- [284] C.E.Crespo-Hernández, B.Cohen, P.M.Hare, B.Kohler. **Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids.** *Chem. Rev.* 104 (2004) 1977.
- [285] S.Perun, A.L.Sobolewski, W.Domcke. **Conical Intersections in Thymine.** *J. Phys. Chem. A* 110 (2006) 13238.
- [286] T.Gustavsson, A.Bányász, E.Lazzarotto, D.Markovitsi, G.Scalamani, M.J.Frisch, V.Barone, R.Improta. **Singlet excited-state behavior of uracil and thymine in aqueous solution: A combined experimental and computational study of 11 uracil derivatives.** *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 607.
- [287] P.M.Hare, C.E.Crespo-Hernández, B.Kohler. **Internal conversion to the electronic ground state occurs via two distinct pathways for pyrimidine bases in aqueous solution.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 435.
- [288] P.D.Wood, R.W.Redmon. **Triplet state interactions between nucleic acid bases in solution at room temperature: Intermolecular energy and electron transfer.** *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 4256.
- [289] R.Abouaf, J.Pommier, H.Dunet, P.Quan, P.C.Nam, M.T.Nguyen. **The triplet state of cytosine and its derivatives: Electron impact and quantum chemical study.** *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 11668.
- [290] R.B.Woodward, R.Hoffmann. **The Conservation of Orbital Symmetry.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 8 (1969) 781.
- [291] J.Clayden, N.Greeves, S.Warren, P.Wothers. **Organic Chemistry.** Oxford University Press. 2001.
- [292] W.Th.A.M.van der Lugt, L.J.Oosterhoff. **Symmetry Control and Photoinduced Reactions.** *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 6042.
- [293] F.Bernardi, A.Bottoni, M.A.Robb, H.Bernhard Schlegel, G.Tonachini. **An MC-SCF Study of the Thermal Cycloaddition of Two Ethylenes.** *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 2260.
- [294] F.Bernardi, S.De, M.Olivucci, M.A.Robb. **Mechanism of Ground-State-Forbidden Photochemical Pericyclic Reactions: Evidence for Real Conical Intersections.** *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 1737.
- [295] F.Bernardi, M.Olivucci, M.A.Robb. **Predicting Forbidden and Allowed Cycloaddition Reactions: Potential Surface Topology and Its Rationalization.** *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 405.
- [296] F.Bosca, V.Lhiaubet-Vallet, M.C.Cuquerella, J.V.Castell, M.A.Miranda. **The triplet energy of thymine in DNA.** *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6318.
- [297] D.Roca-Sanjuán, G.Olaso-González, I.González-Ramírez, L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Molecular Basis of DNA Photodimerization: Intrinsic Production of Cyclobutane Cytosine Dimers.** *J. Am. Chem. Soc.* In press.
- [298] G.Olaso-González, D.Roca-Sanjuán, L.Serrano-Andrés, M.Merchán. **Toward the Understanding of DNA Fluorescence: The Singlet Excimer of Cytosine.** *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 231102.
- [299] W.J.Schreier, T.E.Schrader, F.O.Soller, P.Gilch, C.E.Crespo-Hernández, V.N.Swaminathan, T.Carell, W.Zinth, B.Kohler. **Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction.** *Science* 315 (2007) 625.
- [300] R.S. Mulliken. **Electronic Population Analysis on LCAO—MO Molecular Wave Functions. I.** *J. Chem. Phys.* 23 (1955) 1833.

- [301] O.Tapia. **Solvent effects theories: quantum and classical formalisms and their applications in chemistry and biochemistry.** *J. Math. Chem.* 10 (1992) 139.
- [302] P.H. Krupenie. **The Spectrum of Molecular Oxygen.** *J. Phys. Chem.* 1 (1972) 423.
- [303] F. Nyasulu, J. Macklin, W. Cusworth III. **The Visible Spectrum of Liquid Oxygen in the General Chemistry Laboratory.** *J. Chem. Ed.* 79 (2002) 356.
- [304] D. Tudela, V. Fernández. **The Excited States of Molecular Oxygen.** *J. Chem. Ed.* 80 (2003) 1381.
- [305] H. Partridge, C.W. Bauschlicher, Jr., S.R. Langhoff, P.R. Taylor. **Theoretical study of the low-lying bound states of O₂.** *J. Chem. Phys.* 95 (1991) 8292.
- [306] A.J. MacRobert, D. Phillips. **Photodynamic Therapy.** *Chem. & Ind.* (6 January 1992) 17.
- [307] D. Phillips. **The photochemistry of sensitizers for photodynamic therapy.** *Pure & Appl. Chem.* 67 (1995) 117.
- [308] O.Arad, A.Gavaldá, Ó.Rey, N.Rubio, D.Sánchez-García, J.I.Borrell, J.Teixidó, S.Nonell, M.Cañete, A.Juarranz, A.Villanueva, J.C.Stockert, P.J.Díaz. **Porphycene for cancer photochemotherapy and other biomedical applications.** *Afinidad* 59 (2002) 343.
- [309] K.R.Weishaupt, C.J.Gomer, T.J.Dougherty. **Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor.** *Cancer Res.* 36 (1976) 2326.
- [310] B.C.Wilson, M.S.Patterson. **The physics of photodynamic therapy.** *Phys. Med. Biol.* 31 (1986) 327.
- [311] W-F.Cheong, S.A.Prahl, A.J.Welch. **A Review of the Optical Properties of Biological Tissues.** *IEEE J. Quantum Elect.* 26 (1990) 2166.
- [312] B.C.Wilson, M.S.Patterson. **The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy.** *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61.
- [313] N.J.de Mol. **Involvement of molecular singlet oxygen in the photosensitizing action of furocoumarins.** *Pharmaceutisch Weekblad* 3 (1981) 599.
- [314] D.Averbeck, L.Dubertret, M.Craw, T.G.Truscott, F.Dall'Acqua, P.Rodighiero, D.Vedaldi, E.J. Land. **Photophysical, photochemical and photobiological studies of 4'-methylangelicins, potential agents for photochemotherapy.** *Il Farmaco* 39 (1983) 57.
- [315] Q.A.Blan, L.I.Grossweiner. **Singlet oxygen generation by furocoumarins: effect of DNA and liposomes.** *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 177.
- [316] M.A.Pathak, P.C.Joshi. **Production of active oxygen species (¹O₂ and O₂⁻) by psoralens and ultraviolet radiation (320-400 nm).** *Biochimica et Biophysica Acta* 798 (1984) 115.
- [317] P.Martelli, L. Bovalini, S. Ferri, G.G. Franchi, M. Bari. **Active oxygen forms in photoreaction between DNA and furanochromones khellin and visnagin.** *Febs Letters* 189 (1985) 255.
- [318] H.Y.Aboul-Enein, A.Kladna, I.Kruk, K.Lichszeld, T.Michalska. **Effect of Psoralens on Fenton-Like Reaction Generating Reactive Oxygen Species.** *Biopolimers (Biospectroscopy)* 72 (2003) 59.
- [319] N.J.de Mol, G.M.J.Beijersbergen van Henegouwen, B.van Beele. **Singlet oxygen formation by sensitization of furocoumarins complexed with, or bound covalently to DNA.** *Photochem. Photobiol.* 34 (1981) 661.
- [320] S.G.Jones, A.R.Young, T.G.Truscott. **Singlet oxygen yields of furocoumarins and related molecules – the effect of excitation wavelength.** *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 21 (1993) 223.

- [321] D.Vedaldi, F.Dall'Acqua, A.Gennaro, G. Rodighiero. **Photosensitized Effects of Furocoumarins: the Possible Role of Singlet Oxygen.** *Z. Naturforsch.* 38 (1983) 866.
- [322] F.Wilkinson. **Transfer of Triplet State Energy and the Chemistry of Excited States.** *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 2569.
- [323] G.W.Robinson, R.P.Frosch. **Electronic Excitation Transfer and Relaxation.** *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 1187.
- [324] A.A.Gorman, I.Hamblett, C.Lambert, B.Spencer, M.C.Standen. **Identification of Both Preequilibrium and Diffusion Limits for Reaction of Singlet Oxygen, $O_2(^1\Delta_g)$, with Both Physical and Chemical Quenchers: Variable-Temperature, Time-Resolved Infrared Luminescence Studies.** *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8053.
- [325] O.L.J.Gijzeman, F.Kaufman, G.Porter. **Oxygen Quenching of Aromatic Triplet States in Solution. Part 1.** *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 69 (1973) 708.
- [326] O.L.J.Gijzeman, F.Kaufman, G.Porter. **Oxygen Quenching of Aromatic Triplet States in Solution. Part 2.** *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 69 (1973) 721.
- [327] O.L.J.Gijzeman, F.Kaufman, G.Porter. **Interaction between Oxygen and Aromatic Molecules.** *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 70 (1974) 1143.
- [328] F.Wilkinson, D.J.McGarvey, A.F.Olea. **Excited Triplet State Interactions with Molecular Oxygen: Influence of Charge Transfer on the Bimolecular Quenching Rate and the Yields of Singlet Oxygen (O_2^* , $^1\Delta_g$) for Substituted Naphthalenes in Various Solvents.** *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 3762.
- [329] A.F.Olea, F.Wilkinson. **Singlet Oxygen Production from Excited Singlet and Triplet States of Anthracene Derivatives in Acetonitrile.** *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 4518.
- [330] S.Wang, R.Gao, F.Zhou, M.Selke. **Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy.** *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 487.
- [331] Th. Förster. **Transfer Mechanisms of Electronic Excitation, 10th Spiers Memorial Lecture, 1959.**
- [332] J.R. Lakowicz. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2nd edition. 1999.
- [333] J. Barber. **Biophysics of photosynthesis.** *Rep. Prog. Phys.* 41 (1978) 1157.
- [334] H. Singh, B. Bagchi. **Non-Förster distance and orientation dependence of energy transfer and applications of fluorescence resonance energy transfer to polymers and nanoparticles: How accurate is the spectroscopic ruler with 1/R⁶ rule?.** *Current Science* 89 (2005) 1710.
- [335] L. Stryer, R.P. Haugland. **Energy transfer: A spectroscopic ruler.** *Biochem.* 58 (1967) 719.
- [336] D.L. Dexter. **A Theory of Sensitized Luminescence in Solids.** *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 836.
- [337] D.W. Liao, W.D.Cheng, J.Bigman, Y.Kami, S.Speiser, S.H.Lin. **On Theoretical Treatments of Electronic Excitation Energy Transfer.** *J. Chin. Chem. Soc.* 42 (1995) 177.
- [338] G.D.Scholes, K.P.Ghiggino. **Rate expressions for excitation transfer. I. Radiationless transition theory perspective.** *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 1251.
- [339] R.D.Harcourt, G.D.Scholes, K.P.Ghiggino. **Rate expressions for excitation transfer. II. Electronic considerations of direct and through-configuration exciton resonance interactions.** *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 10521.

- [340] G.D.Scholes, R.D.Harcourt. **Configuration interaction and the theory of electronic factors in energy transfer and molecular exciton interactions.** *J. Chem. Phys.* 104 (1996) 5054.
- [341] G.D.Scholes. **Energy Transfer and Spectroscopic Characterization of Multichromophoric Assemblies.** *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 18731.
- [342] C.-P.Hsu. **The Electronic Couplings in Electron Transfer and Excitation Energy Transfer.** *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 509.
- [343] M.J. Paterson, O. Christiansen, F. Jensen, P.R. Ogilby. **Overview of Theoretical and Computational Methods Applied to the Oxygen-Organic Molecule Photosystem.** *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1136.
- [344] A.Terenin, V.Ermolaev. **Sensitized phosphorescence in organic solutions at low temperature. Energy transfer between triplet states.** *Trans. Faraday Soc.* 52 (1956) 1042.
- [345] N.J.Turro. **Modern molecular photochemistry.** University Science Books, Sausalito.1991.
- [346] Z-Q.You, C-P.Hsu, G.R.Fleming. **Triplet-triplet energy-transfer coupling: Theory and calculation.** *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 044506.
- [347] L.M.Frutos, O.Castaño, J.L.Andrés, M.Merchán, A.U.Acuña. **A theory of nonvertical triplet energy transfer in terms of accurate potential energy surfaces: The transfer reaction from π,π^* triplet donors to 1,3,5,7-cyclooctatetraene.** *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 1208.
- [348] L.M.Frutos, O.Castaño. **A new algorithm for predicting triplet-triplet energy-transfer activated complex coordinate in terms of accurate potential-energy surfaces.** *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 104108.
- [349] R.F.Fink, J.Pfister, A.Schneider, H.Zhao, B.Engels. **Ab initio configuration interaction description of excitation energy transfer between closely packed molecules.** *Chem. Phys.* 343 (2008) 353.
- [350]D.G.Truhlar. **Accuracy of Trajectory Calculations and Transition State Theory for Thermal Rate Constants of Atom Transfer Reactions.** *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 188.
- [351] D.G.Truhlar, B.C.Garrett. **Variational Transition-State Theory.** *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 440.
- [352]A.D.Isaacson, D.G.Truhlar. **Polyatomic canonical variational theory for chemical reaction rates. Separable-mode formalism with application to $\text{OH}+\text{H}_2\rightarrow\text{H}_2\text{O}+\text{H}$.** *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 1380.
- [353]D.G.Truhlar, W.L.Hase, J.T.Hynes. **Current Status of Transition-State Theory.** *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 2664.
- [354] D.G.Truhlar, B.C.Garrett, S.J.Klippenstein. **Current Status of Transition-State Theory.** *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 12771.
- [355] R.A.Marcus, N.Sutin. **Electron transfers in chemistry and biology.** *Biochimica et Biophysica Acta* 811 (1985) 265.
- [356] M.D.Newton. **Quantum Chemical Probes of Electron-Transfer Kinetics: The Nature of Donor-Acceptor Interactions.** *Chem. Rev.* 91 (1991) 767
- [357] R.J.Cave, M.D.Newton. **Calculation of electronic coupling matrix elements for ground and excited state electron transfer reactions: Comparison of the generalized Mulliken-Hush and block diagonalization methods.** *J. Chem. Phys.* 106 (1997) 9213.
- [358] R.Beukers, A.P.M. Eker, P.H.M. Lohman. **50 years of thymine dimer.** *DNA repair* 7 (2008) 530.
- [359] B.Durbeej, L.A.Eriksson. **Reaction mechanism of thymine dimer formation in DNA induced by UV light.** *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 152 (2002) 95.

-
- [360] R.B.Zhang, L.A.Eriksson. **A Triplet Mechanism for the Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA.** *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 7556.
- [361] Daniel Roca-Sanjuán. **Bases moleculares de la Fotorreactividad y Transferencia de Carga en el ADN.** Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. 2009.
- [362] K.Mcateer, Y.Jing, J.Kao, J.-S.Taylor, M.A.Kennedy. **Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-syn thymine cyclobutane dimmer, the major UV photoproduct of DNA.** *J. Mol. Biol.* 282 (1998) 1013.
- [363] L.Blancafort, A.Migani. **Modeling thymine photodimerizations in DNA: Mechanism and correlation diagrams.** *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 14540.
- [364] C.E.Crespo-Hernandez, B.Cohen, B.Kohler. **Base stacking controls excited-state dynamics in A-T DNA.** *Nature* 436 (2005) 1141.
- [365] R.Plessow, A.Brockhinke, W.Eimer, K.Kohse-Hoingaus. **Intrinsic time- and wavelength-resolved fluorescence of oligonucleotides: A systematic investigation using a novel picosecond laser approach.** *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 3695.

ANEJO: ARTÍCULOS

- 1) J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés; M. Merchán: **Propiedades fotofísicas del psoraleno**. *Boletín de la XIX Reunión del Grupo Español de Fotobiología*. Enero 2005.
- 2) J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, and M. Merchán: **A Theoretical Insight into the Photophysics of Psoralen**. *Journal of Chemical Physics*, 124 (2006) 124502.
- 3) J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **Quantum Chemical Study on the Population of the Lowest Triplet State of Psoralen**. *Chemical Physics Letters*, 434 (2007) 107.
- 4) J.J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **On the Intrinsic Population of the Lowest Triplet State of Thymine**. *Journal of Physical Chemistry B*, 111 (2007) 11880.
- 5) J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **Photosensitization and Phototherapy with Furocoumarins: A Quantum-Chemical Study**. *Chemical Physics*, 347 (2008) 422.

- 6) J.J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **The Family of Furocoumarins: Looking For the Best Photosensitizer for Phototherapy.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 199 (2008) 34.

- 7) J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **Photoreactivity of Furocoumarins and DNA for PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 14002.

- 8) J.J. Serrano-Pérez, I. González-Ramírez, P.B. Coto, L. Serrano-Andrés, M. Merchán: **Theoretical Insight into the Intrinsic Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA: Thymine versus Cytosine.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 14096.

- 9) J.J. Serrano-Pérez, G. Olaso-González, M. Merchán and L. Serrano-Andrés: **Singlet Oxygen Generation in PUVA Therapy Studied using Electronic Structure Calculations.** *Chemical Physics*, 360 (2009) 85.



2005 Valencia - Propiedades fotofísicas del psoraleno

Propiedades fotofísicas del psoraleno

Serrano-Pérez, J.J.
Serrano-Andrés, L.
.* Merchán, M.

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València,
Dr. Moliner 50, Burjassot, ES-46100, Valencia.
*E-mail: Luis.Serrano@uv.es

Introducción

La absorción de la radiación electromagnética por una molécula desencadena una sucesión de reacciones fotoquímicas que pueden ser aprovechadas para tratar desde desórdenes cutáneos a diversos tipos de cáncer. El cromóforo, que es el fragmento molecular básicamente responsable de la absorción, puede estar presente en el organismo (fototerapia) o ser administrado externamente (fotoquimioterapia). En este último caso se administra un fármaco, denominado fotosensibilizador, inocuo en la oscuridad pero activo tras la absorción de una radiación típicamente del rango del ultravioleta, visible o infrarrojo cercano. Dentro de esta área destaca la terapia PUVA 1-4, basada en el empleo como fotosensibilizadores de las furocumarinas o psoralenos al ser aplicados en combinación con radiación UV-A (320-400 nm). A pesar de que los mecanismos fototerapéuticos no son del todo conocidos, suelen relacionarse con la capacidad de la molécula para interactuar con el material genético, y se distingue entre procesos de fotosensibilización de Tipo I, II y III, al parecer todos presentes en las furocumarinas⁵. Los dos primeros son mecanismos dependientes de la presencia de oxígeno molecular, correspondiendo con la técnica denominada terapia fotodinámica, PDT^{4,6-8}. El proceso Tipo I implica la formación de radicales intermedios derivados del oxígeno, mientras el de Tipo II se fundamenta en la transferencia de energía desde el primer estado electrónico excitado triplete del psoraleno al oxígeno molecular presente en el medio celular para generar oxígeno muy reactivo en su estado singlete⁹. Tanto los radicales intermedios como el oxígeno singlete podrían reaccionar con diversos componentes de la membrana celular provocando la muerte de la célula por apoptosis. Por otra parte, el mecanismo de Tipo III se basa en la interacción entre el psoraleno y el ADN^{10,11}, en un proceso que se sugiere en tres pasos: (i) la furocumarina se inserta entre bases pirimidínicas adyacentes en el ADN, (ii) la absorción de un fotón induce la formación de monoadductos entre un doble enlace reactivo (C=C) de la base pirimidínica (la más favorable es la timina^{12,13}) y los dobles enlaces reactivos de la furocumarina, pudiéndose formar dos tipos de monoadductos al existir dos dobles enlaces reactivos, uno en el anillo de furano (C4'=C5') y otro en el de pirano (C3=C4) [ver Figura 1], y (iii) el monoadducto, merced a la absorción de un fotón, puede inducir a su otro doble enlace reactivo a interactuar con una timina de la cadena opuesta de ADN, provocando la formación de un diadducto que entrecruza las dos cadenas^{1,3,14}

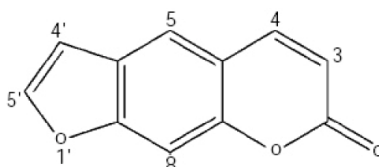




Figura 1. Molécula de psoraleno.

Se desconoce sin embargo la razón por la cual la terapia PUVA es un tratamiento efectivo frente a un rango muy diverso de enfermedades, muchas de ellas de origen idiopático. La comprensión de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de las furocumarinas en general y del psoraleno en particular como compuesto base es un paso crucial para racionalizar el mecanismo fototerapéutico. Centrándonos en el psoraleno, dos bandas de absorción están presentes en la región de baja energía del espectro: una banda de baja intensidad en la región de 360-270 nm (3.44-4.77 eV) y que presenta una clara estructura vibracional y una banda intensa y definida a 240 nm (5.16 eV) en agua y en etanol^{15,16}. Las emisiones de fluorescencia y fosforescencia han sido detectadas a 409 nm (3.03 eV) y 456 nm (2.72 eV, origen de banda), respectivamente, en etanol a 77 K. La razón entre los rendimientos cuánticos de fosforescencia/ fluorescencia es 7.1. Considerando que la absorción directa de energía se realiza a través de estados con la misma multiplicidad de espín que el fundamental, singletes en este caso, y que la emisión radiativa principal debiera ser la emisión fluorescente, la preeminencia de la fosforescencia indica que existe un eficiente proceso de desactivación de la energía hacia un estado de naturaleza triplete, lo que en fotoquímica se denomina cruce entre sistemas (ISC)¹⁷. Este hecho experimental apoya la hipótesis de que la fotoreactividad de las furocumarinas en los distintos mecanismos se desarrolla a través del primer estado electrónico excitado triplete¹. Por tanto, cabe esperar que un aumento en el rendimiento cuántico de formación del estado excitado triplete conduzca a un incremento de la acción fototerapéutica.

Es la estructura electrónica de la molécula de psoraleno lo que le confiere sus propiedades fototerapéuticas. La Química Cuántica¹⁸ emplea las ecuaciones de la mecánica cuántica para elucidar y predecir las propiedades físico-químicas de las moléculas. Nuestro grupo de investigación ha iniciado un proyecto para estudiar, empleando métodos teóricos químico-cuánticos, la fotofísica y la fotoquímica del psoraleno y compuestos relacionados para determinar y explicar las características de los estados excitados electrónicos de estas moléculas, responsables de la actividad fototerapéutica, y proponer de esta forma mejores fotosensibilizadores. Aspectos esenciales a analizar son las energías que activan los procesos, en busca de cromóforos que absorban a mayores y más penetrantes longitudes de onda (porque así la radiación incidente es dispersada en menor grado por los órganos y tejidos y podemos tratar zonas más internas del organismo), los perfiles energéticos y la interacción entre estados singlete y triplete responsables de los diversos mecanismos en los distintos fotosensibilizadores, el tiempo de vida media de los estados implicados y que se relaciona con la pervivencia de la fotoactividad, o las reacciones de adición a los monómeros de las bases del ADN, en busca de compuestos que no formen diaductos y se eviten así efectos carcinogénicos secundarios⁴. Algunas de estas claves son analizadas en la presente contribución para la molécula de psoraleno.

Resultados y discusión

Espectros de absorción y emisión en el psoraleno. Generación de estados triplete.

El espectro de absorción de una sustancia presenta una superposición de bandas correspondientes a los distintos estados electrónicos excitados del sistema. En cada uno de ellos el rango de energías absorbidas oscila entre la obtenida como diferencia entre el estado fundamental relajado de la molécula y el estado excitado a la misma geometría (transición vertical) y la diferencia entre el primero y el estado excitado relajado (transición adiabática u origen de banda). Además de la energía, interesa la probabilidad de transición, medida aquí como intensidad de la banda. Estados con la misma multiplicidad de espín que el fundamental tienen una mayor probabilidad para absorber fotones. En espectroscopia la magnitud que mide dicha probabilidad es la fuerza de oscilador de la transición (f)¹⁸. Nuestros cálculos han identificado en la región menos energética del espectro dos estados electrónicos single-te excitados, cuyos rangos de energías de excitación calculados son: $S1 \pi\pi^*$ (3.97-3.75 eV, 312-



331 nm) y S_2 $n\pi^*$ (4.86-3.75 eV, 255-331 nm). La intensidad de las transiciones asociadas es tres órdenes de magnitud mayor para el estado S_1 $\pi\pi^*$ ($f=0.03$), el cual se convierte de esta forma en el protagonista de la absorción UVA e iniciador del proceso fototerapéutico. Ambos estados se relacionan con la banda de absorción a baja energía observada en el espectro del psoraleno en diferentes disolventes¹⁶. El resto de estados electrónicos se sitúan a mayores energías, y sólo serán activados si la longitud de onda de absorción disminuye. Probablemente la eficiencia del proceso fototerapéutico aumentaría si la absorción se restringiese al rango de energías correspondiente al estado S_1 .

A menores energías que los estados electrónicos singlete se halla un cierto número de estados de multiplicidad triplete. Las transiciones energéticas hacia dichos estados están sin embargo prohibidas por el cambio en la multiplicidad de espín, y por lo tanto la absorción directa de energía desde el estado fundamental es irrelevante. Así pues, y tras la absorción energética básica hacia el estado S_1 , la energía se distribuye entre los grados de libertad de la molécula, relajándose ésta hacia su estructura geométrica más estable. Alcanzada esa estructura de mínima energía en el estado excitado se produce un lento proceso radiativo de fluorescencia desde S_1 , cuyo origen de banda calculado es 3.75 eV (331 nm), en consonancia con el dato experimental en disolventes polares, 3.54 eV (350 nm)^{17,19}. En el camino de relajación el estado S_1 ha podido sin embargo cruzarse con otros estados, triplete en este caso, a los cuales ha podido transferir su energía mediante un proceso no adiabático, un cruce entre sistemas (ISC). De esa forma es posible poblar energéticamente el estado triplete menos energético (T_1) desde el cual, una vez alcanzado su propio mínimo relajado, emitir (fosforescencia). Nuestros cálculos revelan un origen de banda de fosforescencia a 2.76 eV (449 nm), en perfecto acuerdo con el dato experimental. La predominancia de la fosforescencia en el psoraleno indica que existe un ISC muy favorable²⁰. Nuestro objetivo próximo²¹ es la determinación del mecanismo preciso de transferencia de energía entre el S_1 y los estados triplete a través del ISC, que depende esencialmente de la diferencia de energía entre los estados (el cruce entre sus hipersuperficies de energía potencial) y la magnitud de su acoplamiento espín-órbita¹⁸. Dado que los estados S_1 y T_1 están muy separados en energía, no es posible un mecanismo de ISC efectivo entre ambos. Si es posible, en cambio, entre los estados S_1 ($\pi\pi^*$) y T_5 ($n\pi^*$), tan sólo a

0.19 eV, y con un valor de acoplamiento espín-órbita mayor. Desde T_5 se estudiará cómo, mediante sucesivos procesos de conversión interna (IC) a través de intersecciones cónicas entre las distintas hipersuperficies de los estados triplete¹⁸, llega la energía hasta T_1 , estado protagonista en la acción foto-terapéutica. La comparación entre las energías y los acoplamientos en los distintos derivados del psoraleno nos dará una indicación clara de la adecuación del mecanismo y nos proporcionará una herramienta para predecir fotosensibilizadores más eficientes.

Mecanismos de cicloadición al ADN

Como se entrevé en el apartado anterior, muchos de los procesos foto-físicos y fotoquímicos se producen en los estados electrónicos de las moléculas en sus estructuras de mínima energía. La química cuántica permite optimizar las geometrías moleculares hallando dichos mínimos, y obtener de dichas estructuras informaciones valiosas. Hemos optimizado las geometrías de distintos estados electrónicos del psoraleno: el estado electrónico fundamental (S_0) y los estados excitados singlete S_1 ($\pi\pi^*$) y S_2 ($n\pi^*$), y triplete T_1 ($\pi\pi^*$) y T_5 ($n\pi^*$). De los resultados obtenidos se deduce que los procesos fotoquímicos más relevantes tienen lugar mientras las moléculas mantienen su conformación plana. Los parámetros geométricos, distancias y ángulos de enlace y ángulos diedros, en los correspondientes mínimos de los estados no cambian esencialmente al excitar el estado fundamental S_0 al S_1 , sin embargo sí se aprecia cómo el doble enlace C3=C4 (correspondiente al anillo de pirano) se alarga 0.13 Å en el estado T_1 , lo que indica que la molécula se hace reactiva en dicho enlace. Puede colegirse por tanto que al poblar el estado T_1 , cuyo largo tiempo de vida media radiativa calculado es 108 s, se está favoreciendo la formación de monoadductos a través de la



interacción de dicho enlace con el correspondiente enlace C=C de la base pirimidínica (timina) del ADN, clave de la acción fototerapéutica de las furocumarinas en los mecanismos de Tipo III. No sucede lo mismo con el enlace C4=C5' del anillo del furano, supuesto precursor de monoadductos por el lado del furano, pero cuya longitud de enlace en el estado T1 se calculó muy similar a la del estado S0.

Estos resultados indican que la absorción del fotón por el psoraleno y su mecanismo de cicloadición con las bases pirimidínicas del ADN a través del estado triplete parece circunscribirse a la formación de monoadductos por el lado de la pirona. Para comprobar este aspecto realizamos optimizaciones de geometría para los estados S0 y T1 de los monoadductos, tanto el relativo a la pirona como al del furano [ver Figura 2]. Ninguno de los monoadductos muestra un alargamiento del doble enlace por el lado del furano en dichos estados, al igual que sucedía en el estado S1 del psoraleno. Hay sin embargo constancia experimental tanto de la formación de monoadductos por el furano como de diadductos. Apuntamos la posibilidad de que el mecanismo de cicloadición por el furano se produzca a través del estado T1 de la base pirimidínica, en el cual tiene lugar un claro alargamiento del enlace C=C correspondiente. Eso implicaría que el sistema poblado en ese caso sería dicha base, lo que tiene lugar a energías de absorción superiores (timina: 4.9 eV, 253 nm)²² que en el psoraleno (4.0 eV, 310 nm). Una posibilidad a analizar es por lo tanto que restringiendo el rango de energías de absorción a aquellas del estado S1 del psoraleno se disminuya la formación de monoadductos por el furano y, sobre todo, de diadductos, considerados responsables de los efectos carcinogénicos de la terapia.⁴

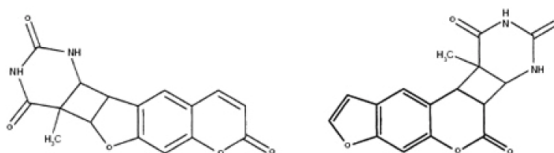


Figura 2. Monoadductos psoraleno-timina por el furano (derecha) y por la pirona (izquierda)

Resumen

Presentamos un conjunto de resultados obtenidos sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de la molécula de psoraleno, sistema base de numerosos fotofármacos, empleando los métodos teóricos de la química cuántica. El estado responsable de la absorción de la radiación iniciadora del fotoproceso se identifica como el estado electrónico singlete S1 $\pi\pi^*$ menos energético (3.97-3.75 eV, 312-331 nm). A partir de dicha absorción la energía se distribuye por un lado hacia el mínimo energético del estado S1 desde el cual se produce la fluorescencia, pero, esencialmente, a los estados tripletes de menor energía a través de un proceso no adiabático de cruce entre sistemas, en particular entre el estado S1 $\pi\pi^*$ y el T5 $\pi\pi^*$ seguido de varios procesos de conversión interna (IC) hacia el estado triplete de menor energía (T1). En el mínimo de dicho estado, el principal mecanismo de desactivación de la energía es un lento proceso radiativo, por lo cual el estado T1, con una vida media larga, es el mejor candidato para ser el protagonista de la fotorreactividad del psoraleno. La intensa fosforescencia observada en el sistema prueba la formación del estado T1. Los cálculos químico-cuánticos indican que desde dicho estado la formación de monoadductos por el lado de la pirona con las bases pirimidínicas del ADN parece favorable, mientras que los subsiguientes



diaductos y los monoadductos por el furano parecen ser desfavorables en dicho estado, por lo que probablemente requerirían la formación del estado triplete en las bases.

Aspectos metodológicos

Los métodos químico-cuánticos^{18,23-25} buscan, mediante procedimientos numéricos computacionales, soluciones aproximadas de la ecuación de Schrödinger, $H\Psi = E\Psi$, siendo H el operador Hamiltoniano, que es el operador asociado a la energía total del sistema molecular. Es una ecuación de valores propios (las funciones de onda Ψ son las funciones propias y las energías E son los valores propios del operador). En la presente contribución se emplean funciones de onda multiconfiguracionales CAS/SCF, mientras el método perturbativo CASPT2 ha sido utilizado para incluir la correlación electrónica dinámica del sistema y así poder estudiar cuantitativamente diversos estados electrónicos, fundamental y excitados de la molécula. El protocolo CASPT2//CAS/SCF/ANO-L 4s3p 1d/2s1p²⁴ es muy adecuado para el tratamiento de estados excitados, y permite estimar cuantitativamente las propiedades electrónicas de las moléculas^{18,25}. Las optimizaciones de geometría se llevaron a cabo con el procedimiento RASSCF en el psoraleno, mientras que se empleó el método DFT/B3LYP/6-31G* para las optimizaciones en los monoadductos²⁴. El tiempo de vida radiativo fue obtenido a partir de las relaciones de Strickler-Berg y los datos químico-cuánticos²⁵.

Bibliografía

- 1.- Averbeck, D. Photochem. Photobiol., 1989, 50, 859. 2.- Scott, BR.; Pathak, MA.; Mohn, GR. Mut. Res., 1976, 39, 29. 3.- Song, PS.; Tapley Jr., KJ. Photochem. Photobiol., 1979, 29, 177.
- 4.- Bonnett, R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. Gordon & Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.
- 5.- Dall'Acqua, F.; Martelli, P. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1991, 8, 235. 6.- Rouhi, AM. Chem. Eng. News., 1998, 76, 22. 7.- Joshi, PC.; Pathak, MA. Biochem. Biophys. Acta, 1983, 112, 638. 8.- Konan, YN.; Gurny, EAR, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 2001, 66, 89. 9.- Wang, S.; Gao, R.; Zhou, F.; Selke, M. J. Mat. Chem., 2004, 14, 487.
- 10.- Llano, J; Raber, J; Eriksson, LA. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2003, 154, 235.
- 11.- Cadet, J.; Vigny, P. in Bioorganic Photochemistry., Morrison, H.; Ed., volumen 1, New Jersey, 1990. John Wiley & Sons.
- 12.- Aida, M; Kaneko, M; Dupuis, M. in Computational Molecular Biology, Leszczynski, J., Ed., volumen 8, Elsevier, Amsterdam (1999).
- 13.- Durbeej, B.; Eriksson, LA. Photochem. Photobiol., 2003, 78, 159.
- 14.- Musajo, L.; Rodighiero, G. in Photobiology, Giese, AG., Ed., volumen 7, New York, 1972. Academic Press.
- 15.- Song, PS.; Shim, SC., Mantulin, WW. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1981, 54, 315.
- 16.- Collet, M.; Hoebcke, M.; Piette, J.; Jakobs, A.; Lindqvist, L.; de Vorst, AV. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 1996, 35, 221.



- 17.- Mantulin, WW.; Song, P.S. J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 5122.
- 18.- Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.: "Vida y Luz. Una Perspectiva Químico-Cuántica". Anales de Química, 2004, 100, 16.
- 19.- Yeagers, E.; Augenstein, MS. J. Inv. Dermatol., 1965, 44, 181.
- 20.- Tatchen, J.; Kleinschmidt, M.; Marian, CM. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 2004, 167, 201.
- 21.- Serrano-Pérez, JJ.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. A Theoretical Insight into the Photophysics of Psoralen. En preparación.
- 22.- Lorentzon, J.; Fülischer, MP.; Roos, BO. J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 9265.
- 23.- Andrés, J.; Bertrán, J. Eds. "Química Teórica y Computacional". Universitat Jaume I, 2000.
- 24.- Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.. "Ab Initio Methods for Excited States". En: Computational Photochemistry, Ed. Olivucci, M., Elsevier, Amsterdam (2005).

A theoretical insight into the photophysics of psoralen

Juan José Serrano-Pérez, Luis Serrano-Andrés,^{a)} and Manuela Merchán
*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Doctor Moliner 50, Burjassot,
ES-46100 Valencia, Spain*

(Received 21 November 2005; accepted 27 January 2006)

Psoralen photophysics has been studied on quantum chemistry grounds using the multiconfigurational second-order perturbation method CASPT2. Absorption and emission spectra of the system have been rationalized by computing the energies and properties of the low-lying singlet and triplet excited states. The $S_1 \pi\pi^*$ state has been determined to be responsible of the lowest absorption and fluorescence bands and to initially carry the population in the photophysical processes related to the phototherapeutic properties of psoralen derivatives. The low-lying $T_1 \pi\pi^*$ state is, on the other hand, protagonist of the phosphorescence, and its prevalent role in the reactivity of psoralen is suggested to be related to the elongation of the pyrone ring C_3-C_4 bond, where the spin density is distributed on both carbon atoms. Analysis of energy gaps and spin-orbit coupling elements indicates that the efficient photophysical process leading to the population of the lowest triplet state does not take place at the Franck-Condon region but along the S_1 relaxation path.
© 2006 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2178794]

I. INTRODUCTION

Absorption of electromagnetic radiation by a chromophore triggers a chain of photochemical reactions which may be beneficially employed to treat some skin disorders and other diseases. Sometimes the chromophore is already present in the tissue and the phototherapy takes place naturally, e.g., the cure of neonatal hyperbilirubinemia or the photoregeneration of vitamin D.¹ However, in the treatment named photochemotherapy, a drug is administered to act as a photosensitizer, a substance which is harmless in the dark but active upon absorption of radiation, typically ultraviolet, visible, or near infrared light.¹ Two basic photochemical mechanisms are responsible for the phototherapeutic activity. The photosensitizer can directly react with DNA bases forming stable adducts which interfere the genetic activity.¹⁻⁵ On the other hand, the photosensitizer can transfer its excess energy to molecular oxygen available in the cellular environment, generating highly reactive singlet oxygen able to damage target tissues. This type of protocol is known as photodynamic therapy (PDT).^{1,6,7}

A generally accepted classification of the photochemical reactions comprises three types of mechanisms. Types I and II correspond to oxygen-dependent pathways for PDT activity, taking place when light, in the presence of a photosensitizer and molecular oxygen, induces a chemical reaction in a substrate.^{1,8,9} In type I reactions, the photoactive compound in its triplet state promotes an electron transfer reaction to molecular oxygen, leading to the formation of O_2 , OH, or HO_2 radicals. Type II reactions correspond to energy transfers from the triplet state of the photosensitizer to dioxygen, generating the reactive $^1\Delta_g$ excited state.¹⁰ All these intermediate species later interact with components of the cell membrane leading to cellular damage that eventually

contributes to skin photosensitization, mutation, error-prone DNA repair, and carcinogenesis.^{1,8,11,12} In contrast to the previous mechanisms, oxygen-independent type III reactions lead to direct photobinding between the photosensitizer and the DNA base monomers.¹³⁻¹⁵

Furocoumarins (also named psoralens) are a class of heterocyclic compounds with a known phototherapeutic activity involving the three described mechanisms.¹⁶ These systems have been found to possess mutagenic properties when applied in conjunction with near UV-A light (320–400 nm) exposure.^{17,18} A specific treatment coined psoralen+UV-A (PUVA) therapy has been designed to treat different skin disorders such as psoriasis and vitiligo.^{1,19,20} It is commonly assumed that the mechanism of PUVA therapy involves a [2+2]-photocycloaddition of psoralen in its lowest triplet state and a pyrimidine DNA base monomer that requires the transfer of hydrogen atoms or electrons without direct involvement of molecular oxygen. The photoreactive process seems to take place in three phases. The first step occurs in the dark: The furocoumarin is inserted between adjacent pyrimidine base pairs in the DNA duplex. In a second step, the absorption of one photon by psoralen induces the formation of monoadducts with the neighboring pyrimidine via interaction of the respective carbon-carbon double bonds that both compounds have. Two types of monoadducts, pyrone and furan types, can then be formed by interaction of the C–C double bond of the pyrimidine base with the C_3-C_4 double bond of the pyrone ring and the $C'_4-C'_5$ double bond of the furan ring in psoralens, respectively (see Fig. 1). In that regard, thymine has been established as the most favorable base to photoreact with furocoumarins, in accordance with its predominance in the formation of cyclobutane dimers ($T < > T$) in UV-irradiated DNA.^{21,22} In a third step, the monoadduct may absorb another photon, inducing its other

^{a)}Electronic mail: luis.serrano@uv.es

1-2 Serrano-Pérez, Serrano-Andrés, and Merchán

J. Chem. Phys. 124, 1 (2006)

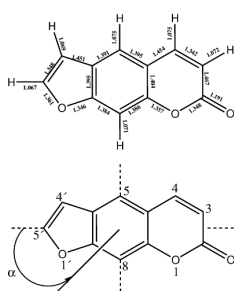


FIG. 1. Psoralen molecule atom labeling (bottom) and ground state optimized bond lengths in angstroms (top). The arrow defines the positive angles of both the dipole moment and electronic transition moment directions with respect to the pseudosymmetry long axis.

photoreactive C–C double bond to interact with a thymine on the opposite strand of DNA. Therefore, a diadduct that cross-links the DNA helix is formed.

The poly[dA-dT]·poly[dA-dT] sequence region seems to be the most favorable site for the photocycloaddition reactions of furocoumarins.²³ Several studies have suggested that, whereas the furan monoadduct forms a diadduct, the pyrone monoadduct does not.^{3,5,24} Formation of cross-links was thought to be extremely relevant for the therapeutic effectiveness, although it is also known that the diadduct causes adverse side effects such as carcinogenesis, mutagenesis, and immunosuppression difficult to repair.^{3,8} Only furocoumarins with bifunctional groups such as psoralen can form diadducts and may produce undesired lethal and mutagenic consequences. Certain monofunctional furocoumarins have been proved to yield as efficient phototherapy as bifunctional furocoumarins, suggesting that the induction of lesions in DNA cannot be considered as the only mechanism responsible for the phototherapeutic effects⁵ and most probably a PDT process also takes place. The detailed characterization of the mechanisms is still under intense research.

Understanding the photophysical properties of furocoumarins represents a crucial step in order to rationalize the corresponding phototherapeutic mechanisms. The low-lying region of the absorption spectrum of psoralen, the reference compound, has two main bands: A weak and structured band is observed ranging from 360 to 270 nm (3.44–4.77 eV) and a sharp feature appears at 240 nm (5.16 eV) in aqueous solution and ethanol.^{25,26} Both fluorescence and phosphorescence emissions have been detected for psoralen in ethanol (77 K) at 409 nm (3.03 eV) and 456 nm (2.72 eV, T_0), respectively. The phosphorescence/fluorescence quantum yield ratio, 7.1, indicates the effectiveness of an intersystem crossing (ISC) mechanism.²⁷ It has been proposed that photoreactivity of furocoumarins proceeds through the triplet state in all types of photosensitization, that is, PDT and PUVA therapies.⁵ It can be therefore expected that increasing of the triplet formation quantum yield leads to an enhancement of the phototherapeutic action.

From the photochemical standpoint, an effective photosensitizer should possess, in principle, certain desirable key features: it must be harmless in the dark; in order to treat deep tissues, it should be activated by long wavelength light, because the longer wavelength radiation the photosensitizer absorbs, the deeper the energy penetrates in the body; its triplet state must be efficiently populated from the excited singlet state and effective in transferring the energy to molecular oxygen in the PDT mechanism; and finally, it should form monoadducts and perhaps not diadducts with DNA to avoid mutagenic side effects. Additionally, a good photosensitizer should be amphiphilic to favor the injected administration of the drug, easily synthesized or isolated from natural sources, be deactivated soon after the treatment, and quickly eliminated from the body.¹

We are currently undertaken a project to study, using quantum-chemical methods, the photophysics and photochemistry of furocoumarins and related compounds in order to rationalize the basic features responsible of their phototherapeutic properties. In the present paper we start by considering the photophysical properties of parent psoralen (7-H-furo[3,2-g][1]-benzopyran-2-one, see Fig. 1). The low-lying excited states of the molecule have been computed within the framework of multiconfigurational second-order perturbation theory, in particular, with the CASPT2 method. Absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra have been characterized, together with other spectroscopic parameters required to understand the photophysics of the compound: related oscillator strengths, dipole moments, emission radiative lifetimes, and spin-orbit couplings. Knowledge on theoretical grounds about these properties in psoralen shall hopefully guide future research on the photochemical mechanisms of phototherapeutic activity of furocoumarins and derivatives. In the light of the present results, previous experimental^{23,25–28} and theoretical^{13,29–32} findings shall also be considered.

II. COMPUTATIONAL DETAILS

Using the CASSCF multiconfigurational wave functions as reference, the second-order perturbation theory through the CASPT2 method was employed to include dynamic correlation energy in the calculation of the electronic excited states. The CASPT2 method calculates the first-order wave function and the energy up to second order and has repeatedly proved its accuracy.^{33–37} The imaginary level-shift technique was employed in order to prevent the effect of intruder states. A shift parameter of 0.3 a.u. was selected by checking the stability in the excitation energies.^{38,39} The molecular symmetry was constrained to the C_s point group. For geometry optimizations, however, relaxing the symmetry constraints had no effect on the final structure, which preferred in all cases to maintain planarity. An atomic natural orbital (ANO-L)-type basis set contracted to C, O[4s3p1d]/H[2s1p] (Refs. 40 and 41) was used throughout except in the calculation of the lowest-lying Rydberg state, for which the basis set was enlarged with an additional s diffuse function placed in the charge centroid of the cation and built as re-

ported elsewhere.^{35,42} The carbon and oxygen 1s core electrons were kept frozen in the second-order perturbation step.

Geometries were obtained by computing analytical gradients at the RASSCF level of calculation for the ground and the lowest singlet and triplet excited states. In the optimization of the A' states an active space of 14 active orbitals and 16 electrons has been employed and up to quadruple excitations were considered (eight orbitals in RAS1 space and six orbitals in RAS3 space). Within the irreducible representations (a' , a'') of the C_2 group this active space can be labeled as (0,14). An additional oxygen lone-pair orbital was included in the active space (1,14) in order to optimize the lowest A'' excited states. In all the remaining calculations, CASSCF wave functions were generated as state-average (SA) CASSCF roots of a given symmetry. Based on preliminary RASSCF calculations, the CASSCF active space was reduced to include 12 active electrons and 12 active orbitals (RAS2 0,12) for A' roots and 14 active electrons and 13 active orbitals (RAS2 1,12) for A'' roots. The number of selected SA-CASSCF roots were 11, 4, 7, and 3 for ${}^1A'$, ${}^1A''$, ${}^3A'$, and ${}^3A''$ symmetries, respectively. The CAS state interaction method⁴³ (CASSI) was used to compute transition properties, including the spin-orbit coupling (SOC) elements between selected states as described elsewhere.⁴⁴ All calculations in the present paper were performed with the MOLCAS 6.0 quantum chemistry software.^{45,46}

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Absorption spectrum

Our final goal is to understand the photophysical properties of psoralen in order to relate the obtained information to its biological activity. We first start by studying the singlet-singlet and singlet-triplet spectra of the molecule. Several singlet excited states have been computed vertically at the S_0 ($1^1A'$) ground state optimized RASSCF structure. The results are compiled in Table I. Hereafter only CASPT2 results will be discussed. The lowest singlet excited state, $2^1A'(\pi\pi^*)$, lies vertically at 3.98 eV with a related oscillator strength of 0.027. Next, the $1^1A''(n\pi^*)$ state is found at 5.01 eV corresponding to a transition predicted with negligible intensity. A third transition to the $3^1A'$ state has been computed at 5.03 eV with an oscillator strength of 0.107. Unlike the other $\pi\pi^*$ states, the $3^1A'$ state has a high dipole moment, 8.72 D, differing by more than 2.5 D from that of the ground state, an indication of its sensitivity to polar environments, in which the related transition is expected to undergo a redshift. The recorded absorption spectra in different solvents, from cyclohexane⁴⁷ to water,²⁶ displays a weak and structured band ranging from 360 to 270 nm (3.44–4.77 eV). Depending on the band resolution and the environment, one or two maxima near 330 and 280 nm (3.76 and 4.43 eV, respectively) have been described. The present computed results suggest that this set of features can be better assigned just to the $2^1A'(\pi\pi^*)$ transition, with the weak $n\pi^*$ band lying beneath. In that case, the observed band profile should be attributed to vibrational structure. This is not unlikely, considering that a noticeable rearrangement of the bond distances of the molecule occurs at the $2^1A'$ minimum.

TABLE I. Computed excitation energies ΔE (eV), oscillator strengths f , dipole moments μ (D), and dipole moment, μ_{dir} (deg), and transition dipole moment, TDM_{dir} (deg), directions for the low-lying electronic transitions of psoralen.

State	ΔE_{CASSCF}	ΔE_{CASPT2}	f	μ	μ_{dir}	TDM_{dir}
$1^1A'$	6.25	128	...
$2^1A'(\pi\pi^*)$	4.52	3.98	0.027	6.50	132	4
$1^1A''(n\pi^*)$	4.22	5.01	0.000	2.07	130	...
$3^1A'(\pi\pi^*)$	6.33	5.03	0.107	8.72	132	5
$4^1A'(\pi\pi^*)$	6.68	5.22	0.064	7.07	-23	-10
$5^1A'(\pi\pi^*)$	6.73	5.30	0.331	7.07	-37	102
$6^1A'(\pi\pi^*)$	6.95	5.70	0.091	7.37	-37	30
$7^1A'(\pi\pi^*)$	7.21	5.81	0.321	6.58	-34	127
$8^1A'(\pi\pi^*)$	7.30	6.17	0.287	6.56	-42	4
$9^1A'(\pi\pi^*)$	7.57	6.24	0.168	4.25	-35	-7
$10^1A'(\pi\pi^*)$	7.72	6.28	0.012	6.29	-40	-7
$2^1A''(n\pi^*)$	6.39	6.32	0.000	0.11	43	...
$1^3A'(\pi\pi^*)$	2.57	3.27	...	5.40	124	...
$2^3A'(\pi\pi^*)$	3.13	3.55	...	5.35	125	...
$3^3A'(\pi\pi^*)$	3.82	4.08	...	5.48	127	...
$4^3A'(\pi\pi^*)$	4.18	4.66	...	5.97	129	...
$5^3A'(\pi\pi^*)$	4.43	4.67	...	5.41	124	...
$6^3A'(\pi\pi^*)$	5.68	4.84	...	6.78	-31	...
$1^3A''(n\pi^*)$	4.07	4.85	...	2.15	111	...

Furthermore, the structure of the band disappears in different media and also in all psoralen derivatives, even in selenopyrane and thiopyrane psoralen derivatives.²⁶ Calculations at the time-dependent density-functional theory^{13,48} (TD-DFT) and DFT/multireference configuration interaction³² (MRCI) levels of theory suggest, however, that two $\pi\pi^*$ -type transitions computed near 3.8 and 4.4 eV are really responsible of the low-energy band. A definitive assignment would require a full analysis of the vibrational structure of the band and comparison with spectra in the vapor or in molecular beams.

Above 5.0 eV several singlet-singlet transitions have also been computed. Transitions to the $4^1A'$ (5.22 eV) and $5^1A'$ (5.30 eV) ($\pi\pi^*$) excited states have oscillator strengths of 0.064 and 0.331, respectively. The recorded spectra show a single and sharp band peaking near 248 nm (5.00 eV) in cyclohexane⁴⁷ and 240 nm (5.16 eV) in ethanol and water.^{25,26} In principle, the observed feature can be assigned to transition to the $3^1A'$ state at 5.03 eV. Moreover, taking into account our computed results, an additional band with higher intensity can be expected at higher energies (5.30 eV). The measured band is probably a combination of both transitions. Between 5.7 and 6.2 eV four medium to intense transitions to ${}^1A'$ $\pi\pi^*$ excited states are predicted. Above this energy only weak transitions of valence $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ character have been obtained up to 8.0 eV. The beginning of the Rydberg series has been determined at 6.32 eV, as the $2^1A''$ [highest occupied molecular orbital (HOMO) $\rightarrow 3s$] state. Two intense bands peaking at 210 nm (5.90 eV) and 200 nm (6.20 eV) have been reported for psoralen in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol.⁴⁷ They clearly correspond to the transitions to our computed $7^1A'$ and $8^1A'$ $\pi\pi^*$ states, representing the most intense bands in that energy region of the spectrum. Song *et al.*²⁵ reported that the two lowest-energy absorption bands in psoralen, angelicin, and

1-4 Serrano-Pérez, Serrano-Andrés, and Merchán

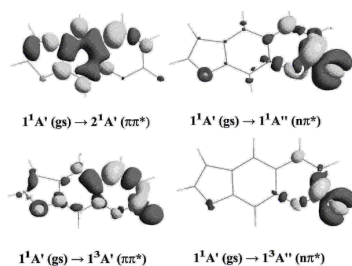


FIG. 2. Differential electron density for the main valence transitions in psoralen computed at the ground state optimized geometry. The electron density is shifted upon light-induced excitation from darker to lighter regions.

methylpsoralens are polarized along the long axis and nearly parallel, with angles differing less than 20° . Transition dipole moment (TDM) directions indicate that the three lowest $\pi\pi^*$ features have nearly parallel polarizations, that is, they are aligned with the long axis of the molecule, while transition to the $5^1A'$ state has essentially perpendicular polarization.

Regarding the vertical excitations to the triplet states, the $1^3A'$ ($\pi\pi^*$ (T_1)) state lies at 3.27 eV, near 0.7 eV below the $2^1A'$ (S_1) state. Three other $^3A'$ $\pi\pi^*$ states are next in energy at 3.55, 4.08, and 4.66 eV. The lowest triplet state of $n\pi^*$ character, $^3A''$, has been located vertically at 4.85 eV, slightly below with respect to its corresponding singlet state. TD-DFT (Ref. 13) and DFT/MRCI (Ref. 32) results obtained similar results for the location of the triplet states, although, as it is typical for DFT-based methods,⁴⁹ singlet-triplet transitions are underestimated (0.2–0.3 eV).

The nature of the low-lying transitions of each symmetry, which are those basically responsible for the photophysical properties of psoralen, can be graphically described by computing the differential electron density plots as displayed in Fig. 2. Transition to the S_1 $\pi\pi^*$ state is mainly benzene-like, with the charge migration concentrated in the central benzenoid ring. On the contrary, that related to the T_1 $\pi\pi^*$ state has its major contributions in the pyrone ring, with high participation of the carbonyl oxygen and a shift in the density away from the pyrone ring C_3 – C_4 bond, which will be later discussed as an essential feature of the photophysics of the system. Also in Fig. 2, we find the expected differential density plots of the $n\pi^*$ states focused on the carbonyl group.

B. Emission spectra

Fluorescence has been reported for psoralen in polar solvents starting (T_0) at 350 nm (3.54 eV) with a maximum at 409 nm (3.03 eV).^{27,28} Phosphorescence has also been recorded in solution with band origin at 456 nm (2.72 eV) and a maximum between 460 and 490 nm (2.7–2.5 eV). Psoralens are characterized by a weak fluorescence emission and strong phosphorescence bands. In particular, in psoralen, the fluorescence quantum yield was measured in ethanol, $\Phi_F = 0.019$ (Refs. 27) and 0.02,²⁸ while the phosphorescence

J. Chem. Phys. 124, 1 (2006)

TABLE II. Computed and experimental energy differences (eV) and emission radiative lifetimes (τ_{rad}) relevant for the photophysics of psoralen. E_{VA} : vertical absorption, T_e : adiabatic electronic band origin, E_{VE} : vertical emission, Abs_{max} : experimental absorption maximum, T_0 : experimental band origin, and E_{max} : emission maximum.

State	Theoretical (CASPT2)				Experimental ^a			
	E_{VA}	T_e	E_{VE}	τ_{rad}	Abs_{max}	T_0	E_{max}	τ_{rad}
$2^1A'(\pi\pi^*)$	3.98	3.59	3.45	74 ns	3.7–4.3	3.54	3.03	...
$1^1A'(n\pi^*)$	5.01	3.91	2.78	3 μs
$1^3A'(\pi\pi^*)$	3.27	2.76	2.29	28 s	...	2.7	2.7	5–8 s
$1^3A''(n\pi^*)$	4.85	3.84	2.79	9 ms

^aData in ethanol (Refs. 25–28 and 55). See also other solvents (Ref. 47).

quantum yield was reported to be $\Phi_P = 0.13$.²⁷ The obtained ratio Φ_P/Φ_F is approximately 7.1. The total phosphorescence decay time (τ_P) has been established in glycerol-water as 1.1 s (Ref. 28) and in ethanol as 0.66 s.²⁷ The phosphorescence radiative lifetime can be therefore obtained as $\tau_{\text{rad}} (= \tau_P \Phi_P)$ from 8 to 5 s.

Our computed results on Table II allow the rationalization of part of the experimental data. The low-lying singlet excited $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) state is responsible for the lowest-energy absorption and emission fluorescence bands. Vertically, at the ground state geometry, the transition energy is computed to be 3.98 eV and, upon relaxation of the geometry, the band origin (T_e) obtained as the energy difference between the ground and the excited state minima decreases to 3.59 eV. A similar relaxation is observed experimentally between the lowest-energy reported absorption band maximum and the band origin. The computed changes in the optimal geometries between the ground (S_0) and the $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) (S_1) states affect the bond alternation of the system, mainly in the central ring (cf. Figs. 1 and 3), as expected from the discussion on the differential charge density plots of Fig. 2. By using the Strickler-Berg relationship,^{36,50,51} a fluorescence radiative lifetime of 74 ns is calculated for the S_1 state. The low-lying

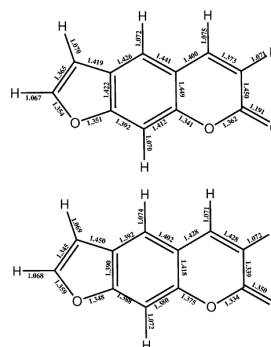


FIG. 3. Psoralen molecule optimized bond lengths (Å) in different electronic singlet states. Top: $2^1A'$ (S_1 , $\pi\pi^*$); bottom: $1^1A'$ (S_2 , $n\pi^*$).

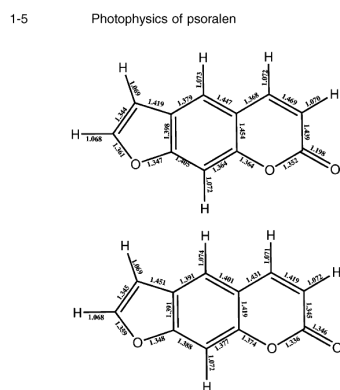


FIG. 4. Psoralen molecule optimized bond lengths (Å) in different electronic triplet states. Top: $1^3A'(T_1, \pi\pi^*)$; bottom: $1^3A'(T_2, n\pi^*)$.

$1^1A'(n\pi^*)$ state (vertically S_2) is shown to relax its energy by more than 1 eV upon geometry optimization. The main variations are obtained in the pyrone ring (up to -0.13 Å) and in the C=O bond length (0.16 Å). Although the $1^1A'(n\pi^*)$ minimum belongs to the S_1 hypersurface, the final T_e value is near 0.3 eV higher in energy than the computed and measured band origin for $2^1A'(\pi\pi^*)$. Therefore the $n\pi^*$ state it is not a plausible candidate for the fluorescence, which is better attributed to the $\pi\pi^*$ state. To support the assignment we cannot rely on the dependence of the recorded fluorescence emission on the solvent polarity, which is not clear in psoralen. Nevertheless, it is possible to support the assignment by comparing intrinsic fluorescence lifetimes. In principle, no experimental lifetimes have been reported, but from our computed radiative lifetimes, 74 ns for $2^1A'(\pi\pi^*)$ and 3 μ s for $1^1A'(n\pi^*)$, and the experimental fluorescence quantum yield (0.016),²⁷ they can be deduced as 1.2 and 72 ns, respectively. Taking into account that the reported measurements were performed at time resolutions not lower than 2 ns,²⁷ the lack of measured lifetimes points out to a preferred assignment to the ($\pi\pi^*$) S_1 state, with a faster fluorescence decay. Certainly, studies at a higher time resolution would be desirable.

The $1^3A'(\pi\pi^*)$ state is clearly protagonist of the phosphorescence. A band origin computed at 2.76 eV perfectly relates to the observed value in solution at 2.72 eV.²⁷ The change in geometry calculated from the ground state minimum is here more pronounced, in particular, at the pyrone ring, while the relaxation in energy reaches nearly 0.5 eV (cf. Fig. 4). The largest structural change is computed for the C₃-C₄ bond of the pyrone ring, which enlarges upon absorption and further relaxation by near 0.13 Å. The computed spin population, displayed in Fig. 5, is mainly placed on each of the carbon atoms forming the bond. In that way, psoralen becomes highly reactive in its lowest triplet state through its pyrone C₃-C₄ bond. This finding is the cornerstone of the photophysics of psoralen, which has been repeatedly pro-

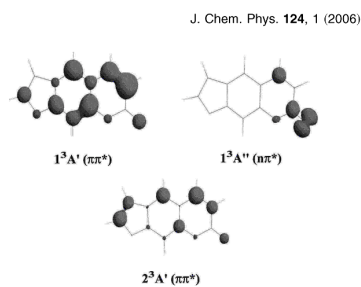


FIG. 5. Spin density for the low-lying triplet states in psoralen computed at the ground state optimized geometry.

posed to take place through a reactive triplet state, and it is also in agreement with the structure proposed for the phosphorescence band, mainly based on the intense vibrational progression corresponding to a C=C stretching mode in the pyrone moiety.²⁷ The computed phosphorescence radiative lifetime is 28 s, slightly higher than those estimated experimentally from the quantum yield and the total relaxation time, 5 and 8 s.^{27,28} For the $2^3A'(\pi\pi^*)$ state the spin population is placed mainly on the carbon atoms forming both C=C bonds, that is, C₃-C₄ (pyrone) and C₄'-C₅' (furan).

C. Photophysics of psoralen

Since the phototherapeutic properties of psoralen initiate by irradiation with light of wavelengths of 320–400 nm (3.87–3.10 eV), the only state which will be significantly populated by direct absorption is the spectroscopic $2^1A'(\pi\pi^*)S_1$ singlet state. The excited molecule will evolve towards the minimum of S_1 , from which fluorescence will take place. The recorded phosphorescence/fluorescence emission ratio of 7.1 (Ref. 27) emphasizes the role of the triplet states in the photophysics of the system. That is, the lowest-lying triplet $1^3A'(\pi\pi^*)T_1$ must be populated, either by direct absorption or by means of an effective intersystem crossing mechanism. T_1 state lies much lower in energy than the S_1 state, both vertically (≈ 0.6 eV) and adiabatically (≈ 1.2 eV). The occurrence of direct interaction between both vertical states is unlikely, and therefore another mechanism has to be found, involving probably population of higher-lying triplet states continued by internal conversions towards T_1 . In order to populate a triplet state by direct absorption, the spin-orbit coupling between the initial ground state and any of the low-lying triplet states should be quite large. The qualitative El-Sayed rules⁵² indicate that the spin-orbit coupling is maximum between states of $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ types and minimum between states of the same nature. The spin-orbit matrix element between the ground S_0 and the low-lying $1^3A'(n\pi^*)$ state is computed to be 47 cm^{-1} , a large value that leads to a small combined oscillator strength of 5×10^{-6} for the corresponding spin-forbidden transition. The high phosphorescence quantum yield requires, however, a much more efficient procedure to populate T_1 , and therefore an intersystem crossing (ISC) must be involved in the

photophysics. There are two necessary conditions for an effective ISC to take place: low energy gap and high spin-orbit coupling between a singlet and a triplet state. If the initially populated state is $2^1A'(n\pi^*)S_1$, the nonradiative decay to a triplet state must occur along the relaxation pathway of S_1 , starting from the Franck-Condon region (ground state geometry), and in close vicinities of a singlet-triplet crossing. Analyzing the vertical energy differences between the S_1 and the triplet states, the gaps are quite large, while the spin-orbit coupling (SOC) elements are small. For instance, the largest SOC, 3 cm^{-1} , occurs between $2^1A'(n\pi^*)$, that is, S_1 , and $1^3A''(n\pi^*)$, vertically T_7 , which are separated by 0.87 eV . A similar value of 10 cm^{-1} was obtained at the DFT/MRCI level.⁵² Other gaps and couplings studied at the Franck-Condon region are of minor importance. In order to fully understand the intersystem crossing mechanism responsible for the population of the reactive T_1 state in psoralen, the relaxation pathways of the energy should be computed, searching for regions with near degeneracies or crossings between the S_1 and triplet states having also large SOCs. These studies are the object of our future research.

IV. SUMMARY AND CONCLUSIONS

In the present research the photophysics of psoralen has been studied using quantum-chemical methods through the multiconfigurational second-order perturbation procedure CASPT2, employing high-quality ANO-type one-electron basis sets. Optimized geometries for the low-lying singlet and triplet states, energy differences, and state and transition properties provide us with important information to understand the excited state structure and the absorption and emission processes taking place upon irradiation of the molecule. The absorption spectrum of the system has been studied by computing vertical excitation energies. A low-lying S_1 singlet excited state of $n\pi^*$ character with a benzenelike nature is shown to lie at the energies in which the molecule is irradiated in phototherapy. This state is also proven to be responsible of the recorded fluorescence in different media by computing the emission properties and comparing them to the experimental measurements. Regarding the triplet state structure, a $T_1(n\pi^*)$ state is computed at low energies as responsible for the strong phosphorescence of the system. Analysis of the energy gaps and spin-orbit couplings at the Franck-Condon region suggests that the process responsible for the population of T_1 does not take place vertically and most probably it occurs along the relaxation path on the S_1 hypersurface. The study of the proper regions for favorable intersystem crossing requires the calculation of minimum energy paths and singlet-triplet crossings. On the other hand, the suggested role of the $S_2(n\pi^*)$ -type state in the mechanism,²⁷ based on the assumption of the traditional proximity effect,⁵³ between singlet $n\pi^*$ and $n\pi^*$ states, is unlikely. This type of reasoning is always based on vertical gaps, while modern photophysics is based in most of the cases on nonadiabatic processes along the energy relaxation paths.^{36,44,54} Finally, the reactivity of psoralen in its T_1 state and the suggested role of such state in phototherapy are rationalized in terms of

the computed spin density distributed on the two carbon atoms of the pyrone ring C_3 - C_4 bond, which varies from a double- to a single-type character.

ACKNOWLEDGMENTS

The present research has been supported by projects CTQ2004-01739 of the Spanish MEC and GV04B-228 of the Generalitat Valenciana. One of the authors (J.J.S.P.) acknowledges the Spanish MEC for a research (FPU) grant.

- ¹R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy* (Gordon and Breach Science, Amsterdam, 2000).
- ²B. R. Scott, M. A. Pathak, and G. R. Mohn, *Mutat Res.* **39**, 29 (1976).
- ³P. S. Song and K. J. Tapley, Jr., *Photochem. Photobiol.* **29**, 1177 (1979).
- ⁴E. Ben-Hur and P.-S. Song, *Adv. Radiat. Biol.* **11**, 131 (1984).
- ⁵D. Averbek, *Photochem. Photobiol.* **50**, 859 (1989).
- ⁶R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* **24**, 19 (1995).
- ⁷A. M. Roush, *Chem. Eng. News* **76**, 22 (1998).
- ⁸P. C. Joshi and M. A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 638 (1983).
- ⁹Y. N. Konan, R. Gumy, and E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol., B* **66**, 89 (2001).
- ¹⁰S. Wang, R. Gao, F. Zhou, and M. Selke, *J. Mater. Chem.* **14**, 487 (2004).
- ¹¹N. J. De Mol and M. J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* **53**, 815 (1981).
- ¹²H. Meffert, F. Böhm, and E. Bauer, *Stud. Biophys.* **94**, 41 (1983).
- ¹³J. Llano, J. Raber, and L. A. Eriksson, *J. Photochem. Photobiol., A* **154**, 235 (2003).
- ¹⁴J. Cadet and P. Vigny, in *Bioorganic Photochemistry*, edited by H. Morison (Wiley, New York, 1990), Vol. 1.
- ¹⁵C. M. Estévez, A. M. Grana, M. A. Ríos, and J. Rodríguez, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **77**, 163 (1991).
- ¹⁶F. Dall'Acqua and P. Martelli, *J. Photochem. Photobiol., B* **8**, 235 (1991).
- ¹⁷W. L. Fowles, *J. Invest. Dermatol.* **32**, 249 (1959).
- ¹⁸M. A. Pathak and J. H. Fellman, *Nature (London)* **185**, 382 (1960).
- ¹⁹A. B. Lerner, C. R. Denton, and T. B. Fitzpatrick, *J. Invest. Dermatol.* **20**, 299 (1953).
- ²⁰J. A. Parrish, T. B. Fitzpatrick, L. Tannenbaum, and M. A. Pathak, *N. Engl. J. Med.* **291**, 1207 (1974).
- ²¹M. Aida, M. Kaneko, and M. Dupuis, in *Computational Molecular Biology*, edited by J. Leszczynski (Elsevier, Amsterdam, 1999), Vol. 8.
- ²²B. Durbej and L. A. Eriksson, *Photochem. Photobiol.* **78**, 159 (2003).
- ²³D. J. Yoo, H. D. Park, A. R. Kim, Y. S. Rho, and S. C. Shim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 1315 (2002).
- ²⁴L. Musajo and G. Rodighiero, in *Photobiology*, edited by A. G. Giese (Academic, New York, 1972), Vol. 7.
- ²⁵P. S. Song, S. C. Shim, and W. W. Mantulin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **54**, 315 (1981).
- ²⁶M. Collet, M. Hoebcke, J. Piette, A. Jakobs, L. Lindqvist, and A. Van de Vorst, *J. Photochem. Photobiol., B* **35**, 221 (1996).
- ²⁷W. W. Mantulin and P. S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 5122 (1973).
- ²⁸E. Yeagers and L. Augenstein, *J. Invest. Dermatol.* **44**, 181 (1965).
- ²⁹E. Yeagers and L. Augenstein, *Nature (London)* **212**, 251 (1966).
- ³⁰G. G. Aloisi, F. Elisei, S. Moro, G. Miolo, and F. Dall'Acqua, *Photochem. Photobiol.* **71**, 506 (2000).
- ³¹N. E. Koval'skaya and I. V. Sokolova, *High Energy Chem.* **36**, 193 (2001).
- ³²J. Tatchen, M. Kleinschmidt, and C. M. Marian, *J. Photochem. Photobiol., A* **167**, 201 (2004).
- ³³K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, and B. O. Roos, *J. Chem. Phys.* **96**, 1218 (1992).
- ³⁴L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, and B. O. Roos, *J. Chem. Phys.* **98**, 3151 (1993).
- ³⁵B. O. Roos, K. Andersson, M. P. Fülcher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, and M. Merchán, in *New Methods in Computational Quantum Mechanics, Advances in Chemical Physics*, Vol. XCIII, edited by I. Prigogine and S. A. Rice (Wiley, New York, 1996), pp. 219-331.
- ³⁶L. Serrano-Andrés and M. Merchán, in *Encyclopedia of Computational Chemistry*, edited by P. v. R. Schlegel et al. (Wiley, Chichester, 2004).
- ³⁷M. Merchán and L. Serrano-Andrés, in *Computational Photochemistry*, edited by P. v. R. Schleyer, P. R. Schreiner, H. F. Schaefer III, W. L.

- 1-7 Photophysics of psoralen
- Jorgensen, W. Thiel, and R. C. Glen (Elsevier, Amsterdam, 2005).
- ³⁸ B. O. Roos, K. Andersson, M. P. Fülcher, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, and V. Molina, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM* **388**, 257 (1996).
- ³⁹ N. Forsberg and P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* **274**, 196 (1997).
- ⁴⁰ J. Almlöf and P. R. Taylor, *J. Chem. Phys.* **86**, 4070 (1987).
- ⁴¹ P.-O. Widmark, P.-Å. Malmqvist, and B. O. Roos, *Theor. Chim. Acta* **77**, 291 (1990).
- ⁴² L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B. O. Roos, and M. Merchán, *J. Phys. Chem.* **97**, 9360 (1993).
- ⁴³ P.-Å. Malmqvist and B. O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* **155**, 189 (1989).
- ⁴⁴ M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M. A. Robb, and L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1820 (2004).
- ⁴⁵ K. Andersson, M. Barysz, A. Bernhardsson *et al.*, *MOLCAS*, Version 6.0, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Center, University of Lund, P.O.B. 124, S-221 00 Lund, Sweden 2002.
- ⁴⁶ V. Veryazov, P.-O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, and B. O. Roos, *Int. J. Quantum Chem.* **100**, 626 (2004).
- ⁴⁷ H. Matsumoto and Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **11**, 3433 (1978).
- ⁴⁸ A. Nakata, T. Baba, H. Takahashi, and H. Nakai, *J. Comput. Chem.* **25**, 179 (2003).
- ⁴⁹ D. J. Tozer, R. D. Amos, N. C. Handy, B. O. Roos, and L. Serrano-Andrés, *Mol. Phys.* **97**, 859 (1999).
- ⁵⁰ J. L. McHale, *Molecular Spectroscopy* (Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999).
- ⁵¹ O. Rubio-Pons, L. Serrano-Andrés, and M. Merchán, *J. Phys. Chem. A* **105**, 9664 (2001).
- ⁵² P. Avouris, W. M. Gelbart, and M. A. El-Sayed, *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* **77**, 793 (1977).
- ⁵³ W. A. Wassam, Jr and E. C. Lim, *J. Chem. Phys.* **68**, 433 (1978).
- ⁵⁴ M. Merchán and L. Serrano-Andrés, *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8108 (2003).
- ⁵⁵ T. A. Moore, M. L. Harter, and P.-S. Song, *J. Mol. Spectrosc.* **40**, 144 (1971).



Available online at www.sciencedirect.com

Chemical Physics Letters 434 (2007) 107–110

**CHEMICAL
PHYSICS
LETTERS**

www.elsevier.com/locate/cplett

Quantum chemical study on the population of the lowest triplet state of psoralen

Juan José Serrano-Pérez, Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés^{*}*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES 46071 Valencia, Spain*Received 25 September 2006; in final form 17 November 2006
Available online 24 November 2006

Abstract

The efficient population of the low-lying triplet $\pi\pi^*$ state of psoralen is studied with the quantum chemical CASPT2 method. Minima, singlet–triplet crossings, conical intersections, and reaction paths on the low-lying singlet and triplet states hypersurfaces of the system have been computed together with electronic energy gaps and spin–orbit coupling terms. A mechanism is proposed, favorable in the gas phase, for efficient deactivation of the initially populated singlet excited $\pi\pi^*$ state, starting with an intersystem crossing with an $n\pi^*$ triplet state and evolving via a conical intersection toward the final lowest-lying $\pi\pi^*$ triplet state, protagonist of the reactivity of psoralen. © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, phototherapy and, in particular, photochemotherapy, is the most important healing strategy to fight against many skin diseases, and its ability to treat disorders as tumors and ocular degenerations is increasing [1–3]. Research on convenient photosensitizers able to trigger the therapeutic process upon light absorption on specific tissues but becoming inactive in the dark is highly necessary in order to enhance the efficiency of the technique. For this purpose, the understanding of the exact photochemical mechanism responsible for the therapeutic activity becomes crucial. Psoralen is the parent molecule of a family of heterocyclic compounds named furocoumarins which are frequently used, in conjunction with near UV-A light (320–400 nm), as photosensitizers in the treatment of common skin illness as psoriasis and vitiligo [1,3–7, 8,9]. Two mechanisms have been proposed to account for the phototherapeutic activity of furocoumarins. The so-called PUVA (Psoralen + UV-A radiation) therapy is assumed to involve a [2 + 2]-photocycloaddition of the psoralen derivative (typically 8-methoxypsoralen) with a

thymine base of DNA, forming monoadducts and diadducts that link and cross-link DNA strands interfering with the genetic activity of the proliferating cells [1,4,6,3]. An alternative mechanism is known as photodynamic therapy (PDT) and consists of the psoralen-mediated generation of singlet molecular oxygen after energy transfer to ground-state triplet oxygen. The highly reactive singlet oxygen may later damage target tissues just in the regions where the photosensitizer, here a furocoumarin, has been irradiated with specific UV light [1,10,11]. The predominance of one or the other mechanism in the therapeutic activity of psoralens is a question under research from different viewpoints. In order to get some insight into the problem, the primary photochemical step common to both mechanisms, i.e. the efficient population of the low-lying triplet state of furocoumarin, has to be elucidated. Such state has been suggested as the key precursor in the reactivity with thymine, as well as the donor species in the energy transfer to triplet oxygen [12,13].

In previous quantum chemical studies important aspects of the photophysics of psoralen were established [14–16]. The only state significantly populated by direct absorption at the wavelengths used in the therapy (320–400 nm, 3.87–3.10 eV) was proved to be the bright spectroscopic $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) S_1 singlet state (hereafter S_1). The excited molecule will certainly evolve along the S_1 hypersurface to reach

^{*} Corresponding author. Fax: +34 963543156.
E-mail address: Luis.Serrano@uv.es (L. Serrano-Andrés).

the state minimum, from which fluorescence has been measured. The reported high phosphorescence/fluorescence rate, 7.1 [17], can however be only explained if an efficient transfer of the energy has occurred from the initially populated S_n state toward the low-lying T_1 (hereafter T_n) triplet state. The mechanism for the energy transfer is not known. It was shown previously [14,15] that the lowest-lying triplet state $1^3A'$ ($\pi\pi^*$) T_n cannot be populated by direct absorption, considering the low oscillator strength computed for the corresponding transition when considering spin-coupling effects. The only alternative is the state population via a direct intersystem crossing (ISC) process from a singlet state or indirectly through an internal conversion (IC) from a higher-lying triplet state which was previously populated by an efficient ISC. The goal of this communication is to explore possible mechanisms for populating psoralen T_n state in efficient ways. Reaction paths, energy gaps, spin-orbit coupling values, and the location of different singlet-triplet crossings and conical intersections will be obtained for such an analysis, performed at the second-order perturbative multiconfigurational level of calculation using the CASSCF and CASPT2 methods.

2. Computational details

The ab initio multiconfigurational CASSCF method has been employed throughout in all geometry optimizations performed in the present research, including minimum energy paths (MEPs), computed as described elsewhere [18]. An active space of 14 electrons and 13 active orbitals was employed, comprising the π structure of the molecule plus the exocyclic oxygen lone-pair. The selection was performed based on previous experience [15] and control restricted active space (RAS) SCF calculations. The two lowest π orbitals and electrons were treated as inactive because of their minor contribution to the description of the low-lying excited states. At the CASSCF computed geometries, electronic energies have been obtained by using the multiconfigurational second-order perturbation approach, CASPT2 [19], a general quantum chemical method which has repeatedly proved its accuracy, in particular to compute excited states [20–26]. The imaginary level-shift technique was employed in order to prevent the possibility of intruder states. A shift parameter of 0.3 au was selected after checking the stability in the excitation energies [27]. The carbon and oxygen 1s core electrons were kept frozen in the second-order perturbation step. The CAS state interaction method (CASIS) [28] was used to compute transition properties, including the spin-orbit coupling (SOC) elements between selected states as described elsewhere [25,26,29]. Nonplanar structures and different one-electron basis sets were explored during the study, although the final results presented here are constrained to the C_s symmetry point group and use atomic natural orbital (ANO-L) type basis set contracted to C, O [4s3p1d]/H [2s1p] [30]. All calculations in the present paper were performed with the Mol.CAS-6.0 quantum chemistry software [31,32].

3. Results and discussion

The bright spectroscopic $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) S_n singlet state in psoralen, lying vertically at 3.98 eV at the CASPT2 level, is populated by direct absorption [15]. From this state it is necessary to establish how the most favorable transfer of the energy to the triplet manifold can take place. An efficient ISC process requires both small singlet-triplet (S-T) energy gaps and large spin-orbit coupling (SOC) between the populated S_n state and the corresponding triplet state. At the ground-state Franck-Condon (FC) geometry none of these conditions seems to be simultaneously fulfilled. Whereas the smallest computed S-T energy gaps relate to $\pi\pi^*$ -type singlet and triplet states ($1^3A'$ (T_n): -0.71 eV; $2^3A'$ (T_2): -0.43 eV; $3^3A'$ (T_3): 0.10 eV, and $4^3A'$ (T_4): 0.11 eV [15]), the SOC terms are always extremely small, in agreement with the qualitative El-Sayed rules and previous DFT/MRCI calculations [14]. On the contrary, the coupling is larger between S_n and the lowest triplet $n\pi^*$ $1^3A''$ (T_n) state, 3 cm^{-1} (CASPT2) or 10 cm^{-1} (DFT/MRCI) [14], although the vertical S-T gap is too high, 0.87 eV.

The possibility that should be explored is to consider that the nonradiative decay to a triplet state should occur along the S_n relaxation pathway. A minimum energy path (MEP) on the S_n state hypersurface was built from the FC geometry. Along the initial steps of such a costly calculation the T_n ($n\pi^*$) state, while it remains with the largest SOC terms with S_n , increased its energy with respect to the latter state almost 0.2 eV. It was therefore concluded that no efficient ISC could be expected along the main relaxation path, and that the S_n state quickly reaches its own minimum, $(S_n)_{\text{MIN}}$, without crossing T_n or T_n . Fluorescence (F) band origin has been measured at 3.54 eV, and our computed result, 3.59 eV, relates the emission to the lowest ($\pi\pi^*$) singlet state minimum, $(S_n)_{\text{MIN}}$ [15].

Another mechanism to deactivate the S_n state nonradiatively should be found. The most favorable ISC process can be expected to occur when S_n and T_n hypersurfaces cross. At the $(S_n)_{\text{MIN}}$ geometry the T_n state lies above the S_n state at 1.24 eV. In order to find the structure corresponding to the crossing we performed a linear interpolation in internal coordinates (LIIC) from $(S_n)_{\text{MIN}}$ to the minimum of the $1^1A''$ state, $(S_n)_{\text{MIN}}$, a geometry where the T_n state is clearly lower in energy (0.51 eV) than the S_n state. Fig. 1 displays the computed energies and SOC terms for the low-lying excited, two singlet and five triplet, states along the described LIIC path in psoralen. The S_n - T_n gap is shown to decrease until both states cross shortly after point 2. In the meanwhile, the SOC elements increase to around 10 cm^{-1} , suggesting a very favorable situation for an efficient ISC process. With respect to $(S_n)_{\text{MIN}}$, the barrier to reach T_n has been computed to be 0.4 eV, an energy that can be considered an upper bound for the most favorable path. In order to determine more accurately the S-T crossing region, point 2 of the LIIC was used as initial geometry to initiate a search at the CASSCF level for a sin-

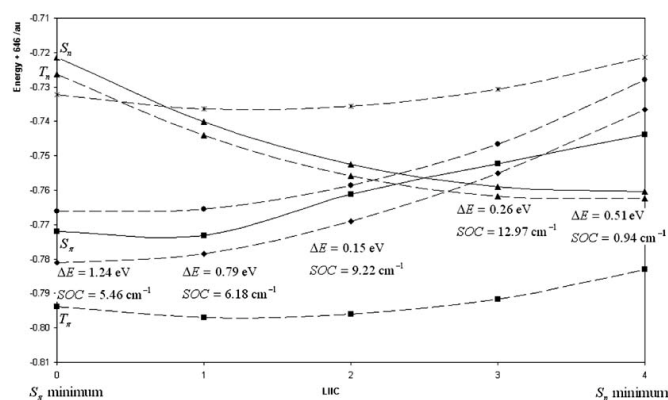


Fig. 1. Computed CASPT2 energies for the low-lying excited states of psoralen along a linear interpolation of internal coordinates (LIIC) from S_n to S_n minima. Solid and dashed lines represent singlet and triplet states, respectively. Energy gaps (ΔE) and spin-orbit coupling (SOC) terms between S_n and T_n at the interpolated geometries are also included.

glet-triplet crossing (STC) between S_n and T_n , (S_n/T_n)_X. As expected, the main change in geometry from the minimum of S_n to the optimized structures of S_n or T_n (see also Ref. [15]) is related to the length of the C=O bond, much larger (≈ 0.15 Å) for the $n\pi^*$ states. It is not surprising that the STC structure displays an intermediate value of 1.220 Å. The SOC term in STC is computed as 6.4 cm^{-1} . The barrier from $(S_n)_{\text{MIN}}$ to $(S_n/T_n)_X$ was computed as 0.36 eV at the CASPT2 level, and represents the excess energy required for the ISC process to take place.

Once the T_n state is efficiently populated through a favorable ISC mechanism, it will quickly evolve towards the nearby energy minimum, $(T_n)_{\text{MIN}}$, placed 0.11 eV below $(S_n/T_n)_X$. As observed in Fig. 1, at those geometries T_n is the second excited triplet state, and it can be expected that the energy follows a pathway for favorable internal conversion (IC) toward the low-lying T_x state. Actually, we have found a conical intersection $(T_n/T_x)_{\text{CI}}$ placed almost isoenergetic with $(T_n)_{\text{MIN}}$. An efficient IC will therefore take place transferring the population to T_x , which will subsequently evolve to its own minimum, $(T_x)_{\text{MIN}}$, from where phosphorescence (P) may take place. The computed adiabatic emission, 2.76 eV, is in good agreement with the measured value of 2.7 eV [17]. Regarding the computed geometries, the C=O bond length undergoes the most important changes, enlarging from 1.346 Å at $(T_n)_{\text{MIN}}$ to 1.372 Å at the conical intersection $(T_n/T_x)_{\text{CI}}$, and becoming much shorter, 1.198 Å, at $(T_x)_{\text{MIN}}$, in accordance with the $\pi\pi^*$ or $n\pi^*$ nature of the excited states as described previously [15]. Fig. 2 displays a scheme, based on quantum chemical calculations, summarizing the photochemistry of psoralen.

Consequences of breaking the planarity of the molecule were explored here at different levels, but geometry optimiza-

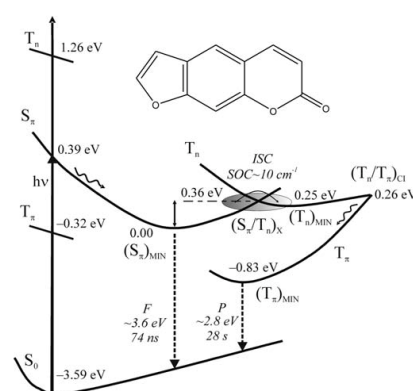


Fig. 2. Scheme of the gas-phase photochemistry of psoralen based on quantum chemical CASPT2 calculations. Energies are referred to $(S_0)_{\text{MIN}}$.

tions always led to planar minima for the different states. The relevance of out-of-plane displacements for the relaxation of the S_n state has been emphasized recently [16], together with the enhancement of the SOC terms between low-lying S_n and T_n states by vibronic coupling effects involving out-of-plane modes, as an alternative mechanism for efficient ISC [33]. With information at hand, both mechanisms have to be viewed as competitive. Taking into account that $n\pi^*$ states tend to destabilize in polar solvents [14], the (T_n) -mediated mechanism here proposed will surely decrease its importance

in polar media, remaining a plausible candidate for the efficient population of the low-lying T_n triplet state in the gas phase. Further work will be focused on the comparison of barrier heights and ISC efficiency at selected structures in order to determine if one or the other mechanism are prevalent or competitive in furocoumarin photochemistry.

4. Summary and conclusions

The population mechanism of the low-lying T_n state of psoralen, protagonist of its action as a photosensitizer, has been studied theoretically after the initial UV irradiation of the spectroscopic S_n state of the system (see Fig. 2). Accurate ANO-type one-electron basis sets and the multiconfigurational second-order perturbation CASPT2 method have been employed. Analysis of the obtained energy differences, barrier heights, energy minima, hypersurface crossings, and spin-orbit coupling terms among the different electronic states indicates that the system, after evolving toward the S_n energy minimum, may surmount a barrier of 0.36 eV and reach a S–T crossing between S_n and the low-lying triplet $n\pi^*$ state, $(S_n/T_n)_X$. SOC terms close to 10 cm^{-1} have been obtained pointing to an efficient ISC process in the neighborhood of the crossing region. Once the T_n state has been populated, an ultrafast decay toward the low-lying T_n state may proceed through the conical intersection $(T_n/T_n)_{CI}$, transferring the energy to the T_n energy minimum from which the psoralen molecule may emit (phosphorescence) or react.

In summary, the invoked proximity effect model for the fluorescence quenching of psoralen involving the coupling of $n\pi^*$ and $m\pi^*$ states and based solely in terms of vertical energy gaps [4,34] is reformulated here by considering hypersurface crossings and nonadiabatic radiationless reactions. The depopulation of S_n is suggested to take place far from the FC region through a S–T crossing with the T_n ($n\pi^*$) state, undergoing an efficient ISC as suggested by the high spin-coupling terms. Studies are in progress to analyze competitive mechanisms involving vibronic spin-orbit coupling effects.

Acknowledgements

The present research has been supported by projects GTQ2004-01739 of the Spanish MEC/FEDER and GV06-192 of the Generalitat Valenciana. JJSP acknowledges a Ph.D. (FPU) Grant from the Spanish MEC. Support from the European Science Foundation (ESF) through COST Action P9 has also been obtained.

Appendix A. Supplementary data

Cartesian coordinates of the optimized geometries as computed in the paper. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cplett.2006.11.086.

References

- [1] R. Bonnett, Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.
- [2] M. Weichenthal, T. Schwarz, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 21 (2005) 260.
- [3] D. Averbek, Photochem. Photobiol. 50 (1989) 859.
- [4] P.S. Song, K.J. Tapley Jr., Photochem. Photobiol. 29 (1979) 1177.
- [5] B.J. Parsons, Photochem. Photobiol. 32 (1980) 813.
- [6] E. Ben-Hur, P.-S. Song, Adv. Rad. Biol. 11 (1984) 131.
- [7] M.A. Pathak, T.B. Fitzpatrick, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 14 (1992) 3.
- [8] W.L. Morison, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 20 (2004) 315.
- [9] N. Kitamura, S. Kohtani, R. Nakagaki, J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. 6 (2005) 168.
- [10] N.J. De Mol, M.J. Beijersbergen van Henegouwen, Photochem. Photobiol. 33 (1981) 815.
- [11] E. Bauer, H. Meffert, F. Böhm, Studia Biophysica 94 (1983) 41.
- [12] J. Llano, J. Raber, L.A. Eriksson, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 154 (2003) 235.
- [13] J. Cadet, P. Vigny, in: H. Morrison (Ed.), Bioorganic Photochemistry 1, John Wiley & Sons, New Jersey, 1990.
- [14] J. Tatchen, M. Kleinschmidt, C.M. Marian, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 167 (2004) 201.
- [15] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, J. Chem. Phys. 124 (2006) 124502.
- [16] J. Tatchen, C.M. Marian, Chem. Phys. Phys. Chem. 8 (2006) 2133.
- [17] W.W. Mantulin, P.S. Song, J. Am. Chem. Soc. 95 (1973) 5122.
- [18] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin, Proc. Natl. Acad. Sci. 103 (2006) 8691.
- [19] K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, J. Chem. Phys. 96 (1992) 1218.
- [20] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, B.O. Roos, J. Chem. Phys. 98 (1993) 3151.
- [21] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, B.O. Roos, M.P. Fulscher, J. Am. Chem. Soc. 115 (1993) 6184.
- [22] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fulscher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, Multiconfigurational perturbation theory: applications in electronic spectroscopy, in: I. Prigogine, S.A. Rice (Eds.), Advances in Chemical Physics: New Methods in Computational Quantum Mechanics, XCIII, John Wiley & Sons, New York, 1996, p. 219.
- [23] L. Serrano-Andrés, N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, J. Chem. Phys. 108 (1998) 7202.
- [24] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, Spectroscopy: applications, in: P.v.R. Schlegel et al. (Eds.), Encyclopedia of Computational Chemistry Chichester, Wiley, UK, 2004.
- [25] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, Ab initio methods for excited states, in: M. Olivucci (Ed.), Computational Photochemistry Amsterdam, Elsevier, 2005.
- [26] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M.A. Robb, L. Blancafort, J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 1820.
- [27] N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, Chem. Phys. Lett. 274 (1997) 196.
- [28] P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, Chem. Phys. Lett. 155 (1989) 189.
- [29] B.O. Roos, P.-Å. Malmqvist, Chem. Phys. Phys. Chem. 6 (2004) 2919.
- [30] P.-O. Widmark, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, Theor. Chim. Acta 77 (1990) 291.
- [31] K. Andersson et al., MOLCAS Version 6.0. Dept. of Theor. Chem., Chem. Center, Univ. of Lund, P.O. Box 124, S-221 00 Lund, Sweden Lund (2002).
- [32] V. Veryazov, P.-O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, Int. J. Quantum Chem. 100 (2004) 626.
- [33] J. Tatchen, C.M. Marian, to be published.
- [34] T. Lai, B.T. Lim, E.C. Lim, J. Am. Chem. Soc. 104 (1982) 7631.

On the Intrinsic Population of the Lowest Triplet State of Thymine

Juan José Serrano-Pérez, Remedios González-Luque, Manuela Merchán, and Luis Serrano-Andrés*

*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de Valencia, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain**Received: August 14, 2007; In Final Form: September 12, 2007*

The population of the lowest triplet state of thymine after near-UV irradiation has been established, on the basis of CASPT2/CASSCF quantum chemical calculations, to take place via three distinct intersystem crossing mechanisms from the initially populated singlet bright $^1\pi\pi^*$ state. Two singlet–triplet crossings have been found along the minimum-energy path for ultrafast decay of the singlet state at 4.8 and 4.0 eV, involving the lowest $^3n\pi^*$ and $^3\pi\pi^*$ states, respectively. Large spin–orbit coupling elements predict efficient intersystem crossing processes in both cases. Another mechanism involving energy transfer from the lowest $^1n\pi^*$ state with much larger spin–orbit coupling terms can also be proposed. The wavelength dependence measured for the triplet quantum yield of pyrimidine nucleobases is explained by the location and accessibility of the singlet–triplet crossing regions.

Introduction

Triplet states are frequent intermediates in different types of photoinduced reactions.¹ Both their usual diradical character and their long lifetimes make them reactive species prone to interact with other systems. Among the most important reactions involving triplet states, those related to DNA/RNA purine and pyrimidine nucleobases have undoubtedly attracted more attention, in particular the photodimerization of pyrimidine nucleobases, considered to be the most frequent mutation taking place after UV light irradiation.^{2–4} The proposed mechanisms normally suggest photoexcitation of a molecule to a singlet state followed by population of a triplet state by an intersystem crossing mechanism (ISC) and subsequent reaction of the triplet state of the nucleobase monomer with a second molecule in the ground state.^{2,3} In particular, the presence of the triplet state of thymine in solution has been observed by using different experimental techniques, such as flash photolysis,⁵ whereas specific triplet quenchers and external photosensitizers have been used in its population.^{2,3,5–8} It is surprising that, despite extensive work and frequent claims of triplet-state involvement in the fast relaxation processes of nucleobases, in particular for thymine,⁹ the actual mechanism for triplet-state formation in these systems is only now starting to be elucidated. We have recently presented a unified model for the rapid internal conversion (IC) of the singlet excited pyrimidine nucleobases uracil, thymine, and cytosine,¹⁰ where the observed ultrafast decay component, both in the gas phase and in solution, can be interpreted in terms of the barrierless character of the minimum-energy path (MEP) associated with the lowest singlet state of $\pi\pi^*$ type toward a conical intersection (CI) with the ground state, as it has also been reported for adenine.^{11–13} Secondary decay paths involving the lowest $^1n\pi^*$ state and even a higher $^1\pi\pi^*$ state have also been identified.^{11,12} Starting then from the known characteristics

of the main deactivation paths—singlet–singlet ICs—it is possible to analyze how the lowest triplet state can be reached efficiently.

The triplet-state population may proceed via endogenous or exogenous photosensitization from other triplet species or by efficient intersystem crossing (ISC) from the initially photoexcited singlet state. There are three couplings enabling the spin flipping mechanism, which enhances the efficiency of the ISC process: solvent-induced spin or spin–lattice relaxation, hyperfine coupling, and spin–orbit coupling (SOC).¹ Whereas the first and second mechanisms are only relevant in the presence of paramagnetic impurities and in polyradicals with distant magnetic centers, respectively, SOC predominates in most photoinduced processes, especially for organic and bioorganic compounds. SOC terms near $0.1–5.0\text{ cm}^{-1}$ have been considered large enough to yield fast ISC energy transfer.¹ In any case, and considering that the primary step of the photochemical process after light absorption basically involves population of the lowest singlet excited state (S_1), it is necessary to find those channels for energy deactivation and transfer in which the lowest triplet excited state (T_1) can be rapidly and efficiently populated through an ISC mechanism. For simplicity, early studies at the *ab initio*^{14,15} level estimated ISC rates by computing SOC elements between singlet and triplet states at the Franck–Condon (FC) geometry. The well-known qualitative El-Sayed rules¹⁶ to evaluate the coupling between $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ states in organic molecules, the largest between alike states and forbidden otherwise, were formulated on those grounds. Efficient ISC requires however simultaneous small singlet–triplet energy gaps and large SOC elements at appropriate geometries. Since product formation in the ground-state hypersurface is very fast and does not allow major conformational changes, it is the geometry of the triplet state yielding more favorable ISC that determines the ratio of the final products.¹ Nowadays, it is possible to locate regions of close degeneracy between the states, singlet–triplet

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Luis.Serrano@uv.es.

Letters

TABLE 1: Computed Spectroscopic Properties for the Low-Lying Singlet and Triplet Excited States of Thymine at the CASPT2/CASSCF(14,10)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] Level of Calculation

state	vertical transition (eV)		band origin (T_e , eV)		τ_{rad}
	CASSCF	CASPT2 ^a	CASSCF	CASPT2	
$^1(n_o\pi^*)^b$	5.41	4.77 (0.004)	4.23	4.05	2501 ns
$^1(\pi\pi^*)$	6.52	4.89 (0.167)	6.07	4.49	9 ns
$^3(\pi\pi^*)$	7.36	5.94 (0.114)			
$^3(\pi\pi^*)$	3.95	3.59	2.99	2.87	17 ms
$^3(n_o\pi^*)^b$	5.21	4.75	3.84	3.93	
$^3(\pi\pi^*)$	5.86	5.14			

^a Oscillator strengths in parentheses. ^b Involving basically O₄ (in the ortho position with the methyl group).

crossing regions, and compute there the SOC elements, combining the two required conditions for efficient ISC. As compared to IC, taking place essentially in small regions where the seam of CIs becomes accessible, the sectors of the potential energy hypersurfaces for effective ISC are more extensive. Large efforts have been devoted in previous years to the determination of CIs for IC processes in singlet states.¹⁷ The purpose of this Letter is to analyze, on theoretical grounds, the mechanism of population of the lowest triplet state of thymine, as we performed recently for cytosine¹⁸ and uracil,¹⁹ and rationalize the experimental findings on the basis of the singlet–triplet crossings (STCs) occurring along the major deactivation path responsible for the rapid IC process detected in the molecule. Thus, we address here three main questions: Can the intrinsic population of the lowest triplet state in thymine take place in vacuo? Can the thymine triplet state be expected to have a larger quantum yield of formation (ϕ_{ISC}) than that of the other nucleobases? And, what is the molecular basis for the wavelength dependence of ϕ_{ISC} ?² For this purpose, high-level ab initio methods are applied within the framework of the current theoretical paradigm for nonadiabatic photochemistry.¹⁷ Since the calculations have been performed in vacuo, without the explicit consideration of solvent effects, the answer provided here can be regarded as a characteristic molecular property of the thymine system, which might be expected to be somewhat disturbed by the specific environment it is exposed to in solution, in solid, or in vivo.

Computational Details

The present calculations include CASSCF geometry optimizations, minimum-energy paths (MEP), and conical intersection and singlet–triplet crossing searches, followed by multiconfigurational perturbation theory, CASPT2, calculations at the optimized geometries. Spin–orbit coupling terms and transition dipole moments have also been computed. The final results involve an active space of 14 electrons distributed in 10 orbitals, CASPT2(14,10)/CASSCF. Other active spaces were employed in the optimization procedures, following a strategy which was proved successful previously. A one-electron basis set of the ANO-S type contracted to C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] was used throughout. More detailed technical aspects of the calculations can be found in our previous papers^{10–12,18,19} and in the Supporting Information. All of the calculations reported used the quantum chemical methods implemented in the MOLCAS 6.0 package.²⁰

Results and Discussion

From thymine ground state and upon near-UV absorption at the FC region, most of the population reaches initially singlet excited states, and in particular, as listed in Table 1, it is the

J. Phys. Chem. B, Vol. 111, No. 41, 2007 11881

transition to the $^1(\pi\pi^*)$ HOMO (H) \rightarrow LUMO (L) (hereafter HL) excited state at 4.89 eV, which has the largest oscillator strength up to 6 eV, 0.167. The ultrafast nonradiative decay undergone by thymine in the fs range,^{21,22} can be rationalized by the barrierless character of the path leading from the FC region toward a CI seam with the ground state, $(gs/{}^1\pi\pi^*)_{CI}$, as we reported previously,¹⁰ and it is shown also here in Figure 1. Unlike simple geometry optimizations, the use of the MEP technique guarantees the absence of energy barriers along the lowest-energy path. The structure of the CI at the end of the MEP can be characterized as ethene-like, involving combined stretching and twisting of the ethylenic bond.¹⁰ The presence of an accessible CI also explains the low fluorescence quantum yield ($\sim\phi_F = 10^{-4}$) detected for thymine with a band origin at 4.5 eV in water.²³ This weak emission can be related to the presence of a high-lying planar $^1(\pi\pi^*)$ HL minimum computed adiabatically from the ground state at 4.49 eV, whereas a nonfluorescent $^1(n_o\pi^*)$ minimum is found at 4.05 eV (see Table 1) with a minor contribution to the emissive properties. Measured fluorescence radiative lifetimes, 7–8 ns both for uracil and thymine,²³ also agree with our estimation, 9 ns, and confirm the $^1\pi\pi^*$ nature of the fluorescent state. Similar vertical and adiabatic energy values have been found at other levels of theory.^{10,24–26}

The efficient population of the triplet manifold should take place essentially along the main decay process on S₁ $^1(\pi\pi^*)$ HL. As seen in Figure 1, along the $^1(\pi\pi^*)$ HL state MEP, and apart from the occurrence of a CI with the $^1(n_o\pi^*)$ singlet state, it is clear that two singlet–triplet crossings (STC), and therefore two ISC processes, take place, at 4.8 eV with the $^3(n_o\pi^*)$ triplet state, $({}^3n_o\pi^*/{}^1\pi\pi^*)_{STC}$, and at 4.0 eV, further along the relaxation path and near the ethene-like CI with the ground state, directly with the lowest $^3(\pi\pi^*)$ T₁ triplet state, $({}^3\pi\pi^*/{}^1\pi\pi^*)_{STC}$, a structure displaying the same type of screw-boat puckered geometry with a stretched and twisted double bond C₅=C₆ as that at the $(gs/{}^1\pi\pi^*)_{CI}$. Figure 2 includes a scheme describing the population of T₁ based on our CASPT2 calculations and three possible mechanisms proposed to explain the overall intersystem crossing process. A similar framework was found for uracil,¹⁹ although in thymine, the two ISC processes explained so far have similar SOC terms, near 8 cm⁻¹, and therefore, a comparable efficiency should be expected. Additionally, the profile of the computed MEP in Figure 1 suggests that, despite the ultrafast decay along the singlet state, the lower-energy ISC mechanism may enhance its efficiency with respect to the other nucleobases, resulting in larger quantum yields because the region for the energy transfer near to the end of the MEP seems to be much more extended.

Regarding the higher-energy ISC process, once the $^3(n_o\pi^*)$ triplet state has been populated, a MEP on such a state leads directly to its energy minimum, ${}^3(n_o\pi^*)_{min}$, placed at 3.93 eV adiabatically from the ground state (see Supporting Information). Basically degenerated, we have located a conical intersection connecting the triplet states $^3(n_o\pi^*)$ and $^3(\pi\pi^*)$, favoring the population switch toward the lowest $^3(\pi\pi^*)$ state. Another computed MEP on the T₁ hypersurface leads from $({}^3n_o\pi^*/{}^3\pi\pi^*)_{CI}$ to the $^3(\pi\pi^*)$ state minimum (see Supporting Information). This type of ${}^1\pi\pi^*/{}^3\pi\pi^*$ ISC mechanism via an intermediate $n\pi^*$ state, claimed frequently in older literature without the support of hypersurface searches, can be confirmed here as favorable, as it has been recently reported for uracil¹⁹ and other biological chromophores such as isalloxazine²⁷ and psoralen.²⁸ Both mechanisms described here can, in any case, contribute to the overall population of the lowest triplet state. In principle,

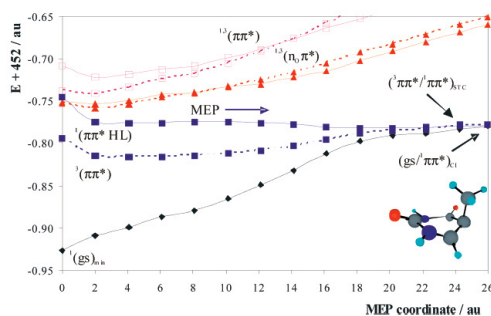


Figure 1. Evolution of the ground and lowest singlet excited states for thymine from the FC geometry along the $^1(\pi\pi^*)$ HL MEP computed at the CASPT2/CASSCF(14,10) ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level.

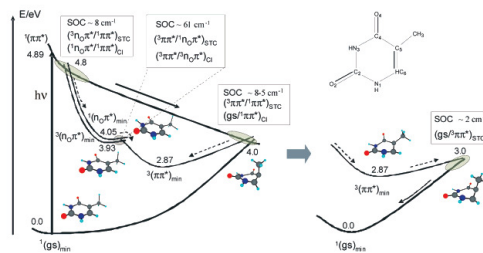


Figure 2. Scheme, based on CASPT2 results, of the photochemistry of thymine focused on the population of the lowest-energy triplet state.

in different environments, such as in polar solvents, it is expected that the $\pi\pi^*$ -type excited state will destabilize with respect to $\pi\pi^*$ -type excited states.²² Despite those effects, both singlet and triplet $n\text{O}\pi^*$ -type states are estimated to lie in the solvent below the $^1(\pi\pi^*)$ HL state at the FC geometry,^{23,29} guaranteeing the existence of the STC crossing upon decay along the $^1(\pi\pi^*)$ HL state. The reported wavelength dependence on the intersystem crossing quantum yield in nucleobases can be understood by the location of the two STC crossing regions and their accessibility upon the initial excitation conditions. In the case of thymine, the value increases from 3.9×10^{-3} at 280 nm (4.43 eV) to 5.2×10^{-2} at 240 nm (5.17 eV).^{3,30}

Recently, Hare et al.²⁹ reported the presence of a second deactivation path in pyrimidine nucleobases in solution via a low-lying dark intermediate state attributed to the singlet $^1(n\text{O}\pi^*)$. In order to explain higher triplet quantum yields in pyrimidine than that in purine nucleobases, a small fraction of the state population is suggested to undergo an ISC process toward the lowest triplet state. In our results, as well as in previous theoretical studies,^{19,24,25} the presence of the low-lying $^1(n\text{O}\pi^*)$ state is confirmed, lying almost isoenergetic with the lowest ethene-like $(gs^1/\pi\pi^*)_{\text{CI}}$ CI near 4.0 eV. The $^1(n\text{O}\pi^*)$ state may then be related to the observed dark state. Additionally, we have found that, as both singlet and triplet $^1(n\text{O}\pi^*)$ states have almost parallel hypersurfaces because of the typical small singlet–triplet splitting of $n\pi^*$ -type states, near degeneracy situations with the lowest $^3(\pi\pi^*)$ state are equal to both states (see Supporting Information). Therefore, close to the $(^3\pi\pi^*/$

$^1n\text{O}\pi^*)_{\text{CI}}$ CI, we have found a singlet–triplet crossing ($^3\pi\pi^*/^1n\text{O}\pi^*)_{\text{STC}}$. The large computed SOC terms, $\sim 61 \text{ cm}^{-1}$, guarantee also an efficient ISC process in the region, confirming this mechanism as relevant for the overall process.

Finally, the lowest triplet state is populated by any of the previous ISC processes and reaches its minimum, as proved by the computed MEPs (see Figure 2). At the state minimum, $^3(\pi\pi^*)_{\text{min}}$, the molecule displays a distorted structure with a ring deformation, including the dihedral angle $\text{C}_2\text{N}_1\text{C}_5\text{C}_6$ as 44° and an increased bond length C_5C_6 of 1.494 Å. The high reactivity attributed to this triplet state originates from its biradical character on C_5 and C_6 . The minimum is placed at 2.87 eV adiabatically (see Table 1) from the ground-state-optimized minimum, a value somewhat lower than the 3.2 eV estimated for the location of the triplet state for thymine mononucleotide in aqueous solution and room temperature⁷ and consistent with previous theoretical determinations at around 2.8–3.0 eV.²⁶ The location of the triplet state in thymine is also lower than that in the other pyrimidine nucleobases, computed adiabatically at 3.15 (uracil)¹⁶ and 3.04 eV (cytosine),¹⁹ an effect which can be attributed to methylation.³¹ As a final aspect of the evolution along the triplet manifold in thymine, we have located the singlet–triplet crossing connecting the $^3(\pi\pi^*)$ and the ground state and mapped the MEP leading from such a STC toward $^3(\pi\pi^*)_{\text{min}}$ (see Supporting Information). The crossing is placed near 3.0 eV from the ground-state minimum, which means that there is a barrier of 0.13 eV (3.0 kcal/mol) to reach $(gs^2/\pi\pi^*)_{\text{STC}}$ from $^3(\pi\pi^*)_{\text{min}}$. The molecule recovers the planarity there, and

Letters

the computed electronic SOC is somewhat low, $\sim 2 \text{ cm}^{-1}$, predicting a long lifetime and a slow relaxation for the triplet state, becoming therefore prone to react.

In summary, by means of CASPT2/CASSCF calculations and by computing minimum-energy paths, minima, conical intersections, singlet–triple crossings, and spin–orbit coupling terms, we have identified three different intrinsic mechanisms in which the population can be transferred from the initially populated singlet $^1(\pi\pi^* \text{ HL})$ state to the triplet manifold through respective singlet–triplet crossings (STC), which, in all cases, can be reached in a barrierless manner on the hypersurface. Along the $^1(\pi\pi^* \text{ HL})$ decay path, there are two STC at 4.8 eV, $(^2n_0\pi^*/^1\pi\pi^*)_{\text{STC}}$, and at 4.0 eV, $(^2\pi\pi^*/^1\pi\pi^*)_{\text{STC}}$, both with similar SOC terms of 8 cm^{-1} . In the former case, the population has to switch from the $^2(n_0\pi^*)$ to the $^3(\pi\pi^*)$ state through a conical intersection $(^2n_0\pi^*/^3\pi\pi^*)_{\text{CI}}$. The suggested ISC process²⁹ taking place from a less populated singlet $^1(n_0\pi^*)$ state toward $^3(\pi\pi^*)$ also occurs in the same region of the CI between the lowest triplet states, enhanced by large SOC terms, $\sim 61 \text{ cm}^{-1}$. These mechanisms are common to the other pyrimidine nucleobases, at least uracil and cytosine. The observed wavelength dependence of the intersystem crossing quantum yield in nucleobases can be interpreted by the contribution of the three or just the lowest-energy ISC mechanism.

Acknowledgment. Research was supported by Projects CTQ2004-01739 and CTQ2006-61260 of the Spanish MEC/FEDER and GV-AINF2007/051 and GV06-192 of the Generalitat Valenciana.

Supporting Information Available: Details of the calculation of MEPS, conical intersections, singlet–triplet crossings, spin–orbit coupling elements, and radiative lifetimes. Figures describing significant minimum-energy paths on the excited-states hypersurfaces. Table and figure with optimized geometries. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Klessinger, M. In *Theoretical Organic Chemistry – Theoretical and Computational Chemistry*; Párkányi, C., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1998; p 581.
- (2) Brown, J. H.; Johns, H. E. *Photochem. Photobiol.* **1968**, *8*, 273.
- (3) Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioorganic Photochemistry*; Morrison, H., Ed.; Wiley: New York, 1990.
- (4) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Koller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625.
- (5) Whillans, D. W.; Johns, H. E. *Photochem. Photobiol.* **1969**, *6*, 323.
- (6) Gut, I. G.; Wood, P. D.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2366.
- (7) Wood, P. D.; Redmond, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4256.
- (8) Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318.
- (9) Kang, H.; Lee, K. T.; Jung, B.; Ko, Y. J.; Kim, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12958.
- (10) Merchán, M.; González-Luque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471.
- (11) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691.
- (12) Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Chem.–Eur. J.* **2006**, *12*, 6559.
- (13) Blancfort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 210.
- (14) Bendazzoli, G. L.; Palmieri, P. *Int. J. Quantum Chem.* **1974**, *8*, 941.
- (15) Langhoff, S. R. *J. Chem. Phys.* **1974**, *61*, 1708.
- (16) Lower, S. K.; El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **1966**, *66*, 199.
- (17) Olivucci, M., Ed. *Computational Photochemistry*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005.
- (18) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancfort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1820.
- (19) Climent, T.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13584.
- (20) Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fulscher, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmelpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Stegmann, P. E. M.; Stalring, J.; Thorsteinsson, T.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.0; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, 2004.
- (21) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977.
- (22) Canuel, C.; Mons, M.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I.; Elhanine, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 074316.
- (23) Gustavsson, T.; Bányász, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Barone, V.; Improbato, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 607.
- (24) Lorentzon, J.; Fulscher, M. P.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9265.
- (25) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13238.
- (26) Nguyen, M. T.; Zhang, R.; Nam, P.-C.; Ceulemans, A. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6554.
- (27) Climent, T.; González-Luque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13584.
- (28) Serrano-Pérez, J. J.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *434*, 107.
- (29) Hare, P. M.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 435.
- (30) Nikogosyan, D. N.; Letokhov, L. S. *Riv. Nuovo Cimento Soc. Ital. Fis.* **1983**, *6*, 1.
- (31) Abouaf, R.; Pommier, J.; Dunet, H.; Quan, P.; Nam, P. C.; Nguyen, M. T. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 11668.

On the Intrinsic Population of the Lowest Triplet State of Thymine

Juan José Serrano-Pérez, Remedios González-Luque,
Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés*

*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València,
Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain*

Supporting Information

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Luis.Serrano@uv.es.

Additional computational details.

All calculations reported in the present contribution have been performed using the CASPT2//CASSCF protocol, in which geometry optimizations, including minima, surface crossings, and minimum energy paths (MEP) were carried out at the multiconfigurational CASSCF level, whereas electronic energy calculations used the second-order multiconfigurational perturbation approach, CASPT2.^{1,2,3,4} MEP optimizations employed different active spaces: CASSCF(10,11), CASSCF(12,9), and CASSCF(10,8) for MEPs on $^1(\pi\pi^*)$, $^1(n_o\pi^*)$, and $^3(\pi\pi^*)$, respectively. Whereas the full $\pi\pi^*$ active space comprises ten electrons in eight orbitals, three additional extra correlating π^* MOs, which had to be added to compute the MEP on $^1(\pi\pi^*)$ in order to balance dynamic correlation effects. The nature of the orbitals does not essentially change along the optimization process. The final CASPT2 calculations at each of the optimized structures used an active space comprising 14 electrons distributed in 10 orbitals. A more detailed discussion about the choice of the active space and its consequences can be found in our previous study on DNA pyrimidine nucleobases.⁵ The employed basis set was ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p]. The standard zeroth-order Hamiltonian was employed in the CASPT2 calculations, which include an imaginary level-shift correction of 0.2 au in order to avoid the presence of intruder states.⁶ All calculations used the MOLCAS-6.0 set of programs.⁷

The MEP has been built as steepest descendent paths in a procedure⁸ which is based on a modification of the projected constrained optimization (PCO) algorithm of Anglada and Bofill⁹ and follows the Müller-Brown approach.¹⁰ Each step requires the minimization of the PES on a hyperspherical cross section of the PES centered on the initial geometry and characterized by a predefined radius. The optimized structure is taken as the center of a new hypersphere of the same radius, and the procedure is iterated until the bottom of the energy surface is reached. Mass-weighted coordinates are used, therefore the MEP coordinate corresponds to the so-called Intrinsic Reaction Coordinate (IRC), measured in au, that is, bohr·(amu)^{1/2}. The full procedure is currently implemented in the MOLCAS-6.0 package⁷ and its technical description has been published elsewhere.⁸ As mentioned above, at each optimized point of the MEP, CASPT2//CASSCF(14,10) calculations were performed for the states of interest. The MEP search showed to be insensitive to different selections of the step length.

In this contribution conical intersection searches were performed using the restricted Lagrange multipliers technique as included in the MOLCAS-6.0 package⁷ in which the lowest-energy point was obtained under the restriction of degeneracy between the two considered states.⁸

From the calculated CASSCF transition dipole moments (TDM) and the CASPT2 excitation energies, the radiative lifetimes have been estimated by using the Strickler-Berg relationship,¹¹ as

S2

explained elsewhere.¹² The spin-orbit coupling (SOC) strength between selected states was computed within the AMFI framework obtaining as the length of the spin-orbit coupling vector with the algorithms implemented in the MOLCAS-6.0⁷ quantum-chemistry program, as described previously.¹³ A CASSCF wave function averaged over seven singlet and seven triplet states was used.

Table S11 compiles selected bond lengths in thymine at different optimized geometries. Figure S11 displays the evolution of the MEP from the singlet-triplet crossing (STC) (${}^3n_O\pi^*/\pi\pi^*$)_{STC} reaching the minimum (${}^3n_O\pi^*$)_{min}. Figure S12 includes the evolution of the MEP from the conical intersection (${}^3n_O\pi^*/\pi\pi^*$)_{CI}, practically coincident with the minimum (${}^3n_O\pi^*$)_{min}, to the minimum (${}^3\pi\pi^*$)_{min}. Figure S13 displays the evolution of the MEP from the STC ($gs/{}^3\pi\pi^*$)_{STC} reaching the minimum (${}^3\pi\pi^*$)_{min}. In all cases seven singlet and seven triplet states were included in the calculations, that were performed at the CASPT2//CASSCF(14,10) level. Figure S14 compiles the structures of the optimized singular points reported in the present research.

Reference 7 of this Supporting Information corresponds to the complete Ref. 20 of the paper.

References

- (1) Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
- (2) Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülischer, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219.
- (3) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Fülischer, M. P.; Roos, B. O. In *Recent Advances in Multireference Methods*, Hirao, H., Ed., World Scientific, Singapore, 1999.
- (4) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. In: *Computational Photochemistry*; Olivucci, M. Ed; Elsevier, Amsterdam, **2005**
- (5) Merchán, M.; González-Luque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471.
- (6) Forsberg, J.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196.
- (7) Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülischer, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmelpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Stålring, J.; Thorsteinsson, T.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.0, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, **2004**.
- (8) De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comp.* **2005**, *1*, 1029.
- (9) Anglada, J. M.; Bofill, J. M. *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 992.
- (10) Müller, K.; Brown, L. D. *Theor. Chim. Acta.* **1979**, *53*, 75.
- (11) Strickler, S. J.; Berg, R. A. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 814.
- (12) Rubio-Pons, O.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 9664-9676.
- (13) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Robb, M. A.; Blancafort, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1820.

Table S11. Selected internal coordinates at the singular points computed for thymine.

parameters ^a	gs ^b	¹ (π, π^*) ^b	¹ (n_O, π^*) ^c	CI(S) ^d	³ (π, π^*) ^b	³ (n_O, π^*) ^c	CI(T) ^e	STC ^f
R(N ₁ -C ₂)	1.370	1.413	1.369	1.445	1.382	1.369	1.369	1.384
R(C ₂ -N ₃)	1.378	1.338	1.378	1.365	1.384	1.387	1.387	1.388
R(N ₃ -C ₄)	1.387	1.430	1.396	1.449	1.396	1.399	1.399	1.393
R(C ₄ -C ₅)	1.476	1.399	1.367	1.474	1.455	1.381	1.381	1.497
R(C ₅ -C ₆)	1.346	1.502	1.406	1.448	1.513	1.393	1.393	1.509
R(C ₆ -C ₇)	1.503	1.500	1.510	1.558	1.494	1.510	1.509	1.514
R(C ₇ -N ₁)	1.386	1.334	1.404	1.311	1.397	1.401	1.400	1.402
R(C ₇ -O ₂)	1.198	1.206	1.200	1.190	1.197	1.199	1.199	1.194
R(C ₁ -O ₁)	1.201	1.237	1.365	1.194	1.206	1.361	1.360	1.199
<(N ₁ -C ₂ -N ₃)	114.1	115.2	114.7	114.0	115.0	115.0	115.0	114.8
<(C ₂ -N ₃ -C ₄)	127.2	124.9	122.2	123.8	124.5	120.7	120.7	126.7
<(N ₃ -C ₄ -C ₅)	115.4	117.7	123.0	112.3	115.1	122.2	122.2	112.8
<(C ₄ -C ₅ -C ₆)	117.6	119.3	116.1	110.4	115.9	116.3	116.3	109.7
<(C ₅ -C ₆ -C ₇)	122.6	115.5	119.2	119.0	111.9	119.7	119.7	109.2
<(C ₆ -C ₇ -N ₁)	118.4	120.5	121.9	105.9	121.6	121.6	121.6	114.7
<(C ₆ -N ₁ -C ₂)	123.3	127.5	124.8	117.3	120.9	124.3	124.3	118.5
<(O ₂ -C ₇ -N ₁)	123.2	117.3	123.3	118.7	122.7	123.2	123.2	123.0
<(O ₁ -C ₁ -N ₃)	120.5	115.0	112.5	116.7	120.3	112.0	111.9	121.3
<(C ₂ -C ₅ -C ₆)	179.0	179.8	179.8	118.6	166.5	179.0	178.9	137.1

^aBonds lengths (R) in Å and angles (<) in degrees. See Figure 1 for atom labelling. ^bCASSCF(10,8)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level. ^cCASSCF(12,9)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level. ^dCI(g^s-¹(π, π^*))-CASSCF(10,11)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level. ^eCI(³(n_O, π^*)-³(π, π^*))-CASSCF(12,9)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level. ^fSTC(g^s-³(π, π^*))-CASSCF(10,8)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level.

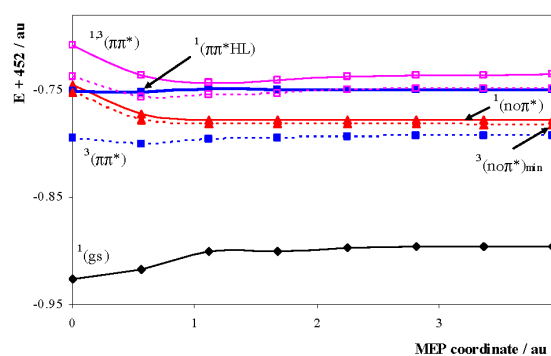


Figure S11. Evolution in thymine of the minimum energy path (MEP) from the singlet-triplet crossing $(^1n_O\pi^*/\pi\pi^*)_{STC}$ reaching the minimum $(^3n_O\pi^*)_{min}$. CASPT2//CASSCF(14,10)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level.

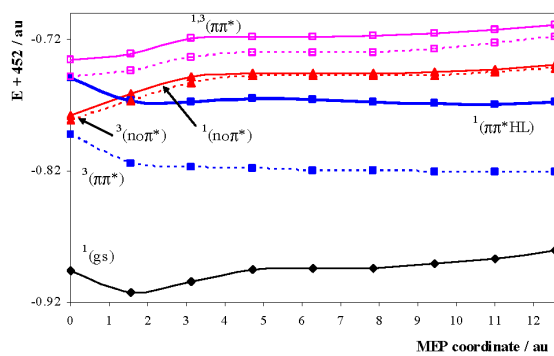


Figure SI2. Evolution in thymine of the minimum energy path (MEP) along the $^3(\pi\pi^*)$ state from the conical intersection ($^3\text{no}\pi^3\pi\pi^*$)_{CI} to the minimum ($^3\pi\pi^*$)_{min}. CASPT2//CASSCF(14,10)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] level of calculation.

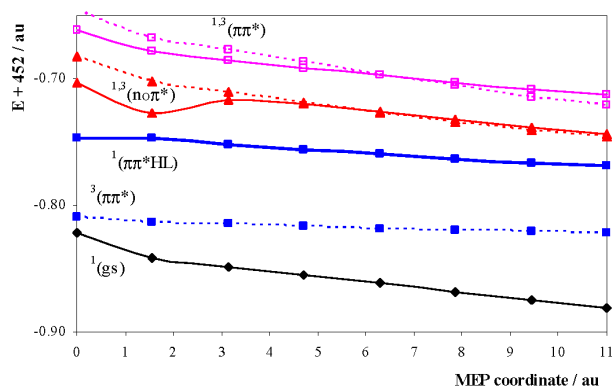


Figure SI3. Evolution in thymine of the minimum energy path (MEP) along the $^3(\pi\pi^*)$ state from the singlet-triplet crossing $(gs^3\pi\pi^*)_{STC}$ reaching the minimum $^3(\pi\pi^*)_{min}$. Level of calculation: CASPT2//CASSCF(14,10)/ANO-S C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p].

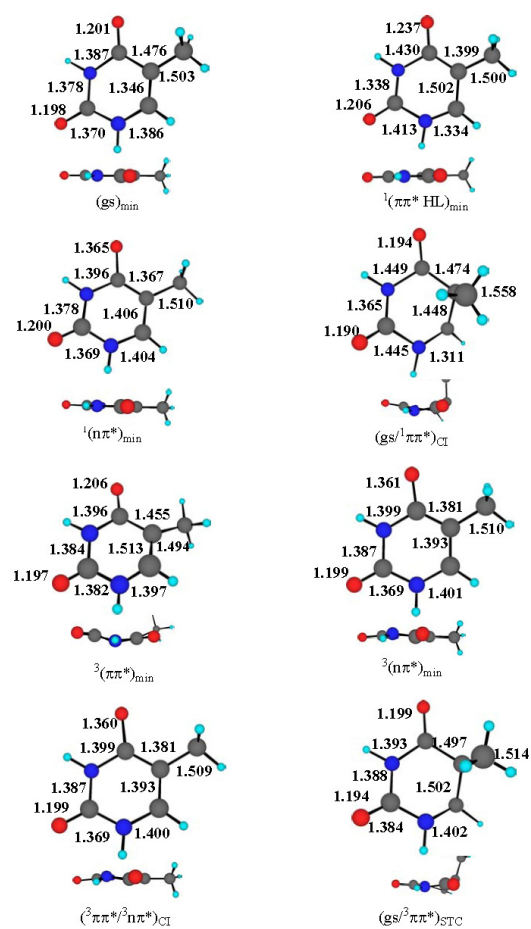


Figure S14. Structures in the singular points computed for thymine.

Available online at www.sciencedirect.com

Chemical Physics 347 (2008) 422–435

Chemical
Physicswww.elsevier.com/locate/chemphys

Photosensitization and phototherapy with furocoumarins: A quantum-chemical study

Juan José Serrano-Pérez, Luis Serrano-Andrés, Manuela Merchán *

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received 11 July 2007; accepted 14 October 2007

Available online 22 October 2007

This article is dedicated to Prof. Wolfgang Domeke on the occasion of his 60th birthday. His work has been for us a splendid source of inspiration.

Abstract

The effect of electromagnetic radiation on biological objects extends from heating to complex photochemistry, and includes DNA alteration, that properly modified in damaged cells may entail beneficial effects. In this regard, psoralen + UV-A (PUVA) therapy, in which furocoumarins, psoralen-like chromophores, are used as photosensitizers and photoreactants with DNA bases, is one of the most promising strategies against a plethora of diseases. Understanding the underlying photochemical mechanisms is crucial to design effective drugs without undesired side effects. We have undertaken a quantum-mechanical study on the photophysics and photochemistry of furocoumarins, analyzing firstly the most efficient way in which the lowest excited triplet state, as protagonist of the photosensitizing action, is populated from the initially promoted singlet states, and secondly the basics of the formation of furocoumarin–DNA photoadducts.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Photochemistry; Phototherapy; Furocoumarins; Intersystem crossing; Spin orbit coupling

1. Introduction

It was already in the XVI century that physicians started to recognize the role that Physics and Chemistry could have in the medical practice, and it is undoubtedly that modern Medicine heavily relies on a legion of physical and chemical techniques. Among the oldest but less explored procedures, the field of phototherapy is presently undergoing a fast and sustained growing [1]. The practice consists in the employment of electromagnetic radiation coupled with a drug, the photosensitizer. The absorption of energy by this chromophore triggers a chain of photochemical events with therapeutic consequences. The benefits of sunlight on human health are known from antiquity. Just to recall that Herodotus and Hippocrates

pleaded for the use of sunlight to treat several diseases [1]. Niels Ryberg Finsen, known as the father of phototherapy, was the first who studied the technique scientifically, and he was awarded with the Nobel Prize on Medicine and Physiology in 1903 “in recognition of his contribution to the treatment of diseases, especially lupus vulgaris, with concentrated light radiation, whereby he has opened a new avenue for medical science” [2]. Since then a plethora of diseases has been successfully treated by phototherapeutic procedures: psoriasis, vitiligo, jaundice, rickets, and some sorts of cancer. Nowadays, phototherapy is indeed considered a major therapeutic strategy for health care in dermatology and has dramatically influenced the treatment of many skin disorders. Not only does therapeutic photomedicine pursue the suppression of ongoing deterioration processes, but also tries to prevent, modulate or abrogate the pathogenic mechanisms causing the problem [3].

There are different phototherapeutic techniques [1]. Sometimes the chromophore is already present in the tissue

* Corresponding author. Fax: +34 963543274.

E-mail address: Manuela.Merchan@uv.es (M. Merchán).

and the phototherapy takes place naturally, e.g., the cure of neonatal hyperbilirubinemia or the photoregeneration of vitamin D, and this area is coined as phototherapy. Differently, in the treatment named photochemotherapy, a drug is administered to act as a photosensitizer, a substance which is harmless in the dark but active upon absorption of radiation, typically ultraviolet, visible, or near infrared light. Two basic photochemical mechanisms are responsible for the phototherapeutic activity. The photosensitizer can directly react with DNA bases forming stable adducts which interfere the genetic activity [4–7]. On the other hand, the photosensitizer can transfer its excess energy to molecular oxygen available in the cellular environment, generating highly reactive singlet oxygen able to damage target tissues. This type of protocol is known as photodynamic therapy (PDT) [7–9]. A commonly accepted classification of the photochemotherapeutic reactions comprises three types of mechanisms. Types I and II correspond to oxygen-dependent pathways for PDT activity, taking place when light, in the presence of a photosensitizer and molecular oxygen, induces a chemical reaction in a substrate [7,8,10,11]. In type I reactions, the photoactive compound in its triplet state promotes an electron transfer reaction to molecular oxygen, leading to the formation of O_2 , $OH\cdot$, or HO_2 radicals. Type II reactions correspond to energy transfers from the triplet state of the photosensitizer to dioxygen, generating the reactive $^1\Delta_g$ excited state [8]. All these intermediate species later interact with components of the cell membrane and may lead to cellular damage that eventually contributes to skin photosensitization, mutation, error-prone DNA repair, and carcinogenesis [7,10,12,13]. In contrast to the previous mechanisms, oxygen-independent type III reactions seem to lead to direct photobinding between the photosensitizer and the DNA base monomers [14,15].

Furocoumarins (also named psoralens) are a class of heterocyclic compounds with a known phototherapeutic activity that takes place via the three described mechanisms [16]. These systems have been found to possess mutagenic properties when applied in conjunction with near UV-A light (320–400 nm) exposure [5–7,17–21]. The treatment coined psoralen + UV-A (PUVA) therapy has been specifically designed to treat different skin disorders such as psoriasis and vitiligo [23–26]. The use of plants rich in furocoumarins constitutes a therapy known since many centuries ago that was employed in ancient India and Egypt to treat leukoderma and vitiligo [19]. In 1834, Kalbruner isolated 5-methoxypsoralen (5-MOP) from bergamot oil, and Abdel Monem El Mofty actually made a breakthrough employing 8-methoxypsoralen (8-MOP), which had just been isolated by Fahmy, to treat vitiligo in the 1940s. In 1953, Lerner, Denton and Fitzpatrick, and later Parrish [24], published studies of the treatment of both psoriasis and vitiligo with 8-MOP coupled with UV-A radiation. In the 1950s, 8-MOP was made available commercially, followed later by the synthetic compound 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP) [6].

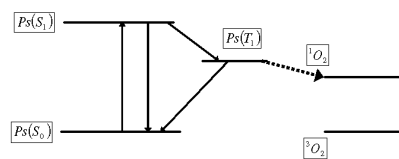


Fig. 1. Oxygen-dependent PUVA mechanism.

Initially, the interaction of psoralens with DNA was thought to be responsible for the beneficial effects of PUVA therapy. The oxygen-dependent mechanism (the photodynamic action, see Fig. 1) was discovered later, and involves an energy transfer between the furocoumarin (in its lowest triplet excited state) and molecular oxygen (in its triplet ground state $^3\Sigma_g^-$) present in the cellular environment ready to generate singlet oxygen $^1O_2(^1\Delta_g)$, which is a strong electrophilic species that reacts with some components of the cellular membrane causing cell death by apoptosis [27].

It is generally assumed that the oxygen-independent mechanism of PUVA therapy implies a (2+2)-photocycloaddition of psoralen in its lowest triplet state and a pyrimidine DNA base monomer [1]. The photoreactive process seems to take place in three phases. The first step occurs in the dark: the furocoumarin is inserted between adjacent pyrimidine base pairs in the DNA duplex, forming a complex which is stabilized by stacking interactions. In a second step, the absorption of one photon by psoralen induces the formation of monoadducts with the neighboring pyrimidine via interaction of the respective carbon–carbon double bonds that both compounds have. Two different monoadducts, pyrone (PMA) and furan (FMA) types, can then be formed by interaction of the C–C double bond of the pyrimidine base with the C₃–C₄ double bond of the pyrone ring and the C₄–C₅ double bond of the furan ring in psoralens, respectively (see Figs. 2 and 3). In this regard, thymine has been established as the most favorable base to photoreact with furocoumarins, in accordance with its predominance in the formation of cyclobutane dimers (T⟨T) in UV-irradiated DNA [28,29]. Furthermore, on irradiation of aqueous solutions containing purine and pyrimidine bases and psoralen, modifications in the fluorescence spectra were obtained only with the pyrimidine bases [30]. In a third step, the monoadduct may absorb another photon, inducing the other photoreactive C–C double bond to interact with a thymine on the opposite DNA strand. Therefore, a diadduct that cross-links the DNA helix is produced. It has been shown that furocoumarins are able to form molecular complexes when added to an aqueous solution of nucleic acids [4] and the formation of monoadducts and diadducts has been analyzed by studying the elasticity of a psoralen–DNA mixture after irradiation. Photoadducts between furocoumarins and thymine have been also characterized with X-ray [31] and 1H NMR [32,33]. The poly[*da-dT*]·poly [*da-dT*] sequence region

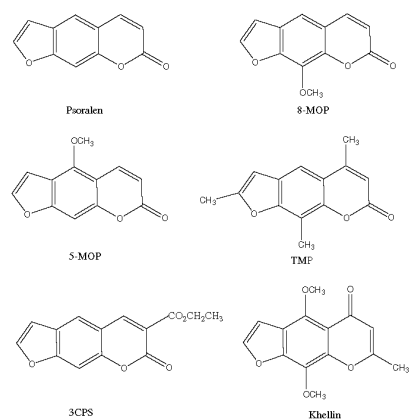


Fig. 3. Structure of some relevant furocoumarins: psoralen, 5-MOP (5-methoxypsoralen), 8-MOP (8-methoxypsoralen), TMP (4,5',8-trimethoxypsoralen), 3-CPS (3-carbethoxypsoralen), and khellin.

tively [38–40]. Several studies support, on the other hand, that FMA monoadducts, after irradiation with UV light at 253.7 nm (4.89 eV), decompose yielding the original products [38]. Other studies have reported that adduct distribution in DNA samples differs depending on whether 341.5 nm (3.63 eV) or 397.9 nm (3.12 eV) light was used: In the former case the primary product is the diadduct whereas in the latter it is a furan-side monoadduct, although a small but definite number of diadducts were also found [41]. Monoadducts and diadducts can be split into original monomers under irradiation with short wavelength UV light [21,42]. Furocoumarins also display effects over cellular membrane components by means of C₄-photocycloaddition between the furocoumarin and the unsaturated fatty acids [13,16].

Regarding the clinical use of furocoumarins (see Fig. 3), 8-MOP is used as an oral photoactive chemical for the treatment of vitiligo [19] and psoriasis [24]. 5-MOP has been introduced as an effective oral drug in the photochemotherapy of psoriasis because, in comparison to 8-MOP, shows less acute side effects and is slightly better tolerated by patients. On the other hand, khellin has been found to be useful in the photochemotherapeutic treatment of vitiligo [7]. This compound does not show long-term side effects and phototoxic skin erythema reactions and seems to form mainly monoadducts. With respect to TMP, it is used in the treatment of both psoriasis and vitiligo [43]. And last but not least, 3-CPS (3-carbethoxypsoralen) has been tested in the photochemotherapy of psoriasis [44]. Apparently, it gives rise only to monoadducts with DNA, being considered as a non-carcinogenic alternative

to 8-MOP. In summary: (i) all the mentioned furocoumarins produce monoadducts; (ii) only psoralen and TMP show a very strong ability to build diadducts; (iii) 5-MOP and 8-MOP do not have such a pronounced trend; and finally, (iv) diadducts are not obtained from 3-CPS and khellin [10].

It is thought that illuminating the sample with UV-A (320–400 nm) or UV-B (312–320 nm) light leads to monoadducts and diadducts or just monoadducts, respectively, because the latter is capable of breaking the inter-strand cross-links [42]. Formation of cross-links was thought to be extremely relevant for the therapeutic effectiveness, although it is also known that diadducts cause adverse side effects such as carcinogenesis, mutagenesis, and immunosuppression. Only furocoumarins with bifunctional groups such as psoralen can form diadducts and may produce undesired lethal and mutagenic consequences. Certain monofunctional furocoumarins have been proved to yield as efficient phototherapy as bifunctional furocoumarins, suggesting that the induction of lesions in DNA cannot be considered as the only mechanism responsible for the phototherapeutic effects and most probably a PDT process takes place as well. The detailed characterization of the mechanisms is under intense research.

Hence, we can see how important furocoumarins are in modern Medicine. The state-of-the-art in synthesis of psoralen and analogs was reviewed in the early 1990s [45]. An intense experimental research is emerging in recent years. Understanding the photophysical properties of furocoumarins represents a crucial step in order to rationalize the corresponding phototherapeutic mechanisms.

Spectroscopic techniques gives important information about the absorption and emission processes in furocoumarins. The low-lying region of the absorption spectrum of psoralen, the reference compound, has two main bands: A weak and structured band is observed ranging from 360 to 270 nm (3.44–4.77 eV) and a sharp feature appears at 240 nm (5.16 eV) in aqueous solution and ethanol [46,47]. Both fluorescence and phosphorescence emissions have been detected for psoralen in ethanol (77 K) at 409 nm (3.03 eV) and 456 nm (2.72 eV, T_0), respectively. The phosphorescence/fluorescence quantum yield ratio, 7.1, indicates the effectiveness of an intersystem crossing (ISC) mechanism [48]. It has been proposed that photoreactivity of furocoumarins proceeds through the triplet state in all types of photosensitization, that is, PDT and PUVA therapies [7]. It can be therefore expected that by increasing the triplet formation quantum yield, the phototherapeutic action will be enhanced.

From the photochemical standpoint, an effective photosensitizer should possess, in principle, certain desirable key features: it must be harmless in the dark; in order to treat deep tissues, it should be activated by long wavelength light, because the longer wavelength radiation the photosensitizer absorbs, the deeper the energy penetrates in the tissue; its triplet state must be efficiently populated from the excited singlet state and effective in transferring the

energy to molecular oxygen in the PDT mechanism, and finally, it should form monoadducts and perhaps not diadducts with DNA to avoid mutagenic side effects. Additionally, a good photosensitizer should be amphiphilic to favor the injected administration of the drug, easily synthesized or isolated from natural sources, be deactivated soon after the treatment, and quickly eliminated from the body [1].

We are currently undertaken a project to study, using quantum-chemical methods, the photophysics and photochemistry of furocoumarins and related compounds in order to rationalize the basic features responsible for their phototherapeutic properties. In the present paper, we start by considering the photophysical properties of parent psoralen (7-H-furo[3,2-g[1]-benzopyran-2-one, see Fig. 2). The low-lying excited states of the molecule have been computed within the framework of multiconfigurational second-order perturbation theory, in particular, with the CASPT2 method. Absorption, fluorescence, and phosphorescence spectra have been characterized, together with other spectroscopic parameters required to understand the photophysics of the compound: related oscillator strengths, dipole moments, emission radiative lifetimes, and spin-orbit couplings [49]. Knowledge on theoretical grounds about these properties in psoralen shall hopefully guide future research on the photochemical mechanisms of phototherapeutic activity of furocoumarins and derivatives. In the light of the present results, previous experimental [43,34,46–48,50–55] and theoretical [14,56–61] findings shall also be considered. We also study here the population mechanism of the state which is the protagonist of the photosensitizing effect, T_1 [62]. Determination of the photophysical properties of several furocoumarins and an analysis on the formation process of psoralen–thymine monoadducts is finally addressed.

2. Methods and computational details

Using the CASSCF multiconfigurational wave functions as reference, the second-order perturbation theory through the CASPT2 method was employed to include dynamic correlation energy in the calculation of the electronic excited states. The CASPT2 method calculates the first-order wave function and the energy up to second order and has repeatedly proved its accuracy [63–68]. The imaginary level-shift technique was employed in order to pre-

vent the effect of intruder states. A shift parameter of 0.3 au was selected by checking the stability in the excitation energies [69,70]. The molecular symmetry was constrained to the C_s point group. For geometry optimizations, however, relaxing the symmetry constraints had no effect on the final structure, which preferred in all the cases to maintain planarity. An atomic natural orbital (ANO-L)-type basis set [71,72], contracted to C,O [4s3p1d]/H [2s1p] [73–76] was used throughout except in the calculation of the lowest Rydberg state, for which the basis set was enlarged with an additional s diffuse function placed in the charge centroid of the cation and built as reported elsewhere [65]. The carbon and oxygen 1s core electrons were kept frozen in the second-order perturbation step. Geometries were obtained by computing analytical gradients at the RASSCF level of calculation for the ground and the lowest singlet and triplet excited states. In the optimization of the A' states an active space of 14a'' active orbitals and 16 electrons, i.e., the full π system of the molecule, has been employed and up to quadruple excitations were considered (eight orbitals in RAS1 space and six orbitals in RAS3 space). Within the irreducible representations (a', a'') of the C_s group this active space can be labelled as (0,14). An additional oxygen lone-pair orbital was included in the active space (1,14) in order to optimize the lowest A'' excited state. In all the remaining calculations, CASSCF wave functions were generated as state-average (SA) CASSCF roots of a given symmetry. Based on preliminary RASSCF calculations and using the criterion of natural orbitals occupation [77–79], the CASSCF active space was reduced to include 12 active electrons and 12 active orbitals (RAS2 0,12) for A' roots and 14 active electrons and 13 active orbitals (RAS2 1,12) for A'' roots. The number of selected SA-CASSCF roots was 11, 4, 7, and 3 for $^1A'$, $^3A'$, $^1A''$, $^3A''$ symmetries, respectively. The number of roots employed was dictated to include the states below the lowest singlet Rydberg state, and the low-lying triplet states in the region of photochemical interest. A detailed account of employed active spaces for psoralen derivatives can be found in Table 1. Minimum energy paths (MEPs) have been computed, as described elsewhere [80], as steepest-descent paths in which each of the obtained points corresponds to a constrained geometry optimization within the boundaries of an hypersphere of predetermined radius. The CAS state interaction method [81] (CASSI) was used

Table 1
Active orbitals (a', a'') and electrons ($N \cdot e^-$) comprising the active space of the studied psoralen derivatives

	RASSCF (A')			RASSCF (A'')			CASSCF (A', A'')	
	RAS1	RAS3	$N \cdot e^-$	RAS1	RAS3	$N \cdot e^-$	RAS2	$N \cdot e^-$
Psoralen	(0, 8)	(0, 6)	16	(1, 8)	(0, 8)	18	(1, 12)	14
8-MOP	(0, 9)	(0, 6)	18	(1, 9)	(0, 6)	20	(1, 11)	12
TMP	(0, 8)	(0, 6)	16	(1, 8)	(0, 6)	18	(1, 10)	14
Khellin	(0, 10)	(0, 6)	20	(1, 10)	(0, 6)	22	(1, 9)	12
3-CPS	(0, 8)	(0, 7)	16	(1, 8)	(0, 7)	18	(1, 9)	12

to compute transition properties, including the spin–orbit coupling (SOC) elements between selected states [82,83]. All calculations in the present paper were performed with the MOLCAS-6.0 quantum chemistry software [84,85].

3. Results and discussion

3.1. Absorption spectrum

Our final goal is to understand the photophysical properties of psoralen in order to relate the obtained information to its biological activity. At the Franck–Condon (FC) geometry the lowest singlet excited states $2^1A'$ ($\pi\pi^*$), $1^1A''$ ($n\pi^*$), and $3^1A'$ ($\pi\pi^*$) lie at 3.98, 5.01, and 5.03 eV, respectively (see Table 2). Whereas the transition to the $\pi\pi^*$ state is predicted with negligible intensity, the $\pi\pi^*$ states have related oscillator strengths of 0.027 and 0.107. Unlike other states, the $3^1A'$ state has a high dipole moment, 8.70 D, differing by more than 2.5 D from that of the ground state, and therefore the associated transition is expected to undergo a red shift (bathochromic effect) in polar environments. The recorded absorption spectra in different solvents, from cyclohexane [52] to water [47], display a weak and structured band ranging from 360 to 270 nm (3.44–4.77 eV). Depending on the band resolution and the environment, one or two maxima near 330 and 280 nm (3.76 and 4.43 eV, respectively) have been described. The present computed results suggest that this set of features can be better assigned just to the $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) transition, with the weak $n\pi^*$ band lying beneath. In that case, the observed band profile should be attributed to vibrational structure. This explanation is not unlikely, considering that a noticeable rearrangement of the molecular bond distances occurs at the $2^1A'$ minimum. Further-

more, the structure of the band disappears in different media, even for seleno- and thyo-psoralen derivatives [47].

Although less relevant regarding the phototherapeutic properties, we will describe the higher-energy region of the absorption spectrum. Transitions to the $4^1A'$ (5.22 eV) and $5^1A'$ (5.30 eV) ($\pi\pi^*$) excited states have oscillator strengths of 0.064 and 0.331, respectively. The recorded spectra show a single and sharp band peaking near 248 nm (5.00 eV) in cyclohexane [52] and 240 nm (5.16 eV) in ethanol and water [46,47]. In principle, the observed feature can be assigned to transition to the $3^1A'$ state at 5.03 eV. Moreover, taking into account our computed results, an additional band with higher intensity can be expected at higher energies (5.30 eV). The measured band is probably a combination of both transitions. Between 5.7 and 6.2 eV four medium to intense transitions to $1^1A'$ ($\pi\pi^*$) excited states are predicted. The beginning of the Rydberg series has been determined at 6.32 eV. Above this energy only weak transitions of valence $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ character have been obtained up to 8.0 eV. Two intense bands peaking at 210 nm (5.90 eV) and 200 nm (6.20 eV) have been reported for psoralen in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol [52]. They clearly correspond to the transitions to our computed $7^1A'$ and $8^1A'$ $\pi\pi^*$ states, representing the most intense bands in that part of the energy region of the spectrum. Song et al. [46] reported that the two lowest-energy absorption bands in psoralen, angelicin, and methylpsoralens are polarized along the long axis and nearly parallel, with angles differing less than 20° . Transition dipole moment (TDM) directions indicate that the three lowest $\pi\pi^*$ features have nearly parallel polarizations, that is, they are aligned with the long axis of the molecule, while transition to the $5^1A'$ state has essentially perpendicular polarization. Regarding the vertical excitations to the triplet states,

Table 2
Computed excitation energies ΔE (eV), oscillator strengths f , dipole moments μ (D), and dipole moments μ_{dir} ($^\circ$), and transition dipole moment, TDM_{dir} ($^\circ$), directions for the low-lying electronic transitions of psoralen

State	ΔE CASSCF	ΔE CASPT2	f	μ	μ_{dir}	TDM_{dir}
$1^1A'$				6.25	128	
$2^1A'$ ($\pi\pi^*$)	4.52	3.98	0.027	6.50	132	4
$1^1A''$ ($n\pi^*$)	4.22	5.01	0.000	2.07	130	
$3^1A'$ ($\pi\pi^*$)	6.33	5.03	0.107	8.72	132	5
$4^1A'$ ($\pi\pi^*$)	6.68	5.22	0.064	7.07	-23	-10
$5^1A'$ ($\pi\pi^*$)	6.73	5.30	0.331	7.07	-37	102
$6^1A'$ ($\pi\pi^*$)	6.95	5.70	0.091	7.37	-37	30
$7^1A'$ ($\pi\pi^*$)	7.21	5.81	0.321	6.58	-34	127
$8^1A'$ ($\pi\pi^*$)	7.30	6.17	0.287	6.56	-42	4
$9^1A'$ ($\pi\pi^*$)	7.57	6.24	0.168	4.25	-35	-7
$10^1A'$ ($\pi\pi^*$)	7.72	6.28	0.012	6.29	-40	-7
$2^3A''$ ($\pi 3s$)	6.39	6.32	0.000	0.11	43	
$1^3A'$ ($\pi\pi^*$)	2.57	3.27		5.40	124	
$2^3A'$ ($\pi\pi^*$)	3.13	3.55		5.35	125	
$3^3A'$ ($\pi\pi^*$)	3.82	4.08		5.48	127	
$4^3A'$ ($\pi\pi^*$)	4.18	4.66		5.97	129	
$5^3A'$ ($\pi\pi^*$)	4.43	4.67		5.41	124	
$6^3A'$ ($\pi\pi^*$)	5.68	4.84		6.78	-31	
$1^3A''$ ($n\pi^*$)	4.07	4.85		2.15	111	

the $1^3A'$ $\pi\pi^*$ (T_1) state lies at 3.27 eV, near 0.7 eV below the $2^1A'$ (S_1) state. Three other $^3A'$ $\pi\pi^*$ states are next in energy at 3.55, 4.08, and 4.66 eV. The lowest triplet state of $\pi\pi^*$ character $^3A''$, has been located vertically at 4.85 eV, slightly below with respect to its corresponding singlet state. TD-DFT [14] and DFT/MRCI [60] calculations obtained similar results for the location of the triplet states, although, as it is typical for DFT-based methods [86], singlet–triplet transitions are underestimated (0.2–0.3 eV).

The nature of the low-lying transitions of each symmetry, which are those basically responsible for the photo-physical properties of psoralen, can be graphically described by computing the differential electron density plots as displayed in Fig. 4. Transition to the S_1 $\pi\pi^*$ state is mainly benzene-like, with the charge migration concentrated in the central benzenoid ring. On the contrary, that related to the T_1 $\pi\pi^*$ state has its major contributions in the pyrone ring, with high participation of the carbonyl oxygen and a shift in the density away from the pyrone ring C_3 – C_4 bond, which will be later discussed as an essential feature of the photophysics of the system. Also in Fig. 4, we find the expected differential density plots of the $n\pi^*$ states centered on the carbonyl group.

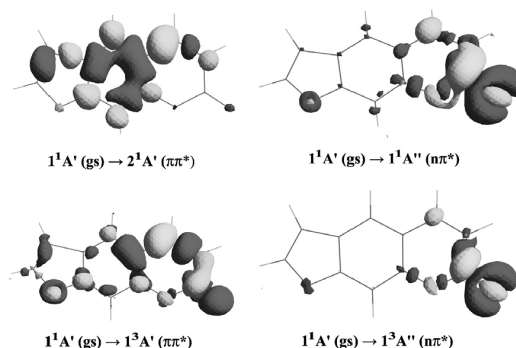


Fig. 4. Differential electron density for the main valence transitions in psoralen computed at the ground state optimized geometry. The electron density is shifted upon light-induced excitation from darker to lighter regions.

Table 3
Computed and experimental excitation energies (eV) and emission radiative lifetimes (τ_{rad}) relevant for the photophysics of psoralen

State	Theoretical (CASPT2)				Experimental ^a			
	E_{VA}	T_e	E_{VE}	τ_{rad}	Abs _{max}	T_0	Em _{max}	τ_{rad}
$2^1A'$ ($\pi\pi^*$)	3.98	3.59	3.45	74 ns	3.7–4.3	3.54	3.03	
$1^1A''$ ($n\pi^*$)	5.01	3.91	2.78	3 μ s				
$1^3A'$ ($\pi\pi^*$)	3.27	2.76	2.29	28 s		2.7	2.7	5–8 s
$1^3A''$ ($n\pi^*$)	4.85	3.84	2.79	9 ms				

E_{VA} : vertical absorption; T_e : adiabatic electronic band origin; E_{VE} : vertical emission; Abs_{max}: experimental absorption maximum; T_0 : experimental band origin, and Em_{max}: emission maximum.

^a Data in ethanol [46–48,50,51]. See other solvents [52].

3.2. Emission spectrum

Fluorescence has been reported for psoralen in polar solvents starting (T_0) at 350 nm (3.54 eV) with a maximum at 409 nm (3.03 eV) [48,50]. Phosphorescence has also been recorded in solution with band origin at 456 nm (2.72 eV) and a maximum between 460 and 490 nm (2.7–2.5 eV). Psoralens are characterized by weak fluorescence emission and strong phosphorescence bands. In particular, in psoralen, the fluorescence quantum yield was measured in ethanol, $\Phi_F = 0.019$ – 0.02 [50], while the phosphorescence quantum yield was reported to be $\Phi_P = 0.13$ [48]. The obtained ratio Φ_P/Φ_F is approximately 7.1. The total phosphorescence decay time (Φ_P) has been reported 1.1 s in glycerol–water and 0.66 s in ethanol [48]. With those data, the phosphorescence radiative lifetime $\tau_{\text{rad}} (= \tau_P \cdot \Phi_P)$ can be therefore expected between 8 and 5 s.

The low-lying singlet excited state $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) is responsible for the lowest-energy absorption and emission fluorescence bands (see Table 3). Vertically, at the ground-state geometry, the transition energy is computed to be 3.98 eV and, upon relaxation of the geometry, the band origin (T_e) decreases to 3.59 eV. This means that the range of

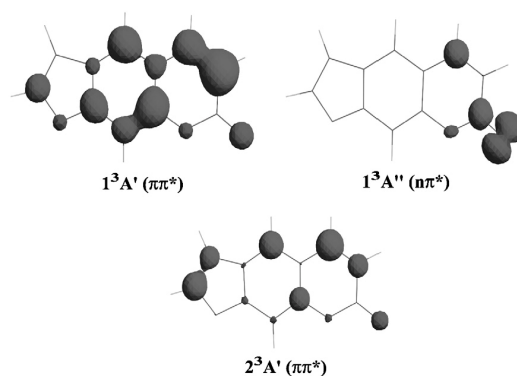


Fig. 5. Spin density for the low-lying triplet states in psoralen computed at the ground state optimized geometry.

absorption goes from 3.59 to 3.98 eV, well within the PUVA action. A similar relaxation is observed experimentally between the lowest-energy absorption band maximum and the band origin (see Ref. [49]). The structural changes of the computed equilibrium geometries for the ground (S_0) and the $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) (S_1) states affect the bond alternation of the system, mainly in the central ring (cf. Figs. 4 and 5), as expected from the differential charge density plots. By using the Strickler-Berg relationship [67,87,88] a fluorescence radiative lifetime of 74 ns is calculated for the S_1 state. The low-lying $1^1A''$ ($n\pi^*$) state (vertically S_2) becomes relaxed by more than 1 eV upon geometry optimization. The main variations are obtained in the pyrone ring (up to 0.13 Å) and in the C=O bond length (0.16 Å). Although the $1^1A''$ ($n\pi^*$) minimum belongs to the S_1 hypersurface, the final T_e value is about 0.3 eV higher in energy than the computed and measured band origin for $2^1A''$ ($\pi\pi^*$). Therefore the $n\pi^*$ state is not a plausible candidate for the fluorescence, which is better attributed to the $\pi\pi^*$ state. In principle, no experimental lifetimes have been reported, but from our computed radiative lifetimes, 74 ns for $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) and 3 μ s for $1^1A''$ ($n\pi^*$), and the experimental fluorescence quantum yield (0.016) [48], they can be deduced as 1.2 and 72 ns, respectively. Taking into account that the reported measurements were performed at time resolutions not lower than 2 ns [48], the lack of measured lifetimes points out to a preferred assignment to the $2^1A'$ S_1 state, with a faster fluorescence decay.

The $1^3A'$ ($\pi\pi^*$) state is clearly protagonist of the phosphorescence. The computed band origin at 2.76 eV perfectly relates to the observed value in solution at 2.72 eV [48]. The change in geometry calculated from the ground state minimum is here more pronounced, in particular, at the pyrone ring, whereas the relaxation energy is about 0.5 eV. The largest structural change is obtained for the

C_3 – C_4 bond of the pyrone ring, which enlarges by near 0.13 Å. The computed spin population, displayed in Fig. 5, is mainly placed on each of the carbon atoms forming the bond. In that way, psoralen becomes highly reactive in its lowest triplet state through its pyrone C_3 – C_4 bond. This finding is the cornerstone of the photophysics of psoralen, which has been repeatedly proposed to take place through a reactive triplet state, and it is also in agreement with the structure proposed for the phosphorescence band, mainly based on the intense vibrational progression corresponding to a C=C stretching mode in the pyrone moiety [48]. The computed phosphorescence radiative lifetime is 28 s, somewhat higher than those estimated experimentally from the quantum yield and the total relaxation time, 5 and 8 s [48,51]. For the $2^3A'$ ($\pi\pi^*$) state the spin population is placed mainly on the carbon atoms forming both C=C bonds, that is, C_3 – C_4 (pyrone) and C_4 – C_5 (furan).

3.3. Photophysics of psoralen

PUVA therapy initiates by irradiation with light of wavelengths of 320–400 nm (3.87–3.10 eV). In psoralen the only state which will be significantly populated by direct absorption is the spectroscopic $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) S_1 singlet state (hereafter S_2), which will evolve towards the minimum of S_1 , from which fluorescence will take place. The recorded phosphorescence/fluorescence emission ratio of 7.1 [48] emphasizes the role of the triplet states in the photophysics of the system. That is, the lowest-lying triplet $1^3A'$ ($\pi\pi^*$) T_1 (hereafter T_π) must be populated, either by direct absorption or by an effective intersystem crossing mechanism). The T_1 (T_π) state lies much lower in energy than the S_1 (S_2) state, both vertically (≈ 0.6 eV) and adiabatically (≈ 1.2 eV). Direct interaction between the singlet and triplet vertical excited states is unlikely, and therefore

another mechanism has to be found, involving most probably population of higher-energy triplet states and subsequently internal conversion towards T_1 . In order to populate a triplet state by direct absorption, the spin-orbit coupling between the initial ground state and any of the low-lying triplet states should be quite large. The qualitative El-Sayed rules [89,90] indicate that the spin-orbit coupling is large between states of $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ types and small between states of the same character. The spin-orbit matrix element between the ground S_0 and the low-lying $1^3A''$ ($n\pi^*$) state is computed to be 47 cm^{-1} , although the associated oscillator strength is still exceedingly small for the spin-forbidden transition. The high phosphorescence quantum yield requires, then, a much more efficient procedure to populate T_n , and therefore an intersystem crossing (ISC) must be involved in the photophysics. There are two necessary conditions for an effective ISC to take place: low energy gap and high spin-orbit coupling between a singlet and a triplet state. Thus, the nonradiative decay to a triplet state should occur along the relaxation pathway of S_n , starting from the Franck-Condon region, and in close vicinities of a singlet-triplet crossing. The vertical energy gaps S_n -triplet states are quite large, and the spin-orbit coupling (SOC) elements are small. For instance, the largest SOC, 3 cm^{-1} , occurs between $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) (S_n), that is, S_1 , and $1^3A''$ ($n\pi^*$) (T_n), vertically T_7 , which are separated by 0.87 eV . A value of 10 cm^{-1} was obtained at the DFT/MRCI level [60]. In order to fully understand the intersystem crossing mechanism responsible for the population of the reactive T_n state in psoralen, the relaxation pathways of the energy should be computed, searching for regions with near degeneracies or crossings between the S_1 and triplet states having also large SOCs.

3.4. Effective population mechanism of the lowest triplet state

Modern theoretical photophysics and photochemistry are based on the study of the potential energy hypersurfaces of the electronic states given that they are the playground in which physical and chemical phenomena take place. Indeed, every photophysical and photochemical process is produced owing to the relations between the hypersurfaces of the electronic states which contribute to that process. In this regard, the reaction pathway of a non-adiabatic photochemical reaction begins on the potential energy surface of the excited state (S_1) in the Franck-Condon region or at a spectroscopic minimum of the reactant and ends at the product minimum on the ground-state surface (S_0) [91,92]. Low-lying intersections (crossings) between the photochemically relevant excited state and the ground state occur with a previously unsuspected frequency. Thus, an organic molecule moving on an excited state potential energy surface has a high probability of entering a region of surface crossing during the excited state lifetime. Such crossings, conical intersections in the case of two singlet (or two triplet) surfaces, or singlet-triplet surface intersections, provide a very efficient funnel for

radiationless deactivation or for chemical transformation of the system [91,93,94].

Once the photophysics of psoralen, its absorption and emission properties, has been studied, we shall move toward a new aspect: How is the lowest excited triplet state T_n populated? The bright spectroscopic $2^1A'$ ($\pi\pi^*$) S_n singlet state in psoralen, lying vertically at 3.98 eV at the CASPT2 level, is populated by direct absorption. From this state we focus on how the most favorable transfer of energy to the triplet manifold can take place. As stated above, an efficient ISC process requires both small singlet-triplet (S - T) energy gaps and large spin-orbit coupling (SOC) between the populated S_n state and the corresponding triplet state. At the ground-state Franck-Condon (FC) geometry none of these conditions seems to be simultaneously fulfilled. Whereas the smallest computed S_n - T energy gaps relate to $\pi\pi^*$ -type triplet states ($1^3A'$ (T_n): -0.71 eV ; $2^3A'$ (T_2): -0.43 eV and $3^3A'$ (T_3): 0.10 eV), the SOC terms are always very small, in agreement with the qualitative El-Sayed rules and previous DFT/MRCI calculations [61]. On the contrary, the coupling is relatively larger between S_n and the lowest triplet $n\pi^*$ (T_n) state, 3 cm^{-1} (CASPT2) or 10 cm^{-1} (DFT/MRCI) [61], although the vertical S_n - T gap is too high, 0.87 eV . A promising possibility that should be explored is that the nonradiative decay to a triplet state could occur along the S_n relaxation pathway. A minimum energy path (MEP) on the S_n state hypersurface was built from the FC geometry. Along the initial steps of such a costly calculation the T_n ($n\pi^*$) state, while it remains with the largest SOC terms with S_n , increases its energy with respect to the latter state almost 0.2 eV . It was therefore concluded that no efficient ISC could be expected along the main relaxation path, and that the S_n state quickly reaches its own minimum, (S_n)_{MIN}, without crossing T_n or T_n . Fluorescence (F) band origin has been measured at 3.54 eV , and our computed result, 3.59 eV , relates the emission to the lowest ($\pi\pi^*$) singlet state minimum, (S_n)_{MIN}.

Another mechanism to deactivate the S_n state nonradiatively should be found. The most favorable ISC process can be expected to occur when S_n and T_n hypersurfaces cross. At the (S_n)_{MIN} geometry the T_n state lies above the S_n state at 1.24 eV . A preliminary linear interpolation in internal coordinates (LIC) from (S_n)_{MIN} to the minimum of the $1^1A''$, (S_n)_{MIN}, was performed to help us to find the appropriate singlet-triplet crossing [62]. The geometry closer to the crossing point was used as initial geometry to initiate a search at the CASSCF level for a singlet-triplet crossing (STC) between S_n and T_n , that is, (S_n/T_n)_X. As expected, the main change in geometry from the minimum of S_n to the optimized structures of S_n or T_n is related to the length of the C=O bond, much larger ($\approx 0.15\text{ \AA}$) for the $n\pi^*$ states. It is not surprising that the STC structure displays an intermediate value of 1.220 \AA [62]. The SOC term in STC is computed as 6.4 cm^{-1} . As displayed in Fig. 6, the barrier from (S_n)_{MIN} to (S_n/T_n)_X was computed 0.36 eV at the CASPT2 level, and represents the excess

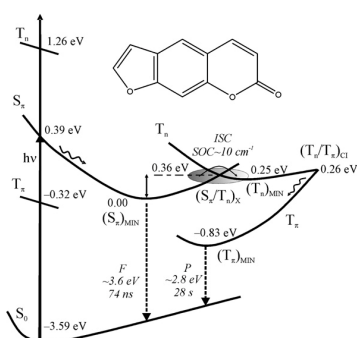


Fig. 6. Scheme of the gas-phase photochemistry of psoralen based on quantum-chemical CASPT2 calculations. Energies are referred to $(S_0)_{\text{MIN}}$.

energy required for the ISC process to take place. Once the T_1 state is efficiently populated through a favorable ISC mechanism, it will quickly evolve towards the nearby energy minimum, $(T_1)_{\text{MIN}}$, placed 0.11 eV below $(S_1/T_1)_X$. As can be seen in Fig. 6, at those geometries T_1 is the second-energy excited triplet state, and can be expected that the energy follows a pathway for favorable internal conversion (IC) toward the low-lying T_2 state. Actually, we have found a conical intersection $(T_1/T_2)_{\text{CI}}$ placed isoenergetic with $(T_1)_{\text{MIN}}$. An efficient IC will therefore take place transferring the population to T_2 , which will subsequently evolve to its own minimum, $(T_2)_{\text{MIN}}$, from where phosphorescence (P) may take place. The computed adiabatic emission, 2.76 eV, is in good agreement with the measured value of 2.7 eV (see Table 3). The C=O bond length undergoes the most important change, enlarging from 1.346 Å at $(T_1)_{\text{MIN}}$ to 1.372 Å at the conical intersection $(T_1/T_2)_{\text{CI}}$, and becoming much shorter, 1.198 Å, at $(T_2)_{\text{MIN}}$, in accordance with the $\pi\pi^*$ or $n\pi^*$ nature of the excited states.

Consequences of breaking the planarity of the molecule were explored at different levels, but geometry optimizations always led to planar minima for the different states. The relevance of out-of-plane displacements for the relaxation of the S_1 state has been emphasized recently [61], together with the enhancement of the SOC terms between low-lying S_1 and T_1 states by vibronic coupling effects involving out-of-plane modes, as an alternative mechanism for efficient ISC [95]. With information at hand, both mechanisms have to be viewed as competitive. Taking into account that $n\pi^*$ states tend to destabilize in polar solvents [60], the (T_1) -mediated mechanism here proposed will surely decrease its importance in polar media, remaining a plausible candidate for the efficient population of the low-lying T_2 triplet state in the gas phase. Further work will be focused on the comparison of barrier heights and

ISC efficiency at selected structures in order to determine if one or the other mechanism are prevalent or competitive in furocoumarin photochemistry.

3.5. Electronic state structure of psoralen derivatives

A parallel study has been performed for 8-MOP, khellin, TMP, and 3-CPS. Since the same computational strategy as for the photophysics of psoralen has been used, the results for the considered psoralen derivatives are directly comparable to those of the parent molecule. Tables 4 and 5 summarize the most relevant findings related to excited states energies and transition properties, as well as the main structural parameters computed for the different states, in particular the length of the C=C double bonds centered on the furan ($d(\text{C}=\text{C})_F$) and pyrone ($d(\text{C}=\text{C})_P$) moieties. As compared to psoralen, the computed transition energies for the derivatives slightly decrease. It is relevant in particular that in khellin the S_1 and T_1 states become very close in energy, which may enhance the efficiency of the ISC mechanism proposed in psoralen, although too large radiative lifetimes are obtained. More detailed mechanistic analysis should be performed to check the reliability in that case of the Strickler–Berg relationship, which might be invalidated if some state crossing is too close to the minima. Interestingly, in 8-MOP, TMP, and khellin the phosphorescence radiative lifetime increases with respect to psoralen, pointing out to a more reactive triplet state in those systems. In addition, it is worth mentioning that, as in psoralen, the spin population in the T_2 state is mainly located on the carbon atoms of the C=C double bond of the pyrone moiety in 8-MOP, TMP, and 3-CPS, unlike in khellin, where it is located in the C=C double bond of the furan ring. For khellin, according to the different structure of the six-membered ring, the pyrone and furan double bonds become shorter (1.333 Å) and larger (1.444 Å) in T_2 , respectively, making the system prone to form, unlike in the other compounds, furan monoadducts (cf Table 5). In summary, the initial study of the photophysics of psoralen derivatives points out toward 8-MOP, TMP, and khellin as more efficient sources of triplet-activated phototherapy than psoralen itself, a conclusion that seems to correlate with the experimental evidence. In all the studied systems except khellin, pyrone monoadducts are expected to be formed preferably. Ongoing research on the nonadiabatic photochemistry of the compounds is being performed in order to get further insight into additional aspects of the problem.

3.6. Monoadducts psoralen–thymine

Studies on the photosensitizing action of psoralens have been earlier performed both theoretically [96–101] and experimentally [32,33,35,36,38,102,103]. Regarding the interaction of drugs with DNA, one of the most important properties is the interaction (intercalation) of drugs with π -stacked nucleobases as well as in other arrangements.

Table 4
Main spectroscopic properties of furocoumarins

Compound	S ₁					S _n					T ₁					T _n				
	E _{V/A}	f	T ₀	E _{VE}	τ _{rad} /ns	E _{V/A}	f	T ₀	E _{VE}	τ _{rad} /μs	E _{V/A}	T ₀	τ _{rad} /s	SOC	E _{V/A}	T ₀	τ _{rad} /ms	SOC		
Psoralen	3.98	0.027	3.59	3.45	74	5.01	<10 ⁻⁴	3.91	2.78	3	3.27	2.76	28	<10 ⁻¹	4.85	3.84	9	46		
8-MOP	3.90	0.006	3.81	3.82	254	5.01	<10 ⁻⁴	3.91	2.87	3	3.16	2.72	60	<10 ⁻¹	4.85	3.84	1	47		
Khellin	3.52	0.012	3.26	3.17	189	4.00	<10 ⁻⁴	3.26	2.72	3 ms	3.05	2.83	3.4 h	<10 ⁻¹	3.61	3.03	9	40		
TMP	3.57	0.06	3.25	3.16	38	4.92	<10 ⁻⁴	3.92	3.00	3	3.04	2.63	180	<10 ⁻¹	4.78	3.73	1	46		
3-CPS	3.73	0.03	3.05	2.84	100	4.84	<10 ⁻⁴	3.59	2.50	4	2.88	2.40	81	<10 ⁻¹	4.72	3.58	32	44		

Energies in eV and SOCs between the ground and the excited state in cm⁻¹.

Computations carried out at the RHF, DFT, MP2, and CCSD(T) levels of theory for psoralen and 8-MOP [101] show that furocoumarins–thymine ground-state complexes are much more stable in the co-planar than in the stacked arrangements. The strength of the interaction with thymine is somehow different in both compounds (psoralen shows stronger interaction), and this fact is interpreted on the basis of dipole moment and polarizability of the involved moieties.

In order to analyze how the ground state of the monoadducts can be populated, several states have been computed at their equilibrium geometry, and they are related with respect to the psoralen and thymine molecules at infinite distance separation. This analysis allow us to establish the relationship among the different hypersurfaces, giving interesting hints on the states that may be involved in the formation of FMA and PMA. The ground state of both monoadducts, PMA and FMA, were optimized at the DFT/B3LYP/6-31 G* level of theory. As an initial hypothesis we have selected two structures at the asymptotic limits: To yield FMA, Pso (S₀) + Thy (T₁) and to yield PMA, Pso (T₁) + Thy (S₀), where Pso and Thy stand for psoralen and thymine, respectively. These are, according to our previous findings, the most probable starting states responsible for the photoreactivity. In the optimized triplet state of psoralen the pyrone C=C double bond is elongated, becoming therefore prone to react with the C=C bond of thymine, yielding PMA monoadducts. On the other hand, FMA monoadducts are more probable obtained by reaction of the populated thymine triplet state and ground state psoralen. The vertical transition energies for the low-lying excited states of the systems have been computed by using the CASPT2/CASSCF methodology (active space: 8 orbitals and 8 electrons, chosen according to previous RASS-

CF studies and computations of the isolated systems) employing the 6–31G(d) basis set. In both cases, PMA and FMA monoadducts, the binding energy ground state S₀ of the complex was found to be near 0.6 eV. Fig. 7 displays schematically the proposed photochemical processes. Current calculations are being focused on the location of the outlined conical intersections and singlet–triplet crossings.

Formation of the PMA monoadduct is likely to occur by means of the lowest triplet excited state of psoralen, according to our previous results, but FMA monoadduct does not seem to be formed in the same way. Otherwise we should have found an enlargement in the furan double bond. Our starting guess was to consider that FMA is formed through the lowest triplet excited state of thymine. Nevertheless, the CASSCF wave function shows that the triplet state is for both monoadducts located in the psoralen moiety. A further analysis looking for STC and CI crossings is therefore required to understand this issue. With the present information at hand we suggest two mechanisms for the formation of PMA and FMA monoadducts, which are compatible with the energy levels computed (cf. Fig. 7). To form PMA, triplet psoralen (T₁), efficiently populated as shown above and displaying an elongated pyrone C=C bond, will react with ground-state thymine, and through a singlet–triplet crossing the global S₀ hypersurface could be reached (Fig. 7, bottom). Similarly, we could think in a mechanism of efficient population of thymine triplet state, with an elongated C=C bond [104], and evolution also via a singlet–triplet crossing (Fig. 7, middle). An additional possibility currently under study is the formation of monoadducts directly after populating the singlet S₁ excited state of psoralen, which could evolve via a conical intersection to the S₀ state of the monoadd-

Table 5
Selected bond lengths (P: pyrone; F: furan) at the excited states optimized geometries of furocoumarins

Compound	$\overline{d(\text{C}=\text{C})}_F/\text{Å}$					$\overline{d(\text{C}=\text{C})}_P/\text{Å}$				
	S ₀	S ₁	S _n	T ₁	T _n	S ₀	S ₁	S _n	T ₁	T _n
Psoralen	1.348	1.365	1.345	1.344	1.345	1.342	1.373	1.428	1.469	1.419
8-MOP	1.346	1.346	1.343	1.342	1.343	1.341	1.352	1.426	1.469	1.417
Khellin	1.337	1.352	1.339	1.444	1.339	1.332	1.328	1.351	1.333	1.346
TMP	1.348	1.365	1.346	1.345	1.346	1.345	1.374	1.429	1.475	1.421
3-CPS	1.343	1.363	1.363	1.342	1.343	1.344	1.418	1.442	1.472	1.435

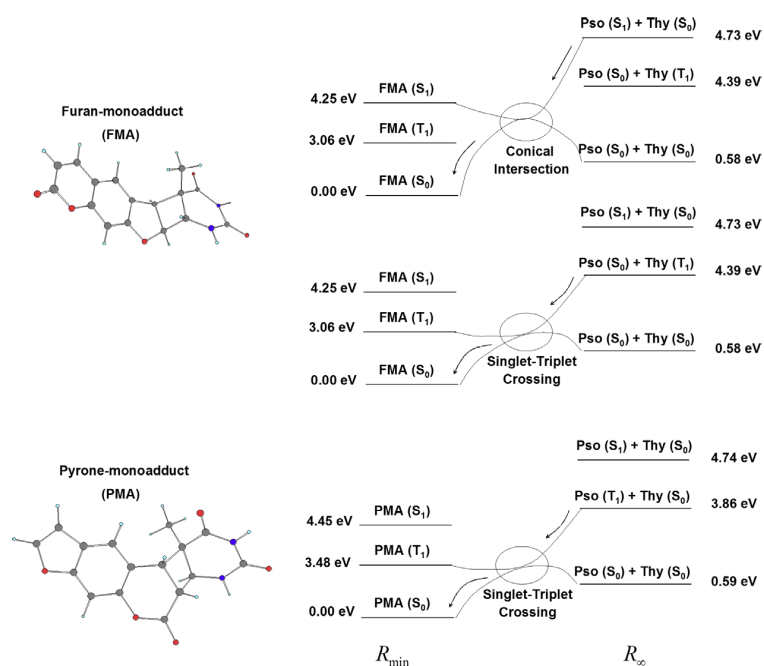


Fig. 7. Suggested photochemical mechanisms for the formation of psoralen-thymine FMA and PMA monoadducts.

ducts (Fig. 7, top). Furthermore, taking into consideration the bond lengths of the pyrone and furan C=C bonds in S_1 (see Table 5), both monoadducts could possibly be formed via the latter mechanism.

4. Summary and conclusions

In the present contribution the photophysics of psoralen and a number of derivatives has been analyzed using quantum-chemical methods through the multiconfigurational second-order perturbation procedure CASPT2, employing high-quality ANO-type one-electron basis sets. Optimized geometries for the low-lying singlet and triplet states, energy differences, and state and transition properties provide important information to understand the excited state structure and the absorption and emission processes taking place upon irradiation of the furocoumarin class of molecules. The absorption spectrum of the system has been studied by computing vertical excitation energies. A low-lying S_1 singlet excited state of $\pi\pi^*$ character with a ben-

zene-like nature is shown to lie at the energies in which the molecule is irradiated in phototherapy (320–400 nm, 3.87–3.10 eV). This state is also proven to be responsible for the recorded fluorescence in different media by computing the emission properties and comparing them to the experimental measurements. Regarding the triplet state structure, a T_1 ($\pi\pi^*$) state is computed at low energies as responsible for the strong phosphorescence of the system. The reactivity of psoralens in its T_1 state and the suggested role of such state in phototherapy are rationalized in terms of the computed spin density distributed on the two carbon atoms on the C_3 – C_4 bond of the pyrone ring, which varies from double- to single-type character. Analysis of the energy gaps and spin-orbit couplings at the Franck-Condon region suggests that the process responsible for the population of T_1 (T_π) does not take place vertically and most probably it occurs along the relaxation path on the S_1 (S_π) hypersurface. On the other hand, the double bond of the furan ring is not enlarged at T_1 (T_π) state. The derivatives 8-MOP, TMP, and khellin are suggested as the most

plausible candidates to have more efficient phototherapeutic properties. Since there are experimental evidences of the formation of both furan-monoadducts and diadducts [42,32–37] there would be another mechanism for the formation of these compounds, maybe by means of an excited state of thymine. This question is now under intense research. Also, the population mechanism of the low-lying T_2 state of psoralen, protagonist of its action as a photosensitizer, has been studied theoretically in depth. Analysis of the obtained energy differences, barrier heights, energy minima, hypersurface crossings, and spin-orbit coupling terms among the different electronic states indicates that the system, after evolving toward the S_1 energy minimum, may surmount a barrier and reach a S–T crossing between S_1 and the low-lying triplet $\pi\pi^*$ state, (S_1/T_2)_C. SOC terms close to 10 cm^{-1} have been obtained pointing out to an efficient ISC process in the neighborhood of the crossing region. Once the T_2 state has been populated, an ultrafast decay towards the low-lying T_2 state may well proceed through the conical intersection (T_2/T_1)_C, transferring the energy to the T_1 energy minimum from which the psoralen molecule may emit (phosphorescence) or react with thymine.

Acknowledgements

The research has been supported by Projects CTQ2004-01739 and CTQ2007-61260 of the Spanish MEC/FEDER and GV06-192 of the *Generalitat Valenciana*.

References

- [1] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science, Amsterdam, 2000.
- [2] The Nobel Foundation: <<http://www.nobel.org>>.
- [3] M. Weichenthal, T. Schwarz, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 21 (2005) 260.
- [4] B.R. Scott, M.A. Pathak, G.R. Mohn, *Mutat. Res.* 39 (1976) 29.
- [5] P.S. Song, K.J. Tapley Jr., *Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 1176.
- [6] E. Ben-Hur, P.S. Song, *Adv. Radiat. Biol.* 11 (1984) 131.
- [7] D. Averbek, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 859.
- [8] R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19.
- [9] A.M. Rouhi, *Chem. Eng. News* 76 (1998) 22.
- [10] P.C. Joshi, M.A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 638.
- [11] Y.N. Donan, R. Gurny, E. Alléman, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66 (2001) 89.
- [12] N.J. De Mol, M.J. Beijensbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 815.
- [13] H. Meffert, F. Böhm, E. Bauer, *Stud. Biophys.* 94 (1983) 41.
- [14] J. Llano, J. Raber, L.A. Eriksson, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 154 (2003) 235.
- [15] J. Cadet, P. Vigny, in: H. Morrison (Ed.), *Bioorganic Photochemistry 1*, John Wiley & Sons, New Jersey, 1990.
- [16] F. Dall'Acqua, P. Martelli, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 8 (1991) 235.
- [17] W.L. Fowles, *J. Invest. Dermatol.* 32 (1959) 249.
- [18] M.A. Pathak, J.H. Fellman, *Nature (London)* 185 (1960) 382.
- [19] M.A. Pathak, T.B. Fitzpatrick, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14 (1992) 3.
- [20] J.E. Hearst, *Chem. Res. Toxic.* 2 (1989) 69.
- [21] N. Kitamura, S. Kohtani, R. Nagakaki, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 6 (2005) 168.
- [22] B.J. Parsons, *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 813.
- [23] A.B. Lerner, C.R. Denton, T.B. Fitzpatrick, *J. Invest. Dermatol.* 70 (1953) 299.
- [24] J.A. Parrish, T.B. Fitzpatrick, L. Tannenbaum, M.A. Pathak, *N. Eng. J. Med.* 291 (1974) 1207.
- [25] H. Van Weelden, E. Young, J.C. Van der Leun, *Br. J. Dermatol.* 103 (1980) 1.
- [26] W.L. Morison, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20 (2004) 315.
- [27] W.H. Elliott, D.C. Elliott, *Biochemistry and Molecular Biology*, third ed., Oxford University Press, 2005.
- [28] M. Aida, M. Kaneko, M. Dupuis, in: J. Leszczynski (Ed.), *Computational Molecular Biology*, vol. 8, Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [29] B. Durbeej, L.A. Eriksson, *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 159.
- [30] L. Musajo, G. Rodighiero, F. Dall'Acqua, *Experientia XXI* (1964) 24.
- [31] E.J. Land, F.A.P. Rushton, R.L. Beddoes, J.M. Bruce, R.J. Cernik, S.C. Dawson, O.S. Mills, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1982) 22.
- [32] D. Kanne, K. Straub, J.E. Hearst, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 6754.
- [33] D. Kanne, K. Straub, H. Rapoport, J.E. Hearst, *Biochem.* 21 (1982) 861.
- [34] D.J. Yoo, H.D. Park, A.R. Kim, Y.S. Rho, S.C. Shim, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 23 (2002) 1315.
- [35] T. Sa e Melo, P. Morliere, R. Santus, L. Dubertret, *Photochem. Photobiophys.* 7 (1984) 121.
- [36] D. Kanne, H. Rapoport, J.E. Hearst, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 531.
- [37] R.V. Bensasson, C. Salet, E.J. Land, F.A.P. Rushton, *Photochem. Photobiol.* 31 (1980) 129.
- [38] L. Musajo, F. Bordin, R. Bevilacqua, *Photochem. Photobiol.* 6 (1967) 927.
- [39] M. Sasaki, F. Meguro, E. Kumazawa, H. Fujita, H. Kakishima, T. Sakata, *Mutat. Res.* 197 (1988) 51.
- [40] L. Musajo, F. Bordin, G. Caporale, S. Marciani, G. Rigatti, *Photochem. Photobiol.* 6 (1967) 711.
- [41] D. Kanne, H. Rapoport, J.E. Hearst, *J. Med. Chem.* 27 (1984) 531.
- [42] M.S. Rocha, N.B. Viana, O.N. Mesquita, *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 9679.
- [43] H. Matsumoto, A. Isobe, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 603.
- [44] J.C. Ronfard-Haret, D. Averbek, R.V. Bensasson, E. Bisagni, E.J. Land, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 479.
- [45] E. Bisagni, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14 (1992) 23.
- [46] P.S. Song, S.C. Shim, W.W. Mantulin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 315.
- [47] M. Collet, M. Hoebcke, J. Piette, A. Jakobs, L. Lindqvist, A. Van de Vorst, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 35 (1996) 221.
- [48] W.W. Mantulin, P.S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5122.
- [49] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 1.
- [50] T.A. Moore, M.L. Harter, P.S. Song, *J. Mol. Spectrosc.* 40 (1971) 144.
- [51] E. Yeagers, L. Augenstein, *J. Invest. Dermatol.* 44 (1965) 181.
- [52] H. Matsumoto, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.* 11 (1978) 3433.
- [53] H.K. Kang, E.J. Shin, S.C. Shim, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 12 (1991) 554.
- [54] M. Sasaki, T. Sakata, M. Sukigara, *Chem. Lett.* (1977) 701.
- [55] T.S.E. Melo, A. Maçanita, M. Prieto, M. Bazin, J.C. Ronfard-Haret, R. Santus, *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 429.
- [56] E. Yeagers, L. Augenstein, *Nature (London)* 212 (1966) 251.
- [57] G.G. Aloisi, F. Elisei, S. Moro, G. Miolo, F. Dall'Acqua, *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 506.
- [58] N.E. Koval'skaya, I.V. Sokolova, *High Energy Chem.* 36 (2001) 193.
- [59] A. Nakata, T. Baba, H. Takahashi, H. Nakai, *J. Comp. Chem.* 25 (2004) 179.
- [60] J. Tatchen, M. Kleinschmidt, C.M. Marian, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 167 (2004) 201.

- [61] J. Tatchen, C.M. Marian, *Chem. Phys. Phys. Chem.* 8 (2006) 2133.
- [62] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* 434 (2007) 107.
- [63] K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 1218.
- [64] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3151.
- [65] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fülischer, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* 93 (1996) 219.
- [66] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M.P. Fülischer, B.O. Roos, Multiconfigurational perturbation theory applied to excited states of organic compounds, in: K. Hirao (Ed.), *Recent Advances in Multireference Methods*, World Scientific, Singapore, 1999, p. 161.
- [67] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, in: P.v.R. Schleyer, P.R. Scheiner, H.F. Schaeffer III, W.L. Jorgensen, W. Thiel, R.C. Glen (Eds.), *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [68] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, Ab initio methods for excited states, in: M. Olivucci (Ed.), *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [69] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fülischer, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, V. Molina, *J. Mol. Struct.: Theochem* 388 (1996) 257.
- [70] N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 196.
- [71] E.R. Davidson, D. Feller, *Chem. Rev.* 86 (1986) 681.
- [72] I. Shavitt, *Isr. J. Chem.* 33 (1993) 357.
- [73] J. Almlöf, P.R. Taylor, *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 4070.
- [74] P.O. Widmark, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *Theor. Chim. Acta* 77 (1990) 291.
- [75] J. Almlöf, P.R. Taylor, *Adv. Quant. Chem.* 22 (1991) 301.
- [76] L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, M. Merchán, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 9360.
- [77] M. Merchán, E. Ortí, B.O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* 226 (1994) 27.
- [78] L. Serrano-Andrés, B.O. Roos, *Chem. Eur. J.* 3 (1997) 717.
- [79] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, M. Rubio, B.O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* 295 (1998) 195.
- [80] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 8691.
- [81] P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* 155 (1989) 189.
- [82] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M.A. Robb, L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2004) 1820.
- [83] B.O. Roos, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Phys. Chem.* 6 (2004) 2919.
- [84] K. Andersson, M. Barysz, A. Bernhardsson, et al., MOLCAS, Version 6.0, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Center, University of Lund, Sweden, 2002.
- [85] V. Veryazov, P.O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, *Int. J. Quantum Chem.* 100 (2004) 626.
- [86] D.J. Tozer, R.D. Amos, N.C. Handy, B.O. Roos, L. Serrano-Andrés, *Mol. Phys.* 97 (1999) 859.
- [87] J.L. McHale, *Molecular Spectroscopy*, Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999.
- [88] Ó. Rubio-Pons, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 9664.
- [89] M.A. El-Sayed, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 2834.
- [90] P. Avouris, W.M. Gelbart, M.A. El-Sayed, *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* 77 (1977) 793.
- [91] F. Bernardi, M. Olivucci, M.A. Robb, *Chem. Soc. Rev.* 25 (1996) 321.
- [92] M. Olivucci, A. Sinicropi, *Computational photochemistry*, in: M. Olivucci (Ed.), *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [93] E. Teller, *J. Phys. Chem.* 41 (1937) 109.
- [94] M. Klessinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 549.
- [95] J. Tatchen, N. Gilka, C.M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5209.
- [96] J.H. Kim, S.W. Oh, Y.S. Lee, S.C. Shim, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 8 (1987) 298.
- [97] J.H. Kim, S.H. Shon, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 13 (1992) 173.
- [98] J.H. Kim, S.H. Shon, G.S. Lee, S.K. Yang, S.W. Hong, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 14 (1993) 487.
- [99] J.H. Kim, S.H. Shon, S.K. Yang, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 15 (1994) 597.
- [100] J.H. Kim, S.H. Shon, S.K. Yang, I.H. Cho, S.W. Hong, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 18 (1997) 123.
- [101] T.M. El-Gogary, G. Koehler, *J. Mol. Struct.: Theochem* 808 (2007) 97.
- [102] B.H. Johnston, M.A. Johnson, C.B. Moore, J.E. Hearst, *Science* 197 (1977) 906.
- [103] R.V. Bensasson, E.J. Land, C. Salet, *Photochem. Photobiol.* 27 (1978) 273.
- [104] T. Climent, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* 441 (2007) 327.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology A:
Chemistryjournal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotochem

The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy

Juan José Serrano-Pérez, Remedios González-Luque, Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado de Correos 22085, ES-46101 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2008
 Received in revised form 25 March 2008
 Accepted 18 April 2008
 Available online 29 April 2008

Keywords:

Phototherapy
 Furocoumarins
 Triplet state
 Intersystem crossing
 Spin-orbit coupling

ABSTRACT

Furocoumarins are widely used as photosensitizers in photochemical therapies against different skin disorders such as psoriasis and vitiligo. Absorption of near-UV light by the chromophore triggers a set of photoreactions related to the therapeutic properties of the technique: linkage of a furocoumarin to thymine DNA nucleobases preventing proliferation of pathogenic cells, or generation of highly reactive singlet oxygen in damaged tissues. The family of furocoumarins has been studied in depth for many years seeking a drug having the most remarkable set of properties to act as a photosensitizer. For this purpose, understanding the underlying photochemical mechanisms behind the effectiveness of this therapy is required. We have undertaken a quantum-mechanical study on the photophysics and photochemistry of several relevant furocoumarins: psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP) and 5-methoxypsoralen (5-MOP), 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP), 3-carbethoxypsoralen (3-CPS), and khellin, analyzing the most efficient way in which the lowest excited triplet state, as protagonist of the photosensitizing action, is populated from the initially promoted singlet states. The results point out to khellin, in particular, and 5-MOP, as the most efficient photosensitizers.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phototherapy, a technique consisting in the employment of electromagnetic radiation coupled with a drug, the photosensitizer, is probably the medical area which nowadays better represents the connection between Physics, Chemistry, and Medicine. The absorption of electromagnetic radiation by the chromophore triggers a chain of photochemical reactions responsible for the healing process. Phototherapy is presently considered a major therapeutic strategy for health care in dermatology and has dramatically influenced the treatment of many skin disorders, whereas its prospective application against cancer is under intense research. Not only does therapeutic photomedicine pursue the suppression of ongoing deterioration processes, but also aims to prevent, modulate or abrogate the pathogenic mechanisms causing the disease [1].

Furocoumarins are well-known heterocyclic photosensitizers already used to treat some skin problems in ancient India and Egypt [2]. The treatment coined PUVA (psoralen + UV-A) therapy, in which the chromophore absorbs near UV-A light (320–400 nm, *i.e.*, 3.83–3.06 eV) [2,3–7], has been specifically designed to treat different skin disorders such as psoriasis and vitiligo [8–11]. Two are

the mechanisms involving light and phototherapeutic response (see Fig. 1) [12]. On the one hand, furocoumarin in its lowest triplet excited state can undergo photoreactions with thymine forming monoadducts and diadducts inserted in the DNA strand that alter the genetic material of the affected cell, preventing its proliferation [13–16]. A [2 + 2]-photocycloaddition between the double bonds of the furocoumarin ($C_3=C_4$ and $C_4'=C_5'$, see Fig. 2) and the double bond of thymine takes place [17]. On the other hand, in a second type of strategy, named photodynamic therapy (PDT), the photosensitizer in its lowest triplet excited state can transfer its excess energy to molecular oxygen available in the cellular environment, generating highly electrophilic singlet oxygen ready to damage target tissues [18–20].

In the last century, furocoumarin's chemistry reached its heyday. In 1834, Kalbruner isolated 5-methoxypsoralen (5-MOP), and Abdel Monem El Mofly made a breakthrough employing 8-methoxypsoralen (8-MOP) treating vitiligo in the 1940s. In 1953, Lerner, Denton, and Fitzpatrick, and later Parrish in 1974 [9], published studies of the treatment of both psoriasis and vitiligo with 8-MOP coupled with UV-A radiation. In the 1950s, 8-MOP was made available commercially, followed later by the synthetic compound 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP) [14].

Regarding the present use of furocoumarins, 8-MOP is used as an oral photoactive chemical for the treatment of vitiligo [2] and psoriasis [9]. 5-MOP is used against psoriasis as well, although it shows less severe secondary effects than 8-MOP and it is better tol-

* Corresponding author. Tel.: +34 963544427; fax: +34 963543274.
 E-mail address: Luis.Serrano@uv.es (L. Serrano-Andrés).

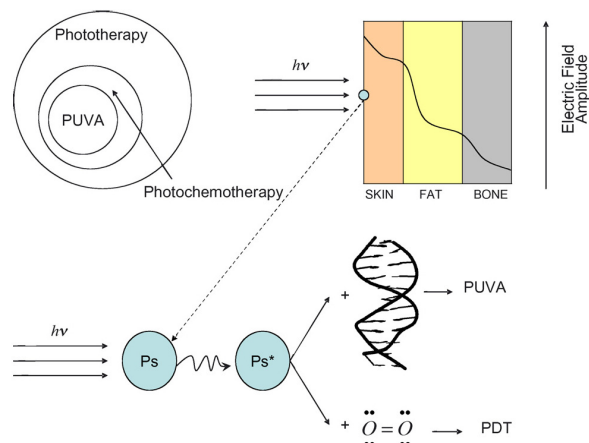


Fig. 1. Scheme of the phototherapeutic action of furocoumarins over skin diseases, including PUVA (Psoralen (Ps) + UV-A) therapy, involving formation of adducts with DNA, and PDT (photodynamic therapy), yielding reactive singlet oxygen.

erated by patients because of its lower phototoxicity [2,15]. Khellin has been found to be useful in the photochemotherapeutic treatment of vitiligo [15]. This compound does not display long-term side effects and phototoxic skin erythema reactions and seems to form mainly monoadducts. With respect to TMP, it is used in the treatment of both psoriasis and vitiligo [21]. Finally, 3-CPS (3-carbethoxy-psoralen) has been tested in the photochemotherapy of psoriasis [22]. Apparently, it gives rise only to monoadducts with DNA, being considered as a non-carcinogenic alternative to 8-MOP, so it is possible that phototherapy with 8-MOP will give way to 3-CPS in a foreseeable future [23]. In summary: (i) all the mentioned furocoumarins produce monoadducts; (ii) only psoralen and TMP show a very strong ability to build diadducts; (iii) 5-MOP and 8-MOP do not have such a pronounced trend; and finally, (iv) diadducts are not obtained from 3-CPS and khellin [19,24]. Regarding the generation of singlet oxygen, psoralen (Ps), 8-MOP, and 3-CPS have been suggested as the most favorable sources [19,22,25–28].

The photochemical process leading to the therapeutic action begins with the absorption of UV-A light by the photosensitizer and the system evolution along the paths and mechanisms promoting the population of the reactive lowest energy triplet state, which must be activated only at the target tissues. From this standpoint, an effective photosensitizer should possess, in principle, certain desirable key features: it must be harmless in the dark; in order to treat deep tissues, it should be activated by long-wavelength light, because the longer wavelength radiation the photosensitizer absorbs, the deeper the energy penetrates in the tissue; its triplet state must be populated from the excited singlet state by an efficient intersystem crossing process, and effective in transferring the energy to molecular oxygen in the PDT mechanism, and finally, the chromophore should form monoadducts with DNA to become mutagenic for the cells carrying the disease and perhaps less prone to build diadducts in order to prevent carcinogenic side effects. In addition, a good photosensitizer should be amphiphilic to favor the

injected administration of the drug, easily synthesized or isolated from natural sources, be deactivated soon after the treatment, and quickly eliminated from the body [29].

As a first step, and in order to understand the basic mechanistic aspects of the furocoumarins phototherapeutic action and in order to propose new and more efficient photosensitizers, it is necessary to get a better insight into the photophysics of the family of molecules. In the present research we will focus on the parent molecule, psoralen, and several of its closest derivatives: 8-MOP, 5-MOP, khellin, TMP, and 3-CPS (see Fig. 3), many of them used in current clinical practice. It would be highly desirable to have a detailed account of the photophysics of most furocoumarins to perform a thorough comparison. The experimental data are however scarce. The basic trends of the absorption spectra are in all cases similar. Apart from several sharp features at higher energies, psoralen displays a weak and structured low-lying band with a maximum ranging from 360 to 310 nm (3.44–4.00 eV) in aqueous solution and ethanol [30,31]. The intensity pattern varies for the series of furocoumarin compounds and the position of the band maximum is strongly solvent dependent: 340 nm (3.60 eV) for 8-MOP in different environments [32,33]; 335 nm (3.66 eV) in ethanol, 334–305 nm (3.71–4.02 eV) in dioxane, and 313 nm (3.91 eV) in water for 5-MOP [34,35]; 338–320 nm (3.62–3.83 eV) for khellin in various solvents [36,37]; 335 nm (3.66 eV) for TMP

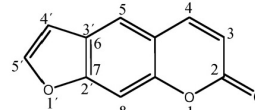


Fig. 2. Labeling and structure of psoralen.

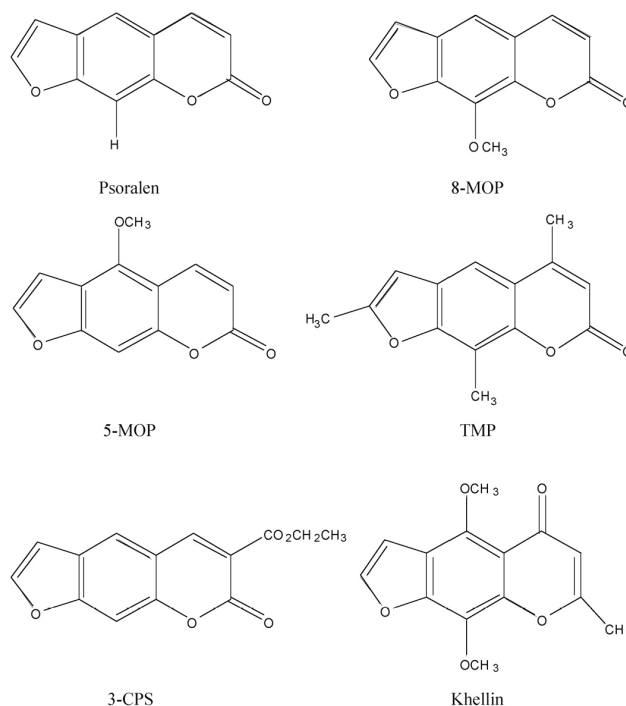


Fig. 3. Structure of psoralen, 8-MOP, 5-MOP, TMP, 3-CPS, and khellin.

in several media [21,34], and 318 nm (3.85 eV) in both water and ethanol-water mixture for 3-CPS [38]. Independently of the location of the maxima, this electronic transition is undoubtedly responsible for the UV-A absorption, source of the phototherapeutic action.

Both fluorescence (F) and phosphorescence (P) emissions have been detected for the different compounds in a similar energy range: for psoralen in ethanol at 409 nm (F, 3.03 eV) and 456 nm (P, 2.72 eV, band origin) [30]; for 8-MOP in different solvents and temperatures at 482–440 nm (F, 2.54–2.78 eV) and 456.5 nm (P, 2.68 eV, band origin) [21,34–36,39,40]; for 5-MOP at 510–425 nm (F, 2.40–2.88 eV) and 472 nm (P, 2.60 eV, band origin) in various media [21,32,34,35]; for khellin emission ranges from 553 to 422 nm (2.22–2.90 eV) [36,37]; for TMP in ethanol fluorescence has been detected from 450 to 416 nm (2.72–2.94 eV), and the phosphorescence band origin is located at 446.5 nm (2.74 eV) [34,40], and finally for 3-CPS the emission band maxima takes place at 448–395 nm (F, 2.50–2.77 eV) and 490 nm (P, 2.53 eV), depending on the temperature [23,38]. The measured fluorescence quantum yield is similar (0.02) in psoralen, 5-MOP, and 3-CPS, somewhat higher for TMP, and lower for 8-MOP and khellin [21,34,36,37].

Together with this parameter, that indicates that 8-MOP and khellin fluorescence is better quenched, we can use the phosphorescence/fluorescence quantum yield ratio (Φ_P/Φ_F) as a good probe of how favorable is the global intersystem crossing process. Comparing data in the same environment, ethanol at 77 K, the Φ_P/Φ_F ratio ranges from 7.1 in psoralen to 13.1 in 8-MOP, 11.9 in 5-MOP, and 6.0 in TMP [34], indicating that the relative population of the triplet state is the highest in 8-MOP. Khellin and 3-CPS, on the other hand, seem to give rise to higher triplet quantum yield formation than the other compounds in several solvents [22,23,36,37]. Such experimental evidence points out toward 8-MOP and khellin, and perhaps 3-CPS, as the most promising photosensitizers, considering that the efficient population of the T₁ state is a *sine qua non* condition to display an effective action via PDT and PUVA therapies [15].

The strong dependence of the data on the solvent and thermal effects and the lack of systematic and modern photochemical studies on the molecules make the rationalization of their properties quite difficult, because in many cases they cannot be compared. Apart from that, there is not a straightforward relationship between the photophysical and phototherapeutic properties, because the

latter strongly relies on the ability for subsequent formation for mono- and diadducts with DNA nucleobases. In the present study we have the objective to determine theoretically the intrinsic and most relevant photophysical properties of the furocoumarins in order to put them into the same framework and proceed to a full comparison. In particular we will analyze the efficiency of the initial population of the spectroscopic bright state, the accessibility of the singlet–triplet crossing (STC) and conical intersection (CI) regions connecting the excited states potential energy surfaces and leading to efficient intersystem crossing (ISC) and internal conversion (IC) processes, respectively, and the strength of the spin–orbit coupling terms between the different states. One of the highest level quantum-chemical methods currently available, in particular the CASPT2 approach, will be used for that purpose. The results are expected to provide good hints addressed to propose the most effective photosensitizer among the studied systems. Comparison with other quantum-chemical results on the psoralen itself can be also performed [41–43].

2. Methods and computational details

Using CASSCF multiconfigurational wave functions as reference, a second-order perturbation theory through the CASPT2 method was employed in order to include dynamic correlation energy in the calculation of the electronic excited states. The CASPT2 method calculates the first-order wave function and the energy up to second order and has repeatedly proved its accuracy [44–49]. The imaginary level-shift technique was employed in order to prevent the effect of intruder states. A shift parameter of 0.3 au was selected to avoid intruder states problems [50,51]. The molecular symmetry was constrained to the C_2 point group. For geometry optimizations, however, relaxing the symmetry constraints had no effect on the final structures, which preferred in all the cases to maintain planarity. An atomic natural orbital (ANO-L)-type basis set contracted to $C, O [4s3p1d]/H [2s1p] [52]$ was used throughout. The carbon and oxygen 1s core electrons were kept frozen in the second-order perturbation step. Geometries were obtained by computing analytical gradients at the RASSCF level for the ground and lowest singlet and triplet excited states. In the optimization of the A' states an active space of 14 active orbitals and 16 electrons has been employed and up to quadruple excitations were considered (eight orbitals in RAS1 space and six orbitals in RAS3 space). Within the irreducible representations (a' , a'') of the C_2 group this active space can be labeled as (0, 14), with no a' and 14 a'' orbitals. An additional oxygen lone-pair orbital and two electrons were included in the active space (1, 14) in order to optimize the lowest A' excited states. In all the remaining calculations, CASSCF wave functions were generated as state-average (SA)-CASSCF roots of a given symmetry. Using the information obtained by analyzing natural orbital occupation in control RASSCF calculations, the active space for the CASSCF calculations was set to include 12 active electrons and 12 active orbitals

Table 2
Main spectroscopic properties of furocoumarins^a

Compound	S_0		S_n		S_n		T_n						T_n								
	μ (D)	E_{VA}	f	T_e	τ_{rad} (ms)	μ (D)	E_{VA}	f	T_e	τ_{rad}	μ (D)	E_{VA}	T_e	τ_{rad}	SOC	μ (D)	E_{VA}	T_e	τ_{rad} (ms)	SOC	μ (D)
Psoralen	6.25	3.98	0.027	3.59	74	6.50	5.01	$\approx 10^{-4}$	3.91	3 μ s	2.07	3.27	2.76	28 s	$< 10^{-1}$	5.40	4.85	3.84	9	46	2.15
8-MOP	6.78	3.90	0.006	3.50	254	7.33	5.01	$\approx 10^{-4}$	3.91	3 μ s	2.66	3.16	2.72	60 s	$< 10^{-1}$	6.75	4.85	3.84	1	47	2.77
5-MOP	7.79	3.96	0.002	3.60	971	8.15	5.05	$\approx 10^{-4}$	3.95	3 μ s	3.26	3.14	2.66	95 s	$< 10^{-1}$	7.38	4.89	3.88	0.1	47	3.33
Khellin	4.41	3.52	0.012	3.26	189	5.15	4.00	$\approx 10^{-6}$	3.26	3 ms	2.43	3.05	2.83	3.4 h	< 1	4.29	3.61	3.03	9	40	2.43
TMP	6.56	3.57	0.06	3.25	38	7.35	4.92	$\approx 10^{-4}$	3.91	3 μ s	1.90	3.04	2.63	180 s	$< 10^{-1}$	6.13	4.78	3.73	1	46	2.06
3-CPS	4.01	3.73	0.03	3.05	100	5.31	4.84	$\approx 10^{-4}$	3.59	4 μ s	0.66	2.88	2.40	81 s	$< 10^{-1}$	3.67	4.72	3.58	32	44	0.49

Energies in eV and SOC's between the ground and the excited state in cm^{-1} .

^a Dipole moments (μ , D), vertical absorption (E_{VA} , eV), oscillator strength (f), adiabatic electronic band origin (T_e , eV), radiative lifetime (τ), and spin–orbit coupling (SOC, cm^{-1}).

Table 1
Active orbitals (a' , a'') and electrons (N_e^-) comprising the active space of the studied psoralen derivatives

	RASSCF (A')			RASSCF (A'')			CASSCF (A', A'')		
	RAS1	RAS3	N_e^-	RAS1	RAS3	N_e^-	RAS2	N_e^-	
Psoralen	(0, 8)	(0, 6)	16	(1, 8)	(0, 6)	18	(1, 12)	14	
8-MOP	(0, 9)	(0, 6)	18	(1, 9)	(0, 6)	20	(1, 11)	12	
5-MOP	(0, 9)	(0, 6)	18	(1, 9)	(0, 6)	20	(1, 11)	12	
TMP	(0, 8)	(0, 6)	16	(1, 8)	(0, 6)	18	(1, 10)	14	
Khellin	(0, 10)	(0, 6)	20	(1, 10)	(0, 6)	22	(1, 9)	12	
3-CPS	(0, 8)	(0, 7)	16	(1, 8)	(0, 7)	18	(1, 9)	12	

(0, 12) for A' roots and 14 active electrons and 13 active orbitals (1, 12) for A'' roots. The number of selected SA-CASSCF roots was 11, 4, 7, and 3 for $^1A'$, $^3A'$, $^1A''$, and $^3A''$ symmetries, respectively. A detailed account of employed active spaces for psoralen derivatives can be found in Table 1. The CAS state interaction method [53] (CASS) was used to compute transition properties, including the spin–orbit coupling (SOC) elements between selected states [54,55]. All calculations in the present paper were performed with the MOLCAS-6.0 quantum chemistry software [56,57].

3. Results and discussion

3.1. Photophysics of furocoumarins

In previous studies, the photophysics of the furocoumarin's parent molecule, psoralen, was analyzed in depth [58–60]. In particular, we computed the spectroscopic properties of the low-lying singlet and triplet excited states, as well as the basic photochemical features that makes the system an efficient photosensitizer, such it is the possibility of effectively populate its lowest energy triplet state (T_1 , $\pi\pi^*$) from the initially promoted bright singlet state (S_1 , $\pi\pi^*$). As mentioned above, the present paper will be devoted to make a thorough comparison of the photophysical properties of several psoralen derivatives, 8-MOP, 5-MOP, Khellin, TMP and 3-CPS, most of them used in current clinical practice, in the quest of the best photosensitizer. For that purpose we have computed vertical absorption and adiabatic excited state energies, oscillator strengths, radiative lifetimes, spin–orbit coupling terms, and relevant geometrical parameters of the two lowest energy singlet and triplet $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ excited states, as compiled in Tables 2 and 3.

The initially promoted S_1 $\pi\pi^*$ (S_n) state is clearly higher in energy for psoralen, 8-MOP and 5-MOP, whereas the associated transitions have not large oscillator strengths. Khellin and TMP, on the other hand, have transitions in the low near-UV range which are predicted relatively more intense, representing undoubtedly an advantage from the photochemical viewpoint. 3-CPS represents an intermediate situation. The vertical results are however difficult to relate to the variable position of the band maximum in different solvents [21–40]. The emission properties of the state are in all cases

Table 3
Selected bond lengths (P: pyrone; F: furan) at the excited states optimized geometries of furocoumarins

Compound	$d(\text{C}=\text{C})_p$ (Å) ^a					$d(\text{C}=\text{C})_f$ (Å) ^b				
	S ₀	S _π	S _n	T _π	T _n	S ₀	S _π	S _n	T _π	T _n
Psoralen	1.348	1.365	1.345	1.344(0.05, 0.00) ^c	1.345	1.342	1.373	1.428	1.469(0.31, 0.73)	1.419
8-MOP	1.346	1.362	1.343	1.342(0.05, 0.00)	1.343	1.341	1.382	1.426	1.469(0.32, 0.76)	1.417
5-MOP	1.345	1.365	1.343	1.343(0.00, 0.04)	1.343	1.342	1.377	1.427	1.467(0.29, 0.78)	1.420
Khellin	1.337	1.352	1.339	1.444(0.81, 0.19)	1.339	1.332	1.328	1.351	1.333(0.00, 0.08)	1.346
TMP	1.348	1.365	1.346	1.345(0.06, 0.14)	1.346	1.345	1.374	1.429	1.475(0.34, 0.66)	1.421
3-CPS	1.343	1.363	1.363	1.342(0.00, 0.02)	1.343	1.344	1.418	1.442	1.472(0.40, 0.71)	1.435

^a Bond C₄C₅

^b Bond C₂C₄ except for khellin, which is C₂C₃

^c Spin population at the carbons located in the reactive double bonds of each moiety.

similar, whereas the computed radiative lifetimes (Strickler–Berg approach [61]) tend to be close or one order of magnitude larger than the experimental values (~1–100 ns) [35], reflecting in that manner the presence of actual non-radiative decay channels. From Table 3 it is clear that, as it was already observed in psoralen [58], the S_π state is delocalized in all the molecule, and no significant bond elongation is observed upon geometrical optimization for the representative double bonds of the furan (C₄C₅) and pyrone units (C₃C₄, except for khellin, in which it is C₂C₃). 3-CPS is, however, an exception where the C₃C₄ bond enlarges in the state, clearly because the influence of the neighbor ethylmethanoate substituent. Other singlet excited ππ* states have been computed at the same level of theory for all six systems at energies 0.5–1.0 eV higher than those of the low-lying S₁ state, with transitions having noticeable oscillator strengths, although their importance in the present context is minor.

Regarding the lowest energy nπ* states, S_n and T_n, they are in all cases related with the carbonyl oxygen lone pair, therefore centered in the pyrone ring. There are no major differences among their properties in the various molecules except for the case of khellin, where the excitation energies are near 1.0 eV lower, favored by the different position of the C=O bond in the pyrone ring. This brings changes also in the emission properties of S_n in khellin, which becomes isoenergetic with S₁ and displays a large radiative lifetime. With respect to the mechanism of triplet population, it is very important to notice that in khellin S_π and T_n become almost degenerate already at the Franck-Condon (FC) geometry. As shall be emphasized later, even when the SOC terms between both states are not very high at the ground-state geometry, (3 cm⁻¹), the combined effects of the SOC and the degeneracy will enhance the probability of efficient ISC toward T_n, followed subsequently by IC to T₁ ππ* (T_π).

Finally, we can compare the results obtained for the lowest T_π state. The energy pattern is quite similar in all the studied compounds, that is, at the FC region the state is located 0.5–0.7 eV below any other excited state. Important differences can be, however, observed in khellin. This molecule locates the spin population of the T_π state in the C=C double bond of the furan ring (C₄C₅), unlike the other derivatives that do it on the pyrone C=C bond (C₃C₄), as it is clear by checking in Table 3 the enlargement of the corresponding bonds upon optimization of the state. A spin population concentrated at the carbon atoms of the furan double bond in the T_π state of khellin, unlike at the pyrone double bond in the other derivatives, also reflects the different behavior of the former. These facts may have dramatic consequences in the photochemistry of khellin as compared with the other systems when monoadducts are formed with thymine in the DNA strand. Whereas a T_π populated psoralen or other derivatives will favor a [2+2]-photocycloaddition linking an elongated pyrone (C₃C₄) bond and the double bond of thymine leading to pyrone-type monoadducts (PMA), khellin will

tend to link through the double bond of the furan side, leading to furan-type monoadducts (FMA) [60]. Regarding emission properties, the obtained electronic band origins of phosphorescence are strikingly close (less than 0.1 eV) to the experimental values of vibrational band origin: psoralen (2.7 eV), 8-MOP (2.68 eV), 5-MOP (2.60 eV), and TMP (2.74 eV) [32]. On the other hand, computed phosphorescence radiative lifetimes are just one order of magnitude off from the experimental values (~1 s) [35], except for khellin, in which we obtain a value of 3.4 h (12,240 s). This result might reflect that the Strickler–Berg approach cannot be applied in the case of khellin due perhaps to the presence of non-radiative decay channels toward other states, as it will be shown in the next section. Anyway, from the viewpoint of a photosensitizer and provided that radiationless processes from T_π do not become predominant, khellin will be undoubtedly a convenient system displaying a very long-lived triplet state. More studies on its phosphorescence are surely required.

In summary, the study of the photophysics of psoralen derivatives indicates that although large differences are not expected from the parent molecule, the analyzed derivatives will be slightly more efficient sources of triplet-activated phototherapy than psoralen itself, either because the initial S₁ state is more easily populated (lower energies and larger intensities), like for khellin, TMP or 3-CPS, or because the T_π state is slightly longer lived. Khellin represents a unique situation, because the distinct pyrone ring π structure largely modifies the photophysical properties, decreasing the excitation energies and enlarging the state lifetimes, and more specifically making S_π and T_n degenerate at the FC geometry and prone to give very efficient ISC rates. The consequences for the photochemistry of the systems are also crucial. Khellin is expected to form preferably triplet (T_π)-mediated FMA complexes, because of the location of the spin population of T_π in the furan double C=C bond, unlike the other systems that will initially form pyrone monoadducts (PMA). In the next section we shall provide a deeper analysis on the mechanism of efficient population of T_π, following the scheme recently proposed for psoralen [59].

3.2. Triplet population mechanism in furocoumarins

The main goal of the present research is to determine a mechanism to efficiently populate the lowest excited triplet state in furocoumarins, given that this state is the protagonist of the photosensitizing action. In order to make fully comparable the results obtained for the psoralen derivatives with those of the parent molecule, the same methodology as in Ps has been applied [59,60]. The bright spectroscopic S_π singlet state in furocoumarins is the only one to be significantly populated by direct absorption in the range of UV-A radiation typically used in phototherapy (3.1–3.9 eV) [13–15]. Therefore, from this state we focus on how the most favorable transfer of energy to the triplet manifold can take place.

An effective ISC process demands two conditions: small singlet–triplet (S–T) energy gaps and large SOC between the populated state (S_n here) and the corresponding triplet state. According to the qualitative El-Sayed rules [62,63] the spin–orbit coupling is large between states of $\pi\pi^*$ and $n\pi^*$ types and small between states of the same character. Therefore, a large SOC matrix element between S_n (the lowest excited singlet state of $\pi\pi^*$ nature) and T_n state (the lowest excited triplet state of $n\pi^*$ nature) is likely to occur. At the ground-state FC geometry, the computed data are: Ps ($\Delta E=0.87$ eV; SOC = 3 cm $^{-1}$), 8-MOP ($\Delta E=0.95$ eV; SOC = 3 cm $^{-1}$), 5-MOP ($\Delta E=0.93$ eV; SOC = 3 cm $^{-1}$), khellin ($\Delta E=0.09$ eV; SOC = 3 cm $^{-1}$), TMP ($\Delta E=1.21$ eV; SOC = 6 cm $^{-1}$), and 3-CPS ($\Delta E=0.98$ eV; SOC = 4 cm $^{-1}$). The two mentioned conditions do not seem to be simultaneously fulfilled. Khellin, in which the gap S_n – T_n is 0.09 eV, whereas the SOC, even if small, 3 cm $^{-1}$, it is noticeable, is an exception, and, consequently the ISC process can be considered more favorable. Furthermore, taking into account the values for the dipole moments displayed in Table 2, it is not expected that the effect of the aqueous environment largely changes the outcome. In the remaining compounds an immediate ISC upon absorption is unlikely, especially because of the large energy gap and the effects of the environment. Considering the obtained relative dipole moments, the S_n and T_n states will slightly stabilize and destabilize in polar solvents, respectively, increasing the S–T gap. In any case, the molecule can evolve rapidly along the S_n hypersurface, and therefore it is possible to search for regions of the coordinate space in which both energy gap and SOC are more favorable for ISC. Provided that those regions are easily accessible they can be the sources of triplet population. The strategy we have followed in the study is the same as the one we have recently employed for psoralen [59,60]. We found that the S_n state minimum was easily reached from the FC geometry, therefore we have to be able to find crossing regions starting from such structure. As in psoralen we have performed linear interpolations in internal coordinates (LIIC) from the minimum of the S_n state to the minimum of the S_0 state in each furcoumarin (see Figs. 4 and 5), to help us to understand the profiles of the different excited states along such a path, considered to be appropriate to find the singlet–triplet crossing, since both S_n and T_n states share the same basic structure and energetics [59].

Along the LIIC profile the main geometrical arrangement from the first ($0=S_n$ minimum) to the last ($4=S_0$ minimum) point is, as expected, an enlargement of the C=O bond, due to the change in nature from a $\pi\pi^*$ to a $n\sigma\pi^*$ state. Once the S_n state is populated its minimum can be easily reached, and then fluorescence is favored. Deactivation to other states by means of efficient ISC would be only possible if, simultaneously, the energy gap S–T is small enough and the SOC terms are large enough. Starting by the results on Fig. 4, in psoralen, 8-MOP, and 5-MOP the obtained profiles for the different states are apparently similar. As it occurs at the FC geometry, in the S_n minimum the two criteria for efficient ISC are not fulfilled at the same time. The SOC terms between S_n and any other excited triplet $\pi\pi^*$ state (such as T_2 , T_3 or T_4) are too small, whereas they increase for the coupling between S_n and T_n (3 – 5 cm $^{-1}$). The energy gap S_n – T_n is, however, too large to expect an efficient ISC at the S_n equilibrium structure, (S_n)_{MIN}. Studying the evolution along the LIIC path may provide valuable information on the fate of the energy. In all systems, the only state that strongly interacts with S_n via spin–orbit terms is the T_n state. Analysis of the accessibility of the STC (S_n/T_n)_X gives a good account of the relative efficiency of the corresponding ISC process. In the three molecules the singlet–triplet crossing takes place between points 2 and 3. The approximate barriers that the system has to overcome to reach the T_n state from the S_n minimum are 0.42 eV

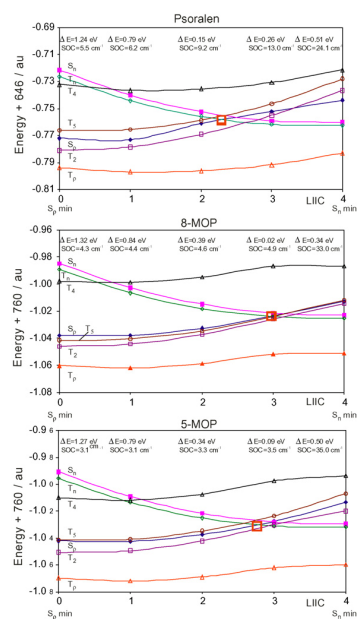


Fig. 4. Computed CASPT2 energies for the low-lying excited states of psoralen, 8-MOP, and 5-MOP along a linear interpolation of internal coordinates (LIIC) from S_n to S_0 minima. Solid and dashed lines represent singlet and triplet states, respectively. Energy gaps (ΔE) and spin–orbit coupling (SOC) terms between the S_n and T_n states at each geometry are also included. The singlet–triplet crossing (S_n/T_n)_X is indicated.

(Ps), 0.39 eV (8-MOP), and 0.26 eV (5-MOP). Because of the nature of the interpolation in the considered LIIC path, the obtained barrier can be considered as an upper limit to the actual value. In a previous study on Ps, the STC (S_n/T_n)_X was located and the barrier decreased to 0.36 eV, that is, just 0.06 eV [59,60]. The trend is clear, and the lower barrier obtained in 5-MOP makes it be viewed as a slightly better candidate to yield more efficient ISC than psoralen and 8-MOP. It is worth noting, however, that along the LIIC path the three systems display increasing SOC elements, that become maximum at the S_n minimum, and therefore the region for significant ISC can extend from the mentioned STC to the (S_n)_{MIN} structure. No drastic differences are then expected in the photophysics of the three systems.

From the results obtained for khellin, TMP, and 3-CPS displayed in Fig. 5, it is clear that TMP and 3-CPS have similar features as the previous systems, in particular a large S_n – T_n gap at the S_n minimum. As a consequence, the STC (S_n/T_n)_X takes place far away along the LIIC profile and the corresponding barrier to reach STC (S_n/T_n)_X from the S_n minimum is as large as in psoralen: 0.41 eV (TMP) and 0.44 eV (3-CPS). Because of such relatively higher barrier height, even when the SOC terms are slightly larger than in psoralen, 8-MOP, and 5-MOP, the efficiency of the ISC process will be probably lower. Khellin is obviously a totally different case. The S_n and T_n

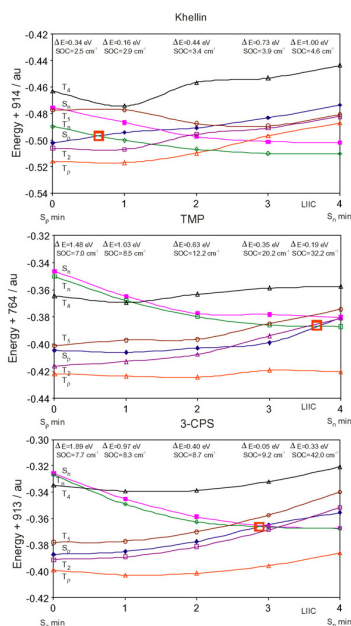


Fig. 5. Computed CASPT2 energies for the low-lying excited states of khellin, TMP, and 3-CPS along a linear interpolation of internal coordinates (LIIC) from S_n to S_n minima. Solid and dashed lines represent singlet and triplet states, respectively. Energy gaps (ΔE) and spin-orbit coupling (SOC) terms between the S_n and T_n states at each geometry are also included. The singlet-triplet crossing (S_n/T_n)_{IC} is indicated.

states are basically degenerated already at the FC geometry, and they are very near at the S_n minimum. The STC (S_n/T_n)_{IC} takes place immediately along the LIIC path. Because both states are extremely close in a wide region of the coordinate space, the computed barrier, 0.11 eV, cannot be most probably be considered as a measure of the actual efficiency of the ISC process. The energy degeneracy, together with the computed SOC coupling near 3 cm^{-1} , makes the ISC process involving S_n to T_n extremely favorable in relation to the other furocoumarins.

Once the energy has been partially transferred from S_n to the T_n state, the lower T_n state can be efficiently populated by means of a proper IC process. Fig. 6 displays a scheme of the mechanism of triplet population in furocoumarins suggested by the present results. In our previous study on psoralen [59,60], the conical intersection (T_n/T_n)_{CI}, responsible for the IC process, was located almost isoenergetic to the T_n minimum, and therefore the corresponding radiationless decay was predicted to be extremely efficient. In all the molecules studied here, except khellin, the profile of these two triplet states is very similar, and therefore the final outcome once T_n has been populated can be considered to be practically the same. Once again khellin is an exception. The T_n state is much lower in energy, and therefore the conical intersection (T_n/T_n)_{CI} can be

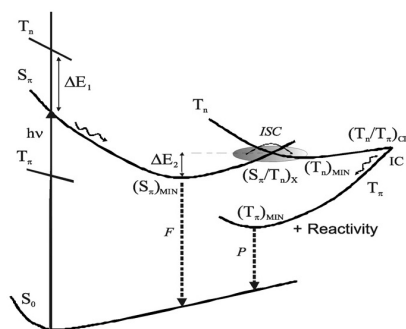


Fig. 6. Scheme of the suggested mechanism of triplet state population in furocoumarins. See text.

reached in a barrierless way already along the LIIC path, enhancing in this way the efficiency of the IC process.

In summary, we are proposing a common mechanism for the population of the lowest energy triplet state in furocoumarins which may slightly vary depending on different factors. If the FC gap between the initially populated S_n state and the T_n state (ΔE_1 in Fig. 6) is small enough, like in khellin, a very efficient ISC process will take place already near the initial FC geometry, provided that the SOC terms are large enough. In the other furocoumarins, reaching a region of favorable S_n/T_n ISC means to surmount a barrier (ΔE_2 in Fig. 6) toward the singlet-triplet crossing point. The barrier has been computed much larger in psoralen, 8-MOP, TMP, and 3-CPS than in 5-MOP, in which the ISC process can be therefore considered slightly more efficient. In all cases, but especially in khellin, once the T_n state is populated the energy transfer to the T_pi state will be extremely favorable.

A photosensitizer is expected to be more effective as more efficient is the process of population of T_pi , since such state is protagonist of processes as the cycloaddition to the DNA thymine moieties and the formation of singlet molecular oxygen for photodynamic therapy. From the photophysical viewpoint we have found in the studied psoralen derivatives that khellin could be considered a much more effective photosensitizer, followed by 5-MOP, whereas 8-MOP, TMP, 3-CPS, and psoralen itself, are expected to be somewhat less efficient, a tendency similar to that observed in the clinical practice [2,9,15,21,22]. In khellin, however, the triplet state reactivity is centered in the side of the furan ring, which indicates a favorable formation of furan-monoadducts (FMA), whereas the other systems have a reactive bond in the triplet state located at the pyrone ring, favoring the formation of PMA. Further research is required to determine whether the phototherapeutic efficiency of furocoumarins is better influenced by a more favorable triplet population, such as in khellin, or by the initial formation of FMA (khellin) or PMA (the other systems) complexes with DNA. Work on the formation of monoadducts furocoumarins-thymine at this level of theory is currently in process.

4. Summary and conclusions

In the present contribution, the photophysics of several furocoumarins has been analyzed using quantum-chemical methods through the multiconfigurational second-order perturbation pro-

cedure, CASPT2, employing high-quality ANO-type one-electron basis sets. Optimized geometries for the low-lying singlet and triplet states, energy differences, and state and transition properties provide relevant information to understand the excited state structure and the absorption and emission processes taking place upon irradiation of the furocoumarin class of molecules. The absorption and emission spectra of the systems have been studied by computing vertical and adiabatic excitation energies. Analysis of the energy gaps and spin-orbit couplings at the Franck-Condon region suggests that the process responsible for the population of T_1 (T_π) does not take place vertically, except in khellin, and most probably it occurs along the relaxation path on the S_1 (S_π) hypersurface. On the contrary, in khellin population of T_π is likely to happen at the Franck-Condon region. Another important difference regarding khellin is that the spin population in the T_π state is mainly located on the carbon atoms of the C=C double bond of the furan moiety, just the opposite that in psoralen, 8-MOP, 5-MOP, TMP, and 3-CPS. As a result, the length of C=C double bond of furan moiety is enlarged with respect to the ground state in the T_π state of khellin.

In addition, we have analyzed the population mechanism of the low-lying T_π state of the furocoumarins, protagonist of their action as photosensitizers. Determination of the obtained energy differences, barrier heights, energy minima, and spin-orbit coupling terms among the different electronic states indicates that the system, after evolving toward the S_π energy minimum, may surmount a barrier and reach a S-T crossing between S_π and the low-lying triplet $n\pi^*$ state, (S_π/T_π)_C. In this regard, khellin and 5-MOP, having the smallest barriers, seem to be the most promising photosensitizers. Once the T_π state has been populated, an ultrafast decay towards the low-lying T_π state may well proceed through the conical intersection (T_π/T_π)_C, transferring the energy to the T_π energy minimum from which the furocoumarin molecule may emit (phosphorescence), react with thymine, or transfer its energy to molecular oxygen. Among the other molecules, khellin combines favorably the presence of an easily accessible CI with a large lifetime for the reactive T_π excited state. Considering that psoralen, 8-MOP, and 3-CPS have been estimated as the best singlet oxygen generators [19,22,25–28] and until more information is available we here suggest that khellin seems to be the most plausible photosensitizer at least on the basis to its ability to react with thymine.

Acknowledgments

The research has been supported by projects CTQ2004-01739, CTQ2007-61260, and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience of the Spanish MEC/FEDER and GV-AINF2007/051 of the *Generalitat Valenciana*. JJSP acknowledges a Ph.D. (FPU) grant from the Spanish MEC.

References

- [1] M. Weichenthal, T. Schwarz, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 21 (2005) 260.
- [2] M.A. Pathak, T.B. Fitzpatrick, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 14 (1992) 3.
- [3] W.L. Fowlks, *J. Invest. Dermatol.* 32 (1959) 249.
- [4] M.A. Pathak, J.H. Fellman, *Nature (London)* 185 (1960) 382.
- [5] J.E. Hearst, *Chem. Res. Toxicol.* 2 (1989) 69.
- [6] N. Kitamura, S. Kohitani, R. Nagakaki, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 6 (2005) 168.
- [7] B.J. Parsons, *Photochem. Photobiol.* 32 (1980) 813.
- [8] A.B. Lerner, C.R. Denton, T.B. Fitzpatrick, *J. Invest. Dermatol.* 20 (1953) 299.
- [9] J.A. Parrish, T.B. Fitzpatrick, L. Tannenbaum, M.A. Pathak, *N. Eng. J. Med.* 291 (1974) 1207.
- [10] H. Van Weelden, E. Young, J.C. Van der Leun, *Br. J. Dermatol.* 103 (1980) 1.
- [11] W.L. Morison, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 20 (2004) 315.
- [12] F. Dall'Acqua, P. Martelli, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 8 (1991) 235.
- [13] P.S. Song, K.J. Tapley Jr., *J. Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 1176.
- [14] E. Ben-Hur, P.S. Song, *Adv. Radiat. Biol.* 11 (1984) 131.
- [15] D. Averbeck, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 859.
- [16] J. Cader, P. Vigny, in: H. Morrison (Ed.), *Bioorganic Photochemistry*, John Wiley & Sons, New Jersey, 1990.
- [17] F. Bernardi, M. Olivucci, M.A. Robb, *Acc. Chem. Res.* 23 (1990) 405.
- [18] A.M. Roubi, *Chem. Eng. News* 76 (1998) 22.
- [19] P.C. Joshi, M.A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 638.
- [20] Y.N. Donan, R. Gurny, E. Alléman, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66 (2001) 89.
- [21] H. Matsumoto, A. Isobe, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 603.
- [22] J.C. Ronfard-Haret, D. Averbeck, R.V. Bensasson, E. Bisagni, *E.J. Land. Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 479.
- [23] M. Craw, R.V. Bensasson, J.C. Ronfard-Haret, E. Bisagni, T.G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 611.
- [24] P.C. Joshi, M.A. Pathak, *Indian J. Biochem. Biophys.* 32 (1995) 63.
- [25] W.J. De Mol, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 815.
- [26] R. Bevilacqua, F. Bordin, *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 191.
- [27] W. Poppe, L.L. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* 22 (1975) 217.
- [28] C.N. Knox, E.J. Land, T.G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 359.
- [29] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science, Amsterdam, 2000.
- [30] P.S. Song, S.C. Shim, W.W. Mantulin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 54 (1981) 315.
- [31] M. Collet, M. Hoebeke, J. Piette, A. Jakobs, L. Lindqvist, A. Van de Vorst, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 35 (1996) 221.
- [32] H. Matsumoto, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.* 11 (1978) 3433.
- [33] D.J. Yoo, H.D. Park, A.R. Kim, Y.S. Rho, S.C. Shim, *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (2002) 1315.
- [34] W.W. Mantulin, P.S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* 95 (1973) 5122.
- [35] T.S.E. Melo, A. Maçanita, M. Prieto, M. Bazin, J.C. Ronfard-Haret, R. Santus, *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 429.
- [36] H.K. Kang, E.J. Shin, S.C. Shim, *Bull. Korean Chem. Soc.* 12 (1991) 554.
- [37] M.L. Borges, L. Latterini, F. Elisei, P.F. Silva, R. Borges, R.S. Becker, A.L. Maçanita, *Photochem. Photobiol.* 67 (1998) 184.
- [38] P. Vigny, F. Gaboriau, M. Duquesne, E. Bisagni, D. Averbeck, *Photochem. Photobiol.* 30 (1979) 557.
- [39] J.H. Kim, S.W. Oh, Y.S. Lee, S.C. Shim, *Bull. Korean Chem. Soc.* 8 (1987) 298.
- [40] T. Lai, B.T. Lim, E.C. Lim, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7631.
- [41] J. Tatchen, M. Kleinschmidt, C.M. Marian, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 167 (2004) 201.
- [42] J. Tatchen, C.M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 8 (2006) 2133.
- [43] J. Tatchen, N. Gilka, C.M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5209.
- [44] K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 1218.
- [45] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, I. Nebot-Gil, R. Lindh, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3151.
- [46] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fülcher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* 93 (1996) 219.
- [47] L. Serrano-Andrés, M.P. Fülcher, B.O. Roos, M. Merchán, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 6484.
- [48] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 8691.
- [49] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6559.
- [50] N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 196.
- [51] A.C. Borin, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys.* 262 (2000) 253.
- [52] P.O. Widmark, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *Theor. Chim. Acta* 77 (1990) 291.
- [53] P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *Chem. Phys. Lett.* 155 (1989) 189.
- [54] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, M.A. Robb, L. Blancafort, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2004) 1820.
- [55] B.O. Roos, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Phys. Chem.* 6 (2004) 2919.
- [56] K. Andersson et al., *MOLCAS, Version 6.0*, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Center, University of Lund, P.O.B. 124, S-221 00 Lund, Sweden 2004.
- [57] V. Varyazov, P.O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, *Int. J. Quantum Chem.* 100 (2004) 626.
- [58] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 1.
- [59] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* 434 (2007) 107.
- [60] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys.* 347 (2008) 422.
- [61] O. Rubio-Pons, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 9664.
- [62] M.A. El-Sayed, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 2834.
- [63] P. Avouris, W.M. Gelbart, M.A. El-Sayed, *Chem. Rev.* 77 (1977) 793.

Photoreactivity of Furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen–Thymine Adducts

Juan José Serrano-Pérez, Manuela Merchán, and Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado de correos 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received: June 23, 2008; Revised Manuscript Received: September 8, 2008

The mechanism of the [2 + 2] cycloaddition photoreaction of psoralen and a DNA nucleobase, thymine, cornerstone of the furocoumarin-based PUVA (psoralen + UVA radiation) phototherapy, has been studied by the quantum-chemical multiconfigurational CASPT2 method. Triplet- and singlet-mediated mono- and diadduct formations have been determined to take place via singlet–triplet crossings and conical intersections, correlated with the initially promoted triplet or singlet states in different possible reactive orientations. Pyrone-side monoadducts are suggested to be formed in the triplet manifold of the system, and to be less prone to yield diadducts because of the properties of the monoadduct lowest triplet state and the minor accessibility of its excited singlet states. Furan-side monoadducts are better produced in the singlet manifold after reaching a conical intersection with the ground state of the system. From there, the absorption of a second photon would in this case trigger the formation of the diadduct. The proposed mechanisms enable rationalizing the phototherapeutic behavior of several furocoumarins.

1. Introduction

Knowledge on the photosensitizing ability of furocoumarins (psoralens), in which the widely employed PUVA (psoralen + UVA) phototherapy relies,^{1–4} has provided successful clinical treatments against different diseases, from skin disorders like psoriasis or vitiligo to promising anticarcinogenic uses.⁵ The interaction of furocoumarins and UVA light (400–320 nm, 3.10–3.87 eV) in the affected tissues triggers photoreactions which are the source of the therapeutic properties of the procedure. The most important mechanism implies direct photobinding between the photosensitizer and DNA base monomers and the formation of furocoumarin–nucleobase mono- and diadducts that prevents the division of the injured cell.⁵ In another set of oxygen-dependent photoreactions, the activated furocoumarin can transfer energy to molecular oxygen to generate reactive radicals or excited $^1\Delta_g$ oxygen which becomes prone to damage the membrane of the harmed cell. The latter technique is known as photodynamic therapy (PDT), and its participation has been considered of minor impact in the PUVA technique.^{6–10}

The interaction of the furocoumarins with DNA that exerts the photosensitizing action takes place through the pyrimidine nucleobases, as it was evidenced by the modification of the pyrimidine nucleobase fluorescence spectra in aqueous solutions containing psoralen, pyrimidine, and purine nucleobases.¹¹ Thymine is the most frequent target, in accordance with its predominance in other similar photoreactions such as the formation of cyclobutane thymine dimers (T <> T) in UV-irradiated DNA.^{12–15} The key step of the mechanism is known to be a [2 + 2] cycloaddition photoreaction of one of the two reactive ethylenic bonds of psoralen ($C_3=C_4$ or $C_4=C_5$) and the reactive $C_5=C_6$ double bond of thymine (see Figure 1), leading to a cyclobutane structure linking both molecules (see Figure 2). The process begins in the dark with the furocoumarin molecule inserting into the DNA double strand. Recent molec-

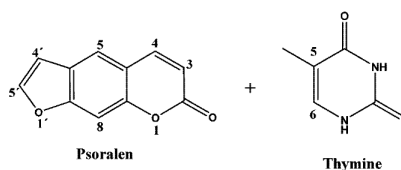


Figure 1. Labeling and structure of psoralen and thymine.

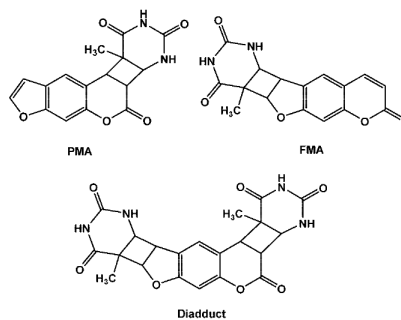


Figure 2. Psoralen–thymine pyrone (PMA) and furan (FMA) monoadducts and diadduct.

ular dynamics computations show that psoralen photoreacts preferably in [AT]_n sequences.¹⁶ As in other DNA–drug interactions, getting the proper geometric alignment is a relatively low-efficiency process because of the existence of two competitive noncovalent interaction mechanisms: on the one hand, the intercalation of the furocoumarin between two nucleobases that gives rise to the photoreaction, and, on the other hand,

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: Luis.Serrano@uv.es.

Formation of Psoralen–Thymine Adducts

J. Phys. Chem. B, Vol. 112, No. 44, 2008 14003

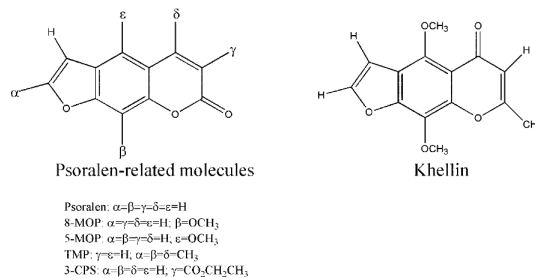


Figure 3. Molecular structures of the psoralen family.

its association with the minor groove binding of DNA.^{16,17} Following irradiation with UVA light, photoadditions occur either at the C₄=C₅' bond of the furan moiety of the furocoumarin (to form furan monoadducts, FMA) or at the C₃=C₄ bond of the pyrone moiety (to form pyrone monoadducts, PMA)¹⁸ (see Figure 2). The monoadduct may absorb another photon, inducing the other photoreactive C=C double bond to interact with a thymine on the opposite DNA strand and producing a diadduct that cross-links the DNA helix. The existence of the photoadducts furocoumarin–thymine has been analyzed in different media and with various techniques.^{19–23} The poly-[dA–dT]•poly[dA–dT] sequence region appears to be the most favorable site for the photocycloaddition reactions of furocoumarins.²⁴

Both double bonds C₄=C₅' and C₃=C₄ are able to react with thymine, although several proposals indicate that the one belonging to furan is the most active biologically,²⁵ a question still under debate. Formation of cross-links was thought to be extremely relevant for the therapeutic effectiveness, but it is also reported that diadducts cause adverse side effects such as carcinogenesis, mutagenesis, and immunosuppression.⁵ Only furocoumarins with bifunctional groups (see Figure 3), for example, psoralen or the widely used 8-methoxy-psoralen (8-MOP), can form diadducts. Certain monofunctional furocoumarins such as khellin or 3-carbethoxy-psoralen (3-CPS) have been proved to yield as efficient phototherapy as bifunctional furocoumarins but with less phototoxicity. As a result, several studies of 3-CPS photoadducts have been performed.^{26–28}

Despite the extended use of the PUVA technique and the characterization of the furocoumarin–thymine complexes, the underlying formation mechanism of the mono- and diadducts is far from being known.² According to the Woodward–Hoffmann rules,^{29–31} [2 + 2] cycloadditions are pericyclic thermally forbidden reactions, that, upon conservation of the orbital symmetry, are allowed photochemically. For instance, in the simplest model reaction of two ethene molecules, their lowest singlet excited state correlates directly with that of cyclobutane. Consequently, there is no symmetry-imposed barrier to this transformation and the reaction is named as symmetry-allowed. On quantum-chemical grounds, this reaction, that involves 4 π electrons, is excited-state-allowed because the surface topology of S₁ possesses a minimum that corresponds to a diradicaloid character as the antiaromatic transition state on S₀.^{32–35} Therefore, the key point in the mechanism of such type of pericyclic reaction is the existence of a suitable surface crossing, a conical intersection (CI), (S₁/S₀)_{CI}, that behaves as a funnel allowing the occurrence of a radiationless jump, that is, an internal

conversion (IC) from S₁ to S₀. Within the same framework, the formation of furocoumarin–thymine adducts would in principle involve population of the S₁ state of the supermolecule, either localized in the furocoumarin or in the thymine moiety, and subsequent evolution toward the corresponding CI, (S₁/S₀)_{CI}. This is not, however, the only possibility. It is believed that the triplet state of the furocoumarin is involved in the formation of the DNA cross-linked adducts. Furocoumarins are known to efficiently populate their lowest triplet state³⁶ and act as photosensitizers.⁴ Relatively high intersystem-crossing quantum yields (0.076) have been also established in the production of FMA.³⁷ If the T₁ state of the supermolecule participates in the photoreaction, this will proceed from the populated T₁ state toward a singlet–triplet crossing (STC) with the ground state, (T₁/S₀)_{STC}, finally leading to the formation of the adduct in S₀. This mechanism relies on the efficient population of the lowest triplet state of the furocoumarin from the initially irradiated singlet excited state, a process that has been recently rationalized on theoretical grounds for the family of furocoumarins.^{38–41}

The overall framework of the reaction is complex.^{42,43} The most common furocoumarins (psoralen, 8-MOP, 5-methoxy-psoralen (5-MOP), 4,5',8-trimethylpsoralen (TMP), khellin, and 3-CPS; see Figure 3 and the Supporting Information for their structures)^{40,41} produce monoadducts. Both PMA and FMA adducts are formed by irradiation at 365.5 nm (3.39 eV) and are nonfluorescent and fluorescent, respectively.^{44–46} Once the monoadduct is formed, a second absorption of a photon can trigger the interaction of another thymine molecule with the opposite reactive double bond of the monoadduct, giving rise to a diadduct. The involvement of one or other monoadduct in the cross-link process is unclear. Some studies suggest that diadducts are formed only from FMA upon irradiation at 360 nm (3.44 eV).^{22,47} A significant amount of PMA is, however, observed in certain derivatives.^{22,25,48} Adduct distribution in DNA samples differs depending on the wavelength of the second photon. Whereas absorption at 341.5 nm (3.63 eV) seems to favor diadducts, that at 397.9 nm (3.12 eV) yields FMA as the primary photoproduct.⁴⁸ On the other hand, monoadducts and diadducts can be split into original monomers under irradiation with short wavelength UV light.^{18,20} For instance, FMA monoadducts have been reported as decomposing to the original moieties after irradiation with UV light at 253.7 nm (4.89 eV).⁴⁴ With respect to the behavior of the different furocoumarins, it can be concluded that only psoralen and TMP show a very strong ability to build diadducts, that 5-MOP and 8-MOP do not have such a pronounced trend, and that diadducts are not obtained from 3-CPS and khellin.^{6,49} Taking into account that

14004 *J. Phys. Chem. B, Vol. 112, No. 44, 2008*

Serrano-Pérez et al.

3-CPS is also considered a productive source of singlet oxygen for PDT therapy^{6–10} and that khellin has been recently suggested as the most efficient photosensitizer among a number of furocoumarins,⁴¹ both 3-CPS and khellin are plausible candidates to substitute in the PUVA therapy to the widely employed 8-MOP.⁵⁰

From the theoretical standpoint, studies have been only focused on the intercalation of the photosensitizer between the π -stacked nucleobases, using classical mechanics approaches,¹⁶ and in the determination of the ground-state structures of the adducts, at the semiempirical^{51–53} or ab initio single-reference RHF, DFT, MP2, and CCSD(T) levels.⁵⁶ The complexes have been determined much more stable in the noncoplanar *trans* than in the stacked *cis* arrangements (see Figure 2).⁵⁶ In the present paper, we address, for the first time theoretically, the photochemical mechanisms of formation of monoadducts psoralen–thymine, both acting on the furan (FMA) and the pyrone (PMA) side of the photosensitizer. Psoralen, the parent furocoumarin compound, has been selected as the most representative compound in the family of substances. In order to interpret some of the measured trends, the formation of monoadducts has been analyzed both in the singlet and in the triplet manifold. Excited-state energies, oscillator strengths, state minima, conical intersections, singlet–triplet crossings, and charge and spin populations will be computed using a highly accurate ab initio multiconfigurational method, CASPT2//CASSCF. The study of the properties of FMA and PMA monoadducts and their mechanism of formation will enable us to identify the most important reactive centers and elucidate the participation of each one of the two moieties, psoralen and thymine, in the photoreaction, determining also the prevalence of the singlet and triplet manifold in the overall process and relating them to the phototherapeutic technique.

2. Computational Details

Initially, the ground state of reactives, psoralen and thymine, and products, monoadducts PMA and FMA, were optimized at the DFT/B3LYP/6-31G(d) level of theory. At the optimized geometries of the species, several singlet and triplet excited states were computed using CASSCF multiconfigurational wave functions as reference and second-order perturbation theory, the CASPT2 method, to obtain electronic energies, always employing the 6-31G(d) basis set. The CASPT2 approach, employed with the standard zeroth-order Hamiltonian⁵⁷ and an imaginary level shift of 0.3 au to prevent the presence of intruder states,⁵⁸ is an accurate procedure to compute excited states, as proved repeatedly.^{59–64} An active space of eight electrons in eight active orbitals (8/8) was employed in the CASSCF procedure, both to compute vertical excited states of the monoadducts and to optimize CIs and STCs in the different hypersurfaces. In order to make a straightforward comparison, the corresponding singlet and triplet excited states of the reactives, isolated psoralen and thymine, were optimized at the CASSCF level with the spaces (6/6) and (2/2), respectively, which constitute approximately equivalent active spaces that each moiety possesses in the supermolecule (FMA or PMA). It is important to emphasize that the so-obtained CASPT2 excitation energies can be considered accurate enough if compared to our previous results on the isolated systems (psoralen^{38–40} and thymine^{65,66}) performed at higher levels of calculation, that is, larger ANO-type basis sets and active spaces, with the differences being less than 0.2 eV. No symmetry or geometry constraints were used in the final calculations. Energies, displayed relative to the ground states of the separated reactives, include in all cases the basis

set superposition error (BSSE) corrected through the counterpoise procedure,⁶⁷ as described elsewhere.⁶⁸ All calculations have been performed using the MOLCAS 6.0 suite of programs.^{69–71} Further computational details can be found in the Supporting Information.

3. Results and Discussion

In the present research, we aim to the determination of the basic mechanistic in the formation of the furan- and pyrone-side psoralen–thymine monoadducts, FMA and PMA, respectively (see Figure 2). Both the singlet and the triplet manifold will be explored in order to characterize the most favorable conditions for the photoreaction to take place. Initially, we consider the isolated psoralen and thymine molecules in their ground-state equilibrium geometry. As shown in our previous studies on the furocoumarin family (psoralen, 8-MOP, 5-MOP, TMP, 3-CPS, and khellin),⁴¹ in the range of absorption energies in which the psoralen-based phototherapy is operative, that is, UVA light (400–320 nm, 3.10–3.87 eV), only the low-lying singlet excited $S_1(\pi\pi^*)$ state of the furocoumarin molecule can be efficiently populated by direct absorption. The state was computed vertically in the range 3.52–3.98 eV for the different furocoumarins, and the related transition had noticeable oscillator strength. Considering that the lowest singlet state of thymine lies vertically near 4.9 eV,⁶⁵ it is expected that the direct phototherapeutic process begins with the absorption of one photon, leading to the $S_1(\pi\pi^*)$ state of the furocoumarin. As the overall process corresponds to a [2 + 2] cycloaddition photoreaction, two possible paths may lead from the activation of S_1 in the furocoumarin (psoralen hereafter) toward the monoadduct: (i) in the singlet manifold the $S_1(\pi\pi^*)$ evolves following an efficient pathway toward a CI with the ground state, (S_1/S_0)_{CI}, which behaves as a funnel for IC toward the monoadduct in S_0 ; (ii) in the triplet manifold, and including a proper ISC process, there is a switch from $S_1(\pi\pi^*)$ toward low-lying triplet states of psoralen leading to $T_1(\pi\pi^*)$, (S_1/T_1)_{STC}, and from there, the system evolves following an efficient path to the STC (T_1/S_0)_{STC}, that is, the structure connecting the T_1 hypersurface with the ground state of the monoadduct. We still shall add one more mechanism as a possible source of adduct formation. As the lowest triplet state of thymine can be populated by energy transfer from some other endogenous or exogenous photosensitizers,^{72,73} as psoralen itself, it is possible to envisage a photoreaction leading from the $T_1(\pi\pi^*)$ state of the thymine to a proper STC (T_1/S_0)_{STC} connecting with the ground state of the monoadduct. The three types of mechanisms shall be explored here.

3.1. Reactivity in the Triplet Manifold. The most plausible and probably major mechanism in the formation of psoralen–thymine monoadducts involves the participation of the lowest triplet state of psoralen, $T_1(\pi\pi^*)$. It was already determined, experimentally and theoretically, that there is a very efficient pathway to populate $T_1(\pi\pi^*)$ in psoralen from the initially singlet excited $S_1(\pi\pi^*)$ state through a mechanism that combines the intermediacy of the lowest $S_n(n\pi^*)$ and $T_n(n\pi^*)$ excited states with the direct ISC switch from $S_1(\pi\pi^*)$ to $T_1(\pi\pi^*)$, depending on the environmental conditions.^{38–41,74,75} The reported phosphorescence/fluorescence ratio in psoralen, 7.1, similarly as in other furocoumarins,³⁶ confirms the existence of a populated T_1 state, whereas its long computed lifetime^{38–41} anticipates the properties of the molecule as an efficient triplet photosensitizer. In our previous CASPT2//CASSCF study on psoralen, we calculated the T_1 state at 3.27 eV, vertically from the ground-state minimum. At the optimized T_1 structure, one

Formation of Psoralen–Thymine Adducts

J. Phys. Chem. B, Vol. 112, No. 44, 2008 14005

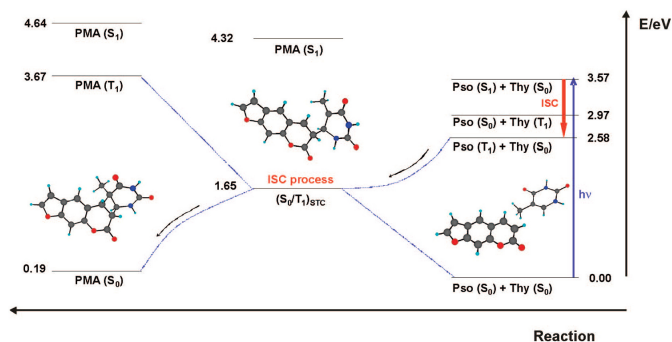


Figure 4. Photochemical mechanism proposed for the formation of psoralen (Pso)–thymine (Thy) pyrone monoadducts (PMA) in the triplet manifold via a singlet–triplet hypersurface crossing (STC). The photoreaction starts upon population of the T_1 state of psoralen after an ISC process from the initially activated S_1 state of the molecule.

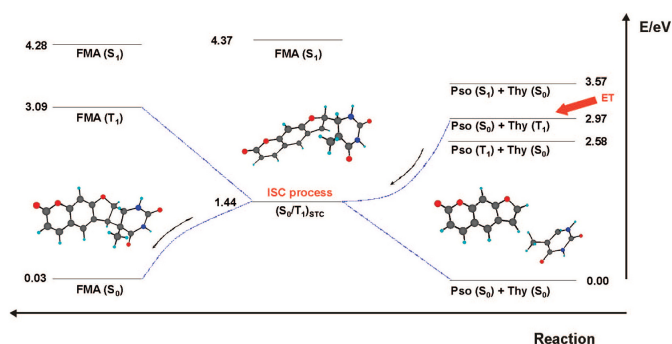


Figure 5. Photochemical mechanism proposed for the formation of psoralen (Pso)–thymine (Thy) furan monoadducts (FMA) in the triplet manifold via a singlet–triplet hypersurface crossing (STC). The photoreaction starts upon population of the T_1 state of thymine after an energy transfer (ET) process from an endogenous or exogenous photosensitizer.

geometric feature has to be emphasized: the bond length of the pyrone double bond $C_3=C_4$ enlarged from 1.342 Å in the ground state to 1.469 Å in T_1 . Additionally, the spin population in the triplet state was located essentially on atoms C_3 and C_4 , turning the corresponding bond into a very reactive feature. This property is shared by the other mentioned furcoumarins, except khellin, whose π -ring structure is quite different (see the Supporting Information). It is therefore clear that the T_1 state of psoralen is a good candidate to react with thymine through a [2 + 2] cycloaddition photoreaction in the side of the pyrone moiety, leading to PMA. Less clear is the formation of FMA, considering that the corresponding furan $C_4=C_5$ bond remains in T_1 (1.344 Å), as in the ground state of psoralen (1.348 Å), and no spin density is found in the bonding atoms. However, as mentioned above, thymine can also populate its lowest triplet T_1 state by proper energy transfer. As we computed earlier for thymine,⁶⁶ in the optimized $T_1(\pi\pi^*)$ state, its double $C_5=C_6$ bond (see Figure 1) has enlarged up to 1.513 Å (from a ground-state optimal value of 1.346 Å), and therefore, it behaves as the pyrone double bond of psoralen, with a near diradicaloid and elongated structure becoming prone to react with psoralen.

Two schemes of the most plausible mechanisms for the formation of PMA and FMA adducts within the triplet manifold are displayed in Figures 4 and 5, respectively. As reactants, we have the two isolated molecules, psoralen (Pso) and thymine (Thy), optimized in the corresponding state. Therefore, excitation energies from the ground state, $Pso(S_0) + Thy(S_0)$, are displayed as adiabatic transitions. As mentioned above, direct UVA radiation basically populates the psoralen $S_1(\pi\pi^*)$ state, adiabatically placed at 3.57 eV, and by means of an efficient ISC process, the system can transfer its population to the molecule lowest triplet $T_1(\pi\pi^*)$ state, adiabatically at 2.58 eV from the ground-state minimum. The enlargement of the psoralen pyrone $C_3=C_4$ bond and the localized spin population in C_3 and C_4 inform us about the reactive character of such a bond and strengthens the hypothesis of an efficient reactivity at the pyrone side of psoralen with the thymine $C_5=C_6$ bond to form PMAs. The mechanism is displayed in Figure 4, and comprises the evolution of the system from the isolated systems $Pso(T_1) + Thy(S_0)$, constituting an overall triplet state in the supermolecule, toward a singlet–triplet crossing (S_0/T_1)STC connecting with the ground state of PMA. At the STC, there is a reaction

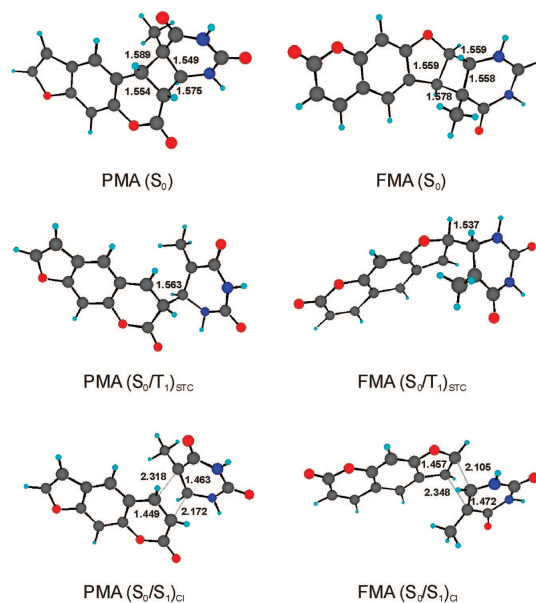


Figure 6. Optimized structures for PMA and FMA S_0 minima, $(S_0/T_1)_{STC}$ singlet-triplet crossings, and $(S_0/S_1)_{CI}$ conical intersections. The most relevant C-C distances are displayed in angstroms.

intermediate in which a covalent bond has been formed between two of the carbon atoms of the reactive bonds, C_3 from psoralen and C_6 from thymine, displaying an optimized bond length of 1.563 Å, whereas the other two atoms, C_4 and C_5 , respectively, remain far apart, at 2.814 Å (see Figure 6). Such a type of intermediate, as well as the presence of a STC crossing, is typical of triplet-mediated [2 + 2] cycloaddition photoreactions in the case of an asymmetric chemical environment at the double bonds. For instance, whereas the photocycloaddition of two ethene molecules leads to an avoided crossing and absence of a STC between S_0 and T_1 , the feature shows up in fluorethene, where the fluoride atom breaks the symmetric environment of the double bond.⁷³ The path toward the STC intermediate from the initial products, located energetically almost 0.9 eV below, will be probably barrierless in most cases, as proved in the photocycloaddition of nucleobases,⁷³ although it would ultimately depend on the favorable insertion of the drug between the strand of nucleobases, on the diffusion of the two species, and on the inherent flexibility of the DNA structure to provide reactive orientations. From the STC intermediate, and after a subsequent ISC process, the system will evolve to the ground state of PMA, which is placed 0.19 eV above the initial reference. At the STC structure, the computed electronic spin-orbit coupling term is somewhat low, $\sim 0.1 \text{ cm}^{-1}$, but the effect can be expected to enhance by vibronic coupling and environmental effects.^{74,75} Figure 6 displays the computed geometries for the STC intermediates and final monoadducts. The cyclobutane structure in the monoadducts is similar to those found in other biological photocycloadditions, like those leading

to the pyrimidine nucleobase dimers thymine-thymine ($T \times T$) and cytosine-cytosine ($C \times C$).⁷³ A noncoplanar *trans* conformation is, however, preferred in PMA and FMA,⁵⁶ unlike for the bipyrimidine dimers, in which a sandwich-type *cis* structure is more stable, probably due to the favorable π -stacked nucleobase structures.⁷³

As regards the formation of FMA monoadducts via a triplet manifold, it is unlikely that it can take place by the absorption of a photon from psoralen and further population of the molecule T_1 state. The furan fragment of psoralen is barely involved in the lowest triplet state, and therefore, the corresponding $C_4=C_5$ cannot be considered reactive, having a bond length of 1.344 Å and no spin population. Still, a probably minor mechanism may participate depending on the external conditions. The thymine S_1 state is too high in energy to be populated at the phototherapeutic wavelengths, but as it has been observed, the thymine T_1 state can be directly activated by an energy transfer process from an endogenous, e.g., other nucleobases, or exogenous, different photogenotoxic substances or psoralen itself, which is known to be an efficient triplet photosensitizer.⁷² The psoralen-thymine system can then evolve from the initial conditions, $Pso(S_0) + Thy(T_1)$, toward a STC FMA intermediate corresponding to the $(S_0/T_1)_{STC}$ structure, and, after an ISC process, reach the FMA ground state. The covalent bond is formed as C_5-C_6 , with a bond length of 1.537 Å, while the distance C_4-C_5 becomes 2.964 Å. The structure of the STC intermediate is similar in both cases, PMA and FMA, and involves formation of a covalent bond at C_6 , precisely the thymine

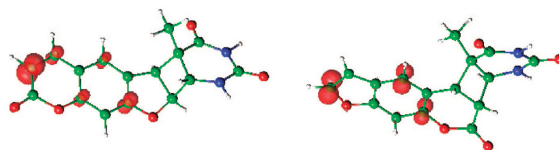


Figure 7. Spin population in the optimized T_1 excited state of FMA (left) and PMA (right). FMA has density on both carbon atoms of the elongated $C_3=C_4$ pyrone double bond.

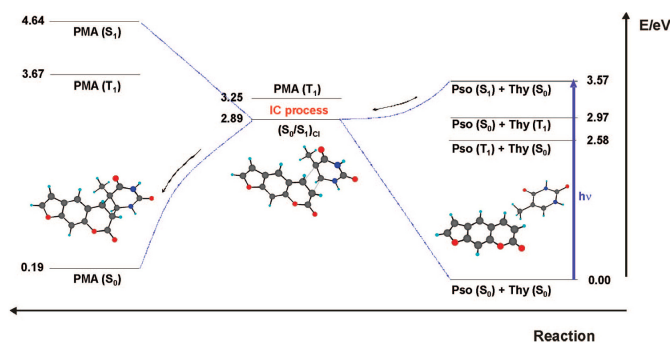


Figure 8. Photochemical mechanism proposed for the formation of psoralen (Pso)–thymine (Thy) pyrone monoadducts (PMA) in the singlet manifold via a conical intersection hypersurface crossing (CI). The photochemical reaction starts upon direct population of the S_1 state of psoralen by UVA light.

double bond carbon atom without the methyl group, preferred instead of C_5 probably by steric reasons. At the STC structure, the spin–orbit coupling term is 3 times smaller for FMA than for PMA, pointing to a less efficient ISC process. All together, it can therefore be concluded that, in the triplet manifold, the formation of PMA monoadducts is more favored than that of FMA monoadducts.

The electronic structure of both monoadducts differs. Whereas FMA has vertical excitation energies for its lowest excited triplet and singlet states at 3.06 and 4.25 eV, respectively, the corresponding energies in PMA rise to 3.48 and 4.45 eV, respectively. Both excitations involve the psoralen fragment. The first conclusion we obtain is that it is the $S_1(\pi\pi^*)$ state of FMA and not of PMA, located too high in energy, which is more favored to absorb the second photon that triggers the formation of diadducts with a new thymine molecule. The hypothesis is further supported by the analysis of the T_1 state properties. By optimizing the lowest triplet state of both monoadducts at the CASSCF level, we identified that the spin population in this state is basically localized in the $C_3=C_4$ bond of the pyrone moiety in FMA and somewhat delocalized on the psoralen ring in PMA (see Figure 7). Therefore, the formation of diadducts with a thymine in the opposite DNA strand is favored in FMA, whose T_1 state has an elongated and reactive $C_3=C_4$ pyrone double bond. This conclusion is supported by experimental estimations, which determined that PMA, unlike FMA, could not give rise to diadducts.^{22,47} The production of FMA diadducts may be diminished by some photoreversibility from FMA toward the separated subsystems. In fact, several experiments support this hypothesis. FMA species have been shown to decompose, yielding the original

products after irradiation with middle UV light, at 4.89 eV.⁴⁴ Also, both mono- and diadducts can be split into the original monomers under irradiation with short wavelength UV light.^{18,20} Among other factors, the distribution of adducts in DNA samples seems to depend also on the wavelength of the irradiation. Increasing the absorbed energy favors the diadduct vs monoadduct formation,⁴⁸ which can be understood by the higher energy of the initially populated singlet excited state in the monoadduct rather than in psoralen, as computed here.

3.2. Reactivity in the Singlet Manifold. Taking into account that the formation of FMA species does not seem to be favored in the triplet manifold involving triplet excited psoralen, it is worth exploring the alternative mechanism of formation of both monoadducts in the singlet manifold. Despite the fact that in psoralen the ISC process toward T_1 , after one-photon absorption in S_1 , is quite efficient, part of the population of the singlet state can evolve toward an intermediate structure representing a conical intersection with the ground state, $(S_0/S_1)_{CI}$, that will behave as a funnel for IC toward the formation of the monoadduct in its ground state. This type of photoreaction does not require a reactive double C=C bond elongated as in the triplet case. At the CI structures, however, the thymine and pyrone/furan C=C bonds enlarge near 0.1 Å from their initial S_1 structure. Figures 8 and 9 display the proposed schemes for the formation of PMA and FMA monoadducts, respectively, on the singlet manifold after direct population of the S_1 state of psoralen. The energy difference with respect to the initial channel, $Pso(S_1) + Thy(S_0)$, is smaller than in the case of the triplet manifold, but still, the CI is clearly below the asymptotic limit (all energies are BSSE-corrected), in

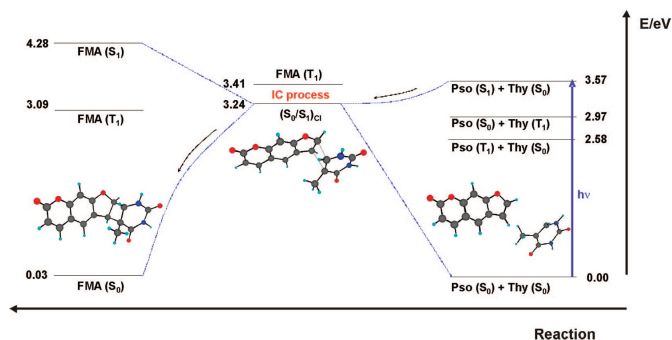


Figure 9. Photochemical mechanism proposed for the formation of psoralen (Pso)–thymine (Thy) furan monoadducts (FMA) in the singlet manifold via a conical intersection hypersurface crossing (CI). The photoreaction starts upon direct population of the S_1 state of psoralen by UVA light.

particular for the formation of the PMA CI intermediate. In the CIs, the shearing-type parallelogram structure of the system is similar to other [2 + 2] photocycloadditions,⁷³ with the carbon atoms of the two moieties being separated by around 2.1–2.3 Å (see Figure 6). From the CI, the system will further evolve to yield the ground-state monoadduct. Singlet-mediated [2 + 2] photocycloadditions have been proved to be efficient in other biological systems, probably even more effective than mechanisms of spin-forbidden nature. In particular, the thymine dimerization has been measured as an ultrafast photoreaction in which the dimers are formed ~ 1 ps after illumination, pointing to an approximately barrierless excited-state reaction for bases that are properly oriented at the instant of light absorption.⁷⁶ Therefore, as for the triplet manifold, the efficiency of the process will also depend on the species orientation, their diffusion in the medium, and DNA flexibility. Considering the four proposed mechanisms, we suggest that PMA formation takes place mainly via the triplet manifold, whereas FMA, which is also expected to give rise to diadducts in major proportion, is probably more efficiently formed in the singlet manifold with the participation of a CI structure and the corresponding internal conversion process.

4. Summary and Conclusions

On the basis of quantum-chemical *ab initio* multiconfigurational CASPT2/CASSCF calculations of the psoralen–thymine system, we propose several photochemical mechanisms to elucidate the [2 + 2] photocycloaddition leading to the formation of monoadducts between the furocoumarin and the DNA nucleobase. From the two types of possible monoadducts, only those linking the thymine- and the pyrone-side psoralen reactive double C=C bonds, namely, PMAs, are suggested to be efficiently produced via the triplet manifold. The process would start by direct activation of the $S_1(\pi\pi^*)$ state of psoralen (3.9–3.6 eV) followed by rapid intersystem crossing toward the psoralen triplet manifold, finally populating the lowest triplet state $T_1(\pi\pi^*)$. Further evolution would lead the system to an intermediate species, with a single covalent bond between the two moieties, in which the lowest triplet and the singlet states are connected through a singlet–triplet crossing (S_0/T_1)_{STC}. Subsequent ISC would

finally relax the system to the ground state of PMA. As reactivity on the furan-side double C=C bond in psoralen is not favored in the psoralen T_1 state, the only alternative to form FMA monoadducts in an equivalent mechanism via the triplet manifold is to populate the T_1 state of thymine by means of an energy transfer from another photosensitizer, that it could even be psoralen itself. It can, however, be expected that the latter mechanism is not as favorable as that for PMA, and therefore that the formation of FMA species is only minor in the triplet manifold. On the other hand, the production of both monoadducts after following a relaxation path from the initially populated psoralen S_1 state toward a conical intersection (S_0/S_1)_{CI} seems equally favorable for PMA and FMA, and the predominance of one or another process will depend on the orientation effects after insertion of psoralen in the DNA strand. We can then hypothesize that the production of PMA species will take place mainly via the triplet manifold, highly favored in that case, whereas FMA is most probably formed in the singlet manifold.

Those findings allow rationalizing different experimental facts and making certain predictions. It has been found that all furocoumarins with at least one functional group, pyrone or furan double C=C bond here, produce monoadducts. As we have seen here, the formation of FMA and PMA is predicted to take place at least by one of the proposed mechanisms, although the final yield may vary upon the external conditions. Interestingly, furocoumarins show a different tendency to form diadducts, larger for psoralen and TMP and smaller for 5-MOP and 8-MOP, whereas 3-CPS and khellin seem not to yield diadducts at all.^{6,49} Also, it has been suggested that only FMA species can give rise to diadducts after absorption of a photon.^{22,47} Our results rationalize some of those findings. In particular, the diadduct is most probably formed upon absorption of a photon by the monoadduct in its lowest singlet state and a subsequent ISC toward T_1 . In FMA, the pyrone reactive double bond concentrates the spin density, and a new photoreaction with another thymine molecule is then favored to form the diadduct. Additionally, the lowest singlet excited state of FMA is within the reach of the near UV light. On the contrary, PMA, which has a S_1 state too high in energy, in the middle UV range, delocalizes its spin density in T_1 and

Formation of Psoralen–Thymine Adducts

the diadduct formation by the furan side can be expected to be less efficient. Furthermore, if FMA is the major source of diadducts, it is understandable that systems with a sterically hindered pyrone C=C bond like 3-CPS (see Figure 3 and the Supporting Information) or with a different π structure in the pyrone ring like khellin both yield FMA in major proportion and do not give rise to diadducts, as experimental evidence indicates. If the negative side effects of the cross-link formation of diadducts are confirmed, 3-CPS and khellin, both found as very efficient photosensitizers,⁴¹ could be suggested as very promising photodrugs. Further experimental and theoretical studies are required to determine the contribution of the different mechanisms in the formation of the corresponding adducts in the furocoumarin family in order to design novel and highly photoreactive psoralen derivatives of photochemotherapeutical interest.

Acknowledgment. The research reported has been supported by the MEC-FEDER projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenuio in Molecular Nanoscience and GV-AINF2007/051 of the *Generalitat Valenciana*.

Supporting Information Available: Calculation details, Cartesian coordinates of the optimized structures, and furocoumarin structures (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Song, P.-S., Jr. *Photochem. Photobiol.* **1979**, *28*, 1177.
- Ben-Hur, E.; Song, P.-S. *Adv. Rad. Biol.* **1984**, *11*, 131.
- Hearst, J. E. *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 69.
- Averbeck, D. *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 859.
- Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science: Amsterdam, The Netherlands, 2000.
- Joshi, P. C.; Pathak, M. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *112*, 638.
- De Mol, N. J.; Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. *Photochem. Photobiol.* **1981**, *35*, 815.
- Knorr, C. N.; Land, E. J.; Truscott, T. G. *Photochem. Photobiol.* **1986**, *43*, 359.
- Poppe, W.; Grossweiner, L. I. *Photochem. Photobiol.* **1975**, *22*, 217.
- Ronfard Haret, J. C.; Averbeck, D.; Bensasson, R. V.; Bisagni, E.; Land, E. J. *Photochem. Photobiol.* **1982**, *35*, 479.
- Musajo, L.; Rodighiero, G.; Dall'Acqua, F. *Experientia XXI* **1964**, *24*.
- Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495.
- Aida, M.; Kaneko, M.; Dupuis, M. In *Computational Molecular Biology*, Leszczynski, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1999; Vol. 8.
- Durbej, B.; Eriksson, L. A. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 159.
- Serrano-Pérez, J. J.; González-Laque, I.; Coto, P. B.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. To be published.
- Saenz-Méndez, P.; Guedes, R. C.; Dos Santos, D. J. V. A.; Eriksson, L. A. *Res. Lett. Phys. Chem.* **2007**, *2007*, 60623.
- Tessman, J. W.; Isaacs, S. T.; Hearst, J. E. *Biochemistry* **1985**, *24*, 1669.
- Kitamura, N.; Kohiani, S.; Nagakaki, R. J. *Photochem. Photobiol.*, **C** **2005**, *6*, 168.
- Scott, B. R.; Pathak, M. A.; Mohn, G. R. *Mutat. Res.* **1979**, *39*, 29.
- Rocha, M. S.; Viana, N. B.; Mesquita, O. N. J. *Chem. Phys.* **2004**, *121*, 9679.
- Land, E. J.; Rushton, F. A. P.; Beddoes, R. L.; Bruce, J. M.; Cernik, R. J.; Dawson, S. C.; Mills, O. S. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, *22*.
- Kanne, D.; Straub, K.; Hearst, J. E.; Rapoport, H. J. *Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6754.
- Kanne, D.; Straub, K.; Rapoport, H.; Hearst, J. E. *Biochemistry* **1982**, *21*, 861.
- Yoo, D. J.; Park, H. D.; Kim, A. R.; Rho, Y. S.; Shim, S. C. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 1315.
- Parsons, B. J. *Photochem. Photobiol.* **1980**, *32*, 813.
- Cadet, J.; Voituriez, L.; Gaboriau, F.; Vigny, P.; Della Negra, S. *Photochem. Photobiol.* **1983**, *37*, 363.

J. Phys. Chem. B, Vol. 112, No. 44, 2008 14009

- Blais, J.; Ronfard-Haret, J. C.; Vigny, P.; Cadet, J.; Voituriez, L. *Photochem. Photobiol.* **1985**, *42*, 599.
- Meysan, A.; Gaboriau, F.; Vigny, P.; Voituriez, L.; Cadet, J. *Biochimie* **1986**, *68*, 787.
- Woodward, R. B.; Hoffmann, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1969**, *8*, 781.
- Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: 2001.
- Van der Lugt, W. Th. A. M.; Oosterhoff, L. J. J. *Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6042.
- Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*; VCH Publishers: 1995.
- Bernardi, F.; Bottoni, A.; Robb, M. A.; Schlegel, H. B.; Tonachini, G. J. *Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2260.
- Bernardi, F.; De, S.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1737.
- Bernardi, F.; Olivucci, M.; Robb, M. A. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 405.
- Mantulin, W. W.; Song, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5122.
- Bensasson, R. V.; Salet, C.; Land, E. J.; Rushton, F. A. P. *Photochem. Photobiol.* **1980**, *31*, 129.
- Serrano-Pérez, J. J.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. J. *Chem. Phys.* **2006**, *124*, 1.
- Serrano-Pérez, J. J.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *434*, 107.
- Serrano-Pérez, J. J.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *Chem. Phys.* **2008**, *347*, 422.
- Serrano-Pérez, J. J.; González-Laque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Photochem. Photobiol., A* **2008**, *199*, 34.
- Johnston, B. H.; Johnson, M. A.; Moore, C. B.; Hearst, J. E. *Science* **1977**, *197*, 906.
- Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Salet, C. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *27*, 273.
- Musajo, L.; Bordin, F.; Bevilacqua, R. *Photochem. Photobiol.* **1967**, *6*, 927.
- Sasaki, M.; Meguro, F.; Kumazawa, E.; Fujita, H.; Kakishima, H.; Sakata, T. *Mutat. Res.* **1988**, *197*, 51.
- Musajo, L.; Bordin, F.; Caporale, G.; Marciani, S.; Rigatti, G. *Photochem. Photobiol.* **1967**, *6*, 711.
- Sa de Melo, T.; Morfiere, P.; Santus, R.; Dubret, L. *Photochem. Photobiophys.* **1984**, *7*, 121.
- Kanne, D.; Rapoport, H.; Hearst, J. E. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 531.
- Joshi, P. C.; Pathak, M. A. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **1995**, *32*, 63.
- Craw, M.; Bensasson, R. V.; Ronfard-Haret, J. C.; Melo, M. T. S. E.; Truscott, T. G. *Photochem. Photobiol.* **1983**, *37*, 611.
- Kim, J. H.; Oh, S. W.; Lee, Y. S.; Shim, S. C. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1987**, *8*, 298.
- Kim, J. H.; Shon, S. H. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1992**, *13*, 173.
- Kim, J. H.; Shon, S. H.; Lee, G. S.; Yang, S. K.; Hong, S. W. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1993**, *14*, 487.
- Kim, J. H.; Shon, S. H.; Yang, S. K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1994**, *15*, 597.
- Kim, J. H.; Shon, S. H.; Yang, S. K.; Cho, I. H.; Hong, S. W. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1997**, *18*, 123.
- El-Gogary, T. M.; Koehler, G. J. *Mol. Struct.: Theochem.* **2007**, *808*, 97.
- Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218.
- Forsberg, N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196.
- Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Nebot-Gil, I.; Lindh, R.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 3151.
- Roos, B. O.; Andersson, K.; Fülischer, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219.
- Borin, A. C.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys.* **2000**, *262*, 253.
- Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. Ab initio methods for excited states. In *Computational Photochemistry*; Olivucci, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2005.
- Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691.
- Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borin, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473.
- Merchán, M.; González-Laque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471.
- Serrano-Pérez, J. J.; González-Laque, R.; Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11880.
- Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65.
- Olaso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 231102.
- Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülischer, M. P.;

14010 *J. Phys. Chem. B*, Vol. 112, No. 44, 2008

Serrano-Pérez et al.

Gagliardi, L.; De Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmlerpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Ståhring, J.; Thorsteinsson, T.; Varyazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.4; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, 2006.

(70) Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Varyazov, V.; Widmark, P.-O.; Cossi, M.; Schimmlerpfennig, B.; Neogrády, P.; Seijo, L. *Comput. Mater. Sci.* **2003**, *28*, 222.

(71) Varyazov, V.; Widmark, P. O.; Serrano-Andrés, L.; Lindh, R.; Roos, B. O. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *100*, 626.

(72) Bosca, F.; Lhiaubet-Vallet, V.; Cuquerella, M. C.; Castell, J. V.; Miranda, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6318.

(73) Roca-Sanjuán, D.; Olaso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10768.

(74) Tatchen, J.; Marian, C. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2133.

(75) Tatchen, J.; Gilka, N.; Marian, C. M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 5209.

(76) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625.

JP805523D

**Photoreactivity of Furocoumarins and DNA
for PUVA Therapy:
Formation of Psoralen-Thymine Adducts**

Juan José Serrano-Pérez, Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés*

*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València,
Apartado de correos 22085, ES-46071 Valencia, Spain*

Supporting Information

* Author to whom correspondence should be addressed: Luis.Serrano@uv.es

Additional details***a. Geometry and energy determinations.***

Most calculations reported in the present contribution have been performed using the CASPT2//CASSCF protocol, in which geometry optimizations, including minima and surface crossings, were carried out (except when indicated) at the multiconfigurational CASSCF level, whereas electronic energy computations use the second-order multiconfigurational perturbation approach, CASPT2.^{1,2,3,4} Singlet-triplet crossings and conical intersection searches were carried out, without symmetry or geometry restrictions, using the restricted Lagrange multipliers technique⁵ as included in the MOLCAS-6.0 package⁶ in which the lowest-energy point was obtained under the restriction of degeneracy between the two considered states, constituting a minimum energy crossing point (MECPs), in which the degeneracy between both considered states has been maintained.

b. Basis Set Superposition Error.

In order to correct the Basis Set Superposition Error (BSSE),⁷ which is always present in calculations of dimers and molecular aggregates, we have employed the well-known counterpoise procedure.^{7,8,9} In order to assess such effects we have computed, at each geometry (STC, CI, and minima), psoralen and thymine separately, on the one side, and the supermolecule including ghost functions on psoralen or thymine, on the other side. As previously observed the correction is similar for all the states computed at the same level of calculation, SA (*state-average*)-CASSCF and CASPT2 (equal active spaces) at a specific geometry. Therefore we have employed the correction computed for the ground state to account for the BSSE effects in the other states at the same geometry. The computed BSSE corrections for the ground state of each complex and geometry is compiled below in Table S1:

Table S1. CASPT2 BSSE correction (in eV) for the ground state of each monoadduct and each geometry.

	PMA				FMA			
	Min	STC	CI	INF	Min	STC	CI	INF
BSSE (S ₀)	0.72	0.26	0.27	0.00	0.72	0.44	0.34	0.00

References

- (1) Andersson, K.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218-1226.
- (2) Roos, B. O.; Fülcher, M. P.; Malmqvist, P.-Å.; Serrano-Andrés, L.; Pierloot, K.; Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219-331.
- (3) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L.; Fülcher, M. P.; Roos, B. O. In: *Recent Advances in Multireference Methods*. Hirao, K. Ed, World Scientific Publishing, Singapore, **1999**.
- (4) Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. In: *Computational Photochemistry*; Olivucci, M. Ed; Elsevier Publishing: Amsterdam, **2005**.
- (5) De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comp.* **2005**, *1*, 1029-1037.
- (6) Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülcher, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmelpfennig, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Ståhring, J.; Thorsteinsson, T.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS*, version 6.4; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, **2006**.
- (7) Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553.
- (8) Van Duijneveldt, F. B.; Van Duijneveldt-Van de Ridt, J. G. C. M.; Van Lenthe, J.H. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1873.
- (9) Olasso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 231102.

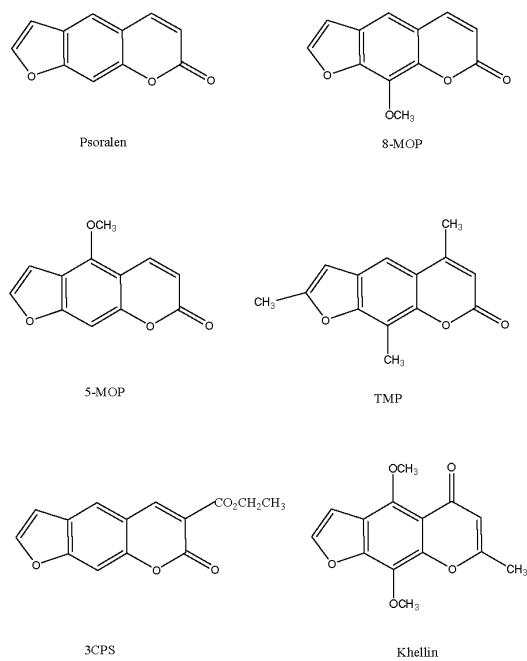


Figure S1. Members of the furocoumarin family: psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP), 5-methoxypsoralen (5-MOP), 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP), khellin, and 3-carbethoxypsoralen (3-CPS).

Table S1. Cartesian coordinates x, y, z (in au) of the optimized CASSCF geometries. Total CASSCF energies (Et) is also included.

Psoralen (S₀) + Thymine (S₀) 10 Å
B3LYP/6-31G(d) geometry
Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.18533371 au

C	-0.92701	10.97792	-2.82061
C	1.26092	9.85197	-3.71215
C	1.14299	7.36758	-4.72178
C	-1.07615	5.94043	-4.88493
C	-3.25451	7.06133	-3.99724
C	-3.27951	9.61965	-2.92963
C	-5.55370	10.59710	-2.08304
C	-7.82566	9.04993	-2.28626
C	-7.76300	6.58177	-3.32389
C	3.89090	10.56930	-3.92325
C	5.09280	8.57643	-4.98400
C	-7.73511	9.27352	17.83593
C	-5.57772	10.59269	18.20433
C	-3.16850	9.36403	17.58432
C	-5.58933	5.49628	16.25912
C	-5.48856	13.24325	19.21044
O	-9.56720	5.14989	-3.56916
O	-5.41595	5.65378	-4.16379
O	3.47193	6.59481	-5.49357
O	-1.08627	10.33239	17.82304
O	-5.63556	3.34750	15.43871
H	7.03806	8.24215	-5.49974
H	4.74436	12.33547	-3.35463
H	-0.92292	12.87235	-2.03448
H	-1.11542	4.04733	-5.66382
H	-5.66405	12.47803	-1.28013
H	-9.64955	9.72700	-1.65155
H	-4.37259	13.33307	20.95256
H	-7.38745	13.96101	19.60643
H	-4.57091	14.51527	17.85820
H	-1.76435	5.99173	16.21016
H	-9.39462	5.89415	16.64762
H	-9.58453	10.05739	18.25078
N	-7.75443	6.83670	16.90661
N	-3.40171	6.88278	16.65264

Table S1 (continuation).

PMA (S₀/T₁)_{src}
CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d) geometry
Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.106844 au

C	-4.26110	2.44389	-5.05800
C	-2.03197	3.85508	-5.04176
C	-2.18625	5.42430	-7.30105
C	-4.37551	4.82986	-8.38551
C	-0.29509	3.52042	-3.09461
C	-0.82167	1.72969	-1.16871
C	-3.14882	0.37668	-1.28544
C	-4.89477	0.68784	-3.19697
C	0.82719	1.25381	0.86305
C	0.30172	-0.83593	2.71985
C	-2.36580	-1.88222	2.57220
C	4.74040	-2.28046	1.54384
C	6.58560	-1.61484	3.50861
C	3.94451	-3.89953	6.61261
C	2.14301	-3.12232	2.39802
C	5.61346	-2.58553	-1.13035
O	-5.68330	3.04134	-7.09495
O	-3.81282	-1.29026	0.59740
O	-3.15419	-3.30579	4.10836
O	8.55289	-0.58148	3.09429
O	3.75325	-4.64408	8.73281
H	-0.83810	6.77560	-7.96795
H	-5.26888	5.50214	-10.06722
H	1.43785	4.57625	-3.02377
H	-6.63399	-0.35161	-3.20943
H	1.39114	-4.36601	0.95532
H	0.81736	-5.46319	5.29848
H	0.51895	-0.12609	4.63102
H	2.48661	2.38807	1.12413
H	7.23315	-1.39370	-1.48709
H	6.17211	-4.53445	-1.47834
H	4.13141	-2.11760	-2.46251
H	7.09736	-1.85366	7.30367
N	5.86301	-2.24422	5.93135
N	2.38231	-4.60085	4.68986

Table S1 (continuation).

PMA (S₀/S₁)_{CI}
 CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d) geometry
 Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.066370 au

C	-3.72233	2.27103	-4.93219
C	-1.39594	3.45003	-4.74576
C	-1.21362	4.98687	-7.01202
C	-3.35425	4.59374	-8.28140
C	0.10745	3.00407	-2.63412
C	-0.75473	1.34729	-0.76138
C	-3.14489	0.17390	-1.05021
C	-4.66731	0.61833	-3.12871
C	0.58288	0.94025	1.59580
C	-0.67080	-0.55531	3.51659
C	-3.08140	-1.73521	3.05761
C	3.98043	-1.76837	1.04795
C	5.92260	-0.77391	2.73546
C	4.56700	-3.77989	6.07060
C	2.07319	-3.34518	2.28017
C	4.82691	-2.38231	-1.60655
O	-4.90728	2.95415	-7.06612
O	-4.10442	-1.43180	0.71353
O	-4.19590	-3.02551	4.52170
O	7.44812	0.80610	2.18642
O	4.87034	-4.71655	8.09387
H	0.30684	6.19711	-7.57370
H	-4.05361	5.31181	-10.03352
H	1.90876	3.91076	-2.41714
H	-6.50114	-0.23155	-3.27733
H	0.79804	-4.37407	1.07933
H	1.52460	-5.87762	5.18409
H	-0.14582	-0.37530	5.46558
H	1.97281	2.32501	2.14447
H	6.03058	-0.87940	-2.29658
H	5.94186	-4.12121	-1.66033
H	3.25929	-2.60086	-2.90684
H	7.29469	-1.14562	6.34298
N	6.00865	-1.84428	5.14962
N	2.70942	-4.61537	4.42933

Table S1 (continuation).

PMA S₀ minimum
B3LYP/6-31G(d) geometry
Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.208872 au

C	-0.44377	1.14515	-6.94623
C	1.82875	1.99356	-5.84878
C	3.45690	2.61215	-7.95027
C	2.10120	2.10900	-10.06255
C	2.00832	2.05760	-3.21296
C	-0.03529	1.27551	-1.72999
C	-2.27764	0.48206	-2.93637
C	-2.53065	0.39007	-5.55644
C	0.12487	1.34414	1.10767
C	-2.27760	0.30187	2.43538
C	-4.65937	-0.11533	0.95008
C	1.72301	-0.81317	2.45089
C	2.95471	0.30632	4.81020
C	0.22685	-2.42694	7.61145
C	-0.78393	-2.19940	3.04796
C	3.71886	-2.28552	0.97087
O	-0.28066	1.21282	-9.52074
O	-4.44912	-0.21953	-1.62616
O	-6.69022	-0.52484	1.89845
O	4.62023	1.89102	4.68735
O	-0.20566	-3.11729	9.76132
H	5.36774	3.33056	-7.87847
H	2.52261	2.27397	-12.05205
H	3.72061	2.71764	-2.29083
H	-4.28656	-0.21646	-6.41733
H	-1.17677	-3.63969	1.61792
H	-2.42968	-4.51455	5.89262
H	-2.76041	1.31151	4.16820
H	0.70238	3.22900	1.72739
H	5.37260	-1.10194	0.60440
H	4.33865	-3.93683	2.05836
H	2.95951	-2.94191	-0.83570
H	2.96545	0.09166	8.67367
N	2.09028	-0.58990	7.11010
N	-0.96103	-3.35316	5.50305

Table S1 (continuation).

FMA (S₀/T₁)_{src}
 CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d) geometry
 Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.155170 au

C	-1.26398	-0.80193	1.43445
C	-0.62089	-0.96509	-1.16670
C	1.99146	-1.41971	-1.28829
C	2.93238	-1.69656	1.39562
C	-2.52905	-0.65128	-2.98363
C	-5.01250	-0.19598	-2.16885
C	-5.54223	-0.06332	0.41489
C	-3.66920	-0.36400	2.28353
C	-7.13386	0.15438	-3.89349
C	-9.44252	0.57365	-3.00878
C	-9.93760	0.69787	-0.27647
C	5.14416	0.04553	2.11325
C	4.73101	2.74152	1.27056
C	3.24712	4.55525	2.85377
C	8.63944	-0.16486	-1.08058
C	6.00005	3.68306	-1.00811
O	0.79726	-1.10837	2.92246
O	-7.92742	0.36664	1.26147
O	-11.94849	1.06234	0.62944
O	10.36418	-1.27218	-2.03329
O	5.61686	5.72157	-1.90541
H	-2.10966	-0.75445	-4.96757
H	-4.14457	-0.24945	4.24972
H	-6.78682	0.06679	-5.89421
H	-11.05764	0.84324	-4.20162
H	3.11316	-1.76697	-2.93553
H	3.47969	-3.63370	1.80993
H	5.30432	0.01683	4.15673
H	4.44723	5.35238	4.32340
H	2.55499	6.09796	1.70895
H	1.67684	3.62545	3.77443
H	8.17575	-2.54336	1.76368
H	8.61686	2.67406	-3.63068
N	7.48223	-0.93575	1.07215
N	7.69331	2.03560	-2.11546

Table S1 (continuation).

FMA (S₀/S₁)_{CI}
CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d) geometry
Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.054212 au

C	-1.19124	-2.17284	0.86607
C	-0.56102	-0.52532	-1.12315
C	2.11963	-0.87036	-1.53179
C	2.96531	-2.67597	0.36773
C	-2.45653	0.86039	-2.30770
C	-4.95781	0.57372	-1.47616
C	-5.48592	-1.05945	0.51347
C	-3.62393	-2.45586	1.74887
C	-7.09812	1.87143	-2.61138
C	-9.43820	1.47061	-1.78625
C	-9.92979	-0.26684	0.31380
C	4.61407	0.60411	1.90014
C	4.40098	2.61768	-0.00755
C	2.70115	4.86074	0.44008
C	9.09856	0.11222	1.09289
C	6.55867	2.94983	-1.64598
O	0.81328	-3.45871	1.72295
O	-7.86933	-1.40372	1.33984
O	-11.94283	-0.73540	1.16038
O	11.08099	-0.83034	1.61554
O	6.65376	4.34550	-3.44193
H	-2.04365	2.11659	-3.85025
H	-4.10105	-3.72151	3.25630
H	-6.75332	3.15647	-4.14761
H	-11.06998	2.36677	-2.58481
H	3.07310	-0.45701	-3.30649
H	4.18060	-4.24384	-0.10183
H	3.25273	0.53898	3.41317
H	3.45014	6.24129	1.77333
H	2.43658	5.83567	-1.33966
H	0.85483	4.29626	1.13329
H	7.25789	-1.28339	4.10015
H	10.18434	1.68577	-2.19707
N	7.00996	-0.12427	2.62555
N	8.69796	1.50801	-1.04419

Table S1 (continuation).

PMA S₀ minimum
B3LYP/6-31G(d) geometry
Et [S₀ CASSCF(8e,8MOs)/6-31G(d)] = -1096.214330 au

C	-1.45194	-2.13038	-0.81535
C	-0.82922	0.44969	-1.06318
C	1.92354	0.65201	-1.76368
C	2.75171	-2.16715	-1.53893
C	-2.69877	2.24895	-0.76511
C	-5.18901	1.49297	-0.17888
C	-5.72276	-1.11278	0.07267
C	-3.86661	-2.96682	-0.24296
C	-7.25044	3.22659	0.18121
C	-9.60103	2.38685	0.74206
C	-10.14759	-0.29717	1.00680
C	4.15496	-1.52322	0.97001
C	3.89664	1.34553	0.36282
C	3.08689	3.09683	2.51194
C	8.81686	-1.36368	0.41307
C	6.25220	2.43856	-0.90305
O	0.53964	-3.71598	-1.22947
O	-8.09207	-1.93540	0.63880
O	-12.16536	-1.23607	1.50514
O	10.91299	-2.30572	0.51061
O	6.23275	4.47942	-1.96730
H	-2.28252	4.24952	-0.97546
H	-4.32796	-4.95261	-0.05559
H	-6.88308	5.24043	-0.00750
H	-11.18915	3.64851	1.02273
H	2.23214	1.64685	-3.54850
H	3.92651	-2.98078	-3.02628
H	2.95730	-2.05277	2.56999
H	4.51317	3.11451	4.01421
H	2.86477	5.02983	1.81347
H	1.29248	2.46869	3.32432
H	6.96004	-4.15724	2.17504
H	10.00588	1.75825	-1.53892
N	6.68598	-2.41746	1.43282
N	8.42565	0.99025	-0.77209

Theoretical Insight into the Intrinsic Ultrafast Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA: Thymine versus Cytosine

Juan José Serrano-Pérez, Israel González-Ramírez, Pedro B. Coto, Manuela Merchán, and Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

Received: July 30, 2008

The higher formation yields measured in the ultrafast photoinduced formation of cyclobutane thymine dimers ($T \leftrightarrow T$) with respect to those of cytosine ($C \leftrightarrow C$) are explained, on the basis of ab initio CASPT2 results, by the existence in thymine of more reactive orientations and a less efficient photoreversibility, whereas in cytosine the funnel toward the photolesion becomes competitive with that mediating the internal conversion of the excited-cytosine monomer.

Among the possible photoreactions that pyrimidine bases of nucleic acids may undergo on ultraviolet (UV) irradiation, cyclobutane thymine dimers ($T \leftrightarrow T$) formed by intrastand adjacent thymine bases constitute one of the major photoinduced lesions, particularly in cellular DNA.¹ Despite the fact that there are repair mechanisms for photodamaged sections of the DNA sequence, the UV irradiation of cells can result in mutation or death. In contrast to thymine–thymine (TT) sites, which are not actual mutational hot spots, cytosine–cytosine (CC) sequences are sources of relatively frequent CC-to-TT tandem mutations, although the corresponding photoproducts ($C \leftrightarrow C$) are produced with relatively lower yields.¹ Femtosecond spectroscopy has proved that thymine dimerization is an ultrafast photoreaction in which $T \leftrightarrow T$ dimers are fully formed ~ 1 ps after UV illumination, pointing to an excited-state reaction that is approximately barrierless for bases that are properly oriented at the instant of light absorption.² From a theoretical standpoint, relevant aspects of the $[2 + 2]$ cycloaddition photoreaction forming the respective cyclobutane pyrimidine dimers have been analyzed for both thymine^{3,4} and cytosine.⁵ The concerted nonadiabatic photoreaction is mediated by a conical intersection (CI) involving the lowest singlet excited and the ground state, hereafter (S_1/S_0)_{CI}, which is related to the expected funnel for ultrafast nonradiative decay leading to $T \leftrightarrow T$ and $C \leftrightarrow C$. There is, however, an elusive question still open. *Why is the photo-induced formation of $T \leftrightarrow T$ globally more efficient than that producing $C \leftrightarrow C$?* Since the efficiency of the photodimerization markedly depends on the experimental conditions, the sequence of nucleotides, and the type (A-, B-like) of DNA conformation, the full response to this question is truly challenging. In order to get further insight into this complex issue, in the present contribution, we focus on whether the distinct photochemical behavior of TT and CC sites can be understood on the basis of the intrinsic molecular characteristics of the systems. The present research anticipates that *the relative stability of the formed excimers with respect to the placement of (S_1/S_0)_{CI} is the main*

effect responsible at the molecular level for the different efficiency observed in the production of $T \leftrightarrow T$ versus $C \leftrightarrow C$.

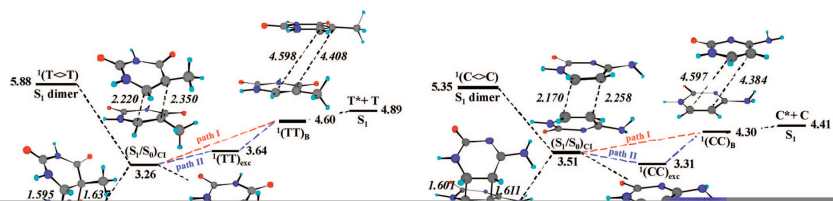
The results discussed next were obtained by using the CASPT2 method with the active space of 12π active electrons/ 12π active orbitals, including the basis set superposition error (BSSE) through the counterpoise (CP) correction, CASPT2(12,12)+BSSE results. The ANO-S basis set with the contraction scheme C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] was employed throughout. Geometry optimizations were carried out for the ground state of the $T \leftrightarrow T$ dimer, for a delocalized excimer ${}^1(TT)_{exc}$, and the crossing (S_1/S_0)_{CI} (see the Supporting Information for details). In addition, the lowest-lying excited states were computed at the geometrical arrangements of the B-form DNA, (TT)_B. All of the calculations were performed using the MOLCAS-6.0 package.^{6–8} Figure 1 compiles the main findings for TT. For proper comparison, results on CC at the same level are also included.⁵

The CP-corrected binding energy (CP- E_b) for the ${}^1(TT)_B$ state is computed to be 0.29 eV, about 3 times larger than that obtained for ${}^1(CC)_B$.⁵ At the TT ground-state B-form DNA, the transition to the lowest excited singlet state (4.60 eV) becomes, as expected, slightly red-shifted as compared with the lowest singlet–singlet transition of the monomer (4.89 eV).⁹ On the other hand, the S_2-S_1 gap is 0.1 eV larger for TT than that for CC, reflecting a more efficient coupling between the two states in the former. If the TT system is in the B-form DNA at the time of irradiation, the pathway from ${}^1(TT)_B$ toward the funnel (S_1/S_0)_{CI} (path I in Figure 1) can be related to the actual decay path taking place in the biopolymer, which is predicted to be barrierless on the basis of the energy calculations derived from the linearly interpolated structures between those two geometries.⁴ This also holds true for B-like arrangements energetically close to the B-form. Since DNA has a highly flexible backbone, motions such as the rise of stacking, torsional oscillation, and helix bending will continuously bring a given bipyrimidine pair into a favorable geometry for dimerization. Clearly, π -stacking facilitates formation of excimer states. In particular, the most favorable structure for producing a fully stabilized excimer corresponds to the idealized sandwich geometry.⁵ The relaxed

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: Luis.Serrano@uv.es.

Letters

J. Phys. Chem. B, Vol. 112, No. 45, 2008 14097



14098 *J. Phys. Chem. B*, Vol. 112, No. 45, 2008

Letters

whereas, for TT, the decay of the excited monomer becomes relevant only for unstacked thymine bases. By following these general guidelines, a number of designed derivatives can be envisaged with potential use in different areas of interest, from health care phototherapeutic treatments to industrial technological oriented purposes.

Acknowledgment. The research reported has been supported by the MEC-FEDER projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio, and Juan de la Cierva programme (PBC).

Supporting Information Available: Computational details and Cartesian coordinates (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- (1) Douki, T.; Cadet, J. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495.
- (2) Schreier, W. J.; Schrader, T. E.; Soller, F. O.; Gilch, P.; Crespo-Hernández, C. E.; Swaminathan, V. N.; Carell, T.; Zinth, W.; Kohler, B. *Science* **2007**, *315*, 625.

- (3) Boggio-Pasqua, M.; Groenhof, G.; Schäfer, L. V.; Grubmüller, H.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10996.
- (4) Blancafort, L.; Mignani, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14540.
- (5) Roca-Sanjuán, D.; Olaso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10768.
- (6) Andersson, K.; Barysz, M.; Bernhardtsson, A.; Blomberg, M. R. A.; Carissan, Y.; Cooper, D. L.; Cossi, M.; Fülischer, M. P.; Gagliardi, L.; de Graaf, C.; Hess, B.; Hagberg, G.; Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Nakajima, T.; Neogrády, P.; Olsen, J.; Raab, J.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Schimmler, B.; Schütz, M.; Seijo, L.; Serrano-Andrés, L.; Siegbahn, P. E. M.; Ståhring, J.; Thorsteinsson, T.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O. *MOLCAS, version 6.4*; Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund: Lund, Sweden, 2006.
- (7) Karlström, G.; Lindh, R.; Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O.; Ryde, U.; Veryazov, V.; Widmark, P.-O.; Cossi, M.; Schimmler, B.; Neogrády, P.; Seijo, L. *Comput. Mater. Sci.* **2003**, *28*, 222.
- (8) Veryazov, V.; Widmark, P. O.; Serrano-Andrés, L.; Lindh, R.; Roos, B. O. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *100*, 626.
- (9) Merchán, M.; González-Luque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471.
- (10) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B. *Nature* **2005**, *436*, 1141.
- (11) Plessow, R.; Brockhinke, A.; Eimer, W.; Kohse-Höinghaus, K. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3695.

JP806794X

**Theoretical Insight into the Intrinsic Ultrafast Formation of
Cyclobutane Pyrimidine Dimers in UV-Irradiated DNA:
Thymine versus Cytosine**

Juan José Serrano-Pérez, Israel González-Ramírez, Pedro B. Coto, Manuela Merchán,
Luis Serrano-Andrés*

*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071
Valencia, Spain*

Luis.Serrano@uv.es

Supporting Information

* Autor to whom correspondence should be addressed: Luis.Serrano@uv.es

Computational details

a. CASSCF and CASPT2 calculations.

Geometry optimizations of the ground-state T \leftrightarrow T dimer and the delocalized excimer $^1(\text{TT})_{\text{exc}}$ have been studied by using the complete-active-space self-consistent-field (CASSCF) method comprising as active space a total of 16 π electrons distributed among 14 π molecular orbitals (MOs). The totally symmetric π MO of each thymine was kept inactive. In order to mimic the actual interaction of pyrimidines in DNA, geometry optimization has been carried out within C_s symmetry constraints, allowing so for an effective and natural interaction of two thymine molecules in the biologically relevant cis-syn stereoisomer. At the optimized geometries, the energies were computed with no symmetry restrictions (C_1 symmetry), since wave function symmetry breaking is a prerequisite to describe correctly the asymptotic limit for the lowest electronic singlet transition of the two moieties. It is said that the calculation breaks symmetry when the computed electronic wave function has lower symmetry than that implied by the nuclear coordinates. For the computations in C_1 symmetry, two additional π MOs were also kept inactive, since the occupation number of the corresponding natural orbitals when they were treated as active was practically 2.0. A CASSCF wave function of 12 active π electrons and 12 active π MOs was therefore employed, hereafter denoted as CASSCF(12,12). In this contribution conical intersection crossings were obtained as minimum energy crossing points (MECPs), obtained by using the restricted Lagrange multipliers technique as included in the MOLCAS-6.0 package¹ in which the lowest-energy point was obtained under the restriction of degeneracy between the two considered states.² In addition, an standard arrangement has been employed for the B-form DNA, $(\text{TT})_{\text{B}}$.³

Using the C_1 state-average CASSCF(12,12) wave functions for three roots, dynamic electron correlation has been subsequently taken into account perturbatively at the second-order level through the CASPT2 method,^{4,5,6} labeled as CASPT2(12,12). In order to minimize weakly interacting intruder states, the imaginary level-shift technique, with $\text{IMAG}=0.2$ au, has been employed.⁷ The reported CASPT2 $(S_1/S_0)_{\text{CI}}$ conical intersection

was obtained by exploring a grid of points along the distortions that involve the smallest values for the CASSCF(12,12) gradients in the region of the crossing.⁸ The obtained structure is consistent with previously obtained CASSCF results⁹ but having larger intermonomer distances, as it occurs in ethene dimer,^{8,10} an effect that is directly related to inclusion here of dynamic correlation.

The basis set of Atomic Natural Orbital (ANO) type with the contraction scheme C,N,O[3s2p1d]/H[2s1p] was used throughout.¹¹ Basis set superposition error (BSSE) was taken into account by using a modified counterpoise (CP) approach based on localized molecular orbitals, specifically designed for correlated approaches (see next section).¹² The results discussed shall be generically denoted as CASPT2(12,12)+BSSE and the corresponding CP-corrected binding energy as CP- E_b .

All the computations have been carried out by using the MOLCAS 6.0 quantum-chemical software.¹

b. Basis Set Superposition Error.

The inclusion of the basis set superposition error (BSSE) is crucial to accurately describe binding energies.¹³ Here the effect was taken into account by using the counterpoise correction (CP).¹⁴

The binding energy (E_b) was obtained as follows:

$$E_b(TT^*) = E_T + E_{T^*} - E_{T^*T} \quad (1)$$

with E_T , E_{T^*} , being the total energies of the ground (T), and excited state (T^*) of thymine, both at the equilibrium geometry of the ground-state thymine, and E_{T^*T} representing the total energy of dimer T^*T at a given geometry. The corrected counterpoise binding energy (CP- E_b) comes from the expression:

$$CP-E_b(T^*T) = E_b(T^*T) - [CP-BSSE(T^*T)] \quad (2)$$

where

$$\begin{aligned} \text{CP-BSSE (T}^*\text{T)} = E_{T^*}(\text{T}, \text{R}=\infty) - E_{T^*}(\text{T}, \text{R}=\text{T}^*\text{T}) + \\ E_{\text{T}}(\text{T}^*, \text{R}=\infty) - E_{\text{T}}(\text{T}^*, \text{R}=\text{T}^*\text{T}). \end{aligned} \quad (3)$$

In [CP-BSSE (T*T)] the geometry of the monomers is kept to that of the dimer. Thus, the notation $E_{T^*}(\text{T}, \text{R}=\text{T}^*\text{T})$ indicates the energy of T* computed in the ghost orbitals of T at the geometry of T*T, whereas in $E_{T^*}(\text{T}, \text{R}=\infty)$ the ghost MOs of T are at infinity distance of T*. In this manner the influence of the variation of geometry is accounted for in the BSSE treatment. The findings discussed correspond to CASPT2 results with inclusion of BSSE.

c. Geometries

Table S1 compiles the optimized geometries and their computed CASPT2 energies.

References

- ¹ Andersson, K., Barysz, M., Bernhardsson, A., Blomberg, M. R. A., Carissan, Y., Cooper, D. L., Cossi, M., Fülcher, M. P., Gagliardi, L., de Graaf, C., Hess, B., Hagberg, G., Karlström, G., Lindh, R., Malmqvist, P.-Å., Nakajima, T., Neogrády, P., Olsen, J., Raab, J., Roos, B. O., Ryde, U., Schimmelpfennig, B., Schütz, M., Seijo, L., Serrano-Andrés, L., Siegbahn, P. E. M., Stålring, J., Thorsteinsson, T., Veryazov, V., Widmark, P. -O. *MOLCAS, version 6.0*, Department of Theoretical Chemistry, Chemical Centre, University of Lund, P.O.B. 124, S-221 00 Lund: Sweden, 2006.
- ² De Vico, L.; Olivucci, M.; Lindh, R. *J. Chem. Theory Comp.* **2005**, *1*, 1029-1037.
- ³ Lu, X.-J.; Olson, W. K. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5108-5121.
- ⁴ Andersson, K., Malmqvist, P.-Å.; Roos, B. O. *J. Chem. Phys.* **1992**, *96*, 1218-1226.
- ⁵ Roos, B. O., Andersson, K., Fülcher, M. P., Malmqvist, P.-Å., Serrano-Andrés, L., Pierloot, K., Merchán, M. *Adv. Chem. Phys.* **1996**, *93*, 219-331.
- ⁶ Merchán, M.; Serrano-Andrés, L. In *Computational Photochemistry*, ed. Olivucci, M., Elsevier, Amsterdam, 2005.
- ⁷ Forsberg, N.; Malmqvist, P.-Å. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *274*, 196-204.
- ⁸ Roca-Sanjuán, D.; Olaso-González, G.; González-Ramírez, I.; Serrano-Andrés, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, in press.
- ⁹ Boggio-Pasqua, M.; Groenhof, G.; Schäfer, L. V.; Grubmüller, H.; Robb, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10996-10997.
- ¹⁰ Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Lindh, R. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 104107.
- ¹¹ Pierloot, K., Dumez, B., Widmark, P.-O.; Roos, B. O. (1995) *Theor. Chim. Acta* **1995**, *90*, 87-114.
- ¹² Van Duijneveldt, F. B., Van Duijneveldt-Van de Rijdt, J. G. C. M.; Van Lenthe, J. H. *Chem. Rev.* **2004**, *94*, 1873-1885.
- ¹³ Olaso-González, G.; Roca-Sanjuán, D.; Serrano-Andrés, L.; Merchán, M. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 231102.
- ¹⁴ Boys, S. F.; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 65-73.

Table S1. Cartesian coordinates x, y, z (in Å) of the stationary points optimized for the cytosine-cytosine dimer. CASPT2(12,12) total energy (Et) is also included.

S ₀ Thymine CASSCF(8e,7MOs)/ANO-S N,C,O[3s2p1d]/H[2s1p]			
C ₁ symmetry			
Two thymine molecules at about 22 Å, Et: -905.842746 au			
N	-0.732356	1.031478	1.499145
N	-1.118134	-1.240959	1.499349
C	-1.663092	0.015776	1.499908
C	0.247451	-1.477747	1.500391
C	1.154751	-0.484077	1.499508
C	2.641891	-0.702205	1.500204
C	0.648709	0.902545	1.499442
O	1.352132	1.876155	1.500610
O	-2.843758	0.219643	1.500798
H	0.529155	-2.517058	1.501808
H	-1.101588	1.961794	1.499721
H	-1.768089	-1.997177	1.498473
H	2.871350	-1.765157	1.494060
H	3.095037	-0.250930	2.380649
H	3.096774	-0.240693	0.626048

S ₀ T\leftrightarrowT CASSCF(16e,14MOs)/ANO-S N,C,O[3s2p1d]/H[2s1p]			
C _s symmetry (1 ¹ A')			
symmetry distinct nuclear coordinates			
Et: -905.871904 au			
N	-0.663032	1.034929	1.687450
N	-1.060511	-1.250889	1.493713
C	-1.557050	-0.016821	1.808581
C	0.165186	-1.500364	0.797693
C	1.199282	-0.351630	0.818750
C	2.523897	-0.707456	1.493337
C	0.689844	0.949306	1.423407
O	1.409690	1.882208	1.629656
O	-2.676235	0.161052	2.191298
H	0.589352	-2.426619	1.176232
H	-0.991511	1.910444	2.049657
H	-1.757302	-1.967895	1.502049
H	2.913191	-1.650289	1.121174
H	2.366217	-0.807822	2.566969
H	3.259216	0.073234	1.327812

Table S1 (continuation).

${}^1(\text{TT})_{\text{exc}}$ CASSCF(16e,14MOs)/ANO-S N,C,O[3s2p1d]/H[2s1p]			
C _s symmetry (1 ¹ A ⁺)			
Symmetry distinct nuclear coordinates. Et: -905.763511 au			
N	-0.690402	1.005415	1.678946
N	-1.038640	-1.279440	1.503768
C	-1.589768	-0.014225	1.726182
C	0.255607	-1.509223	1.190208
C	1.213985	-0.445747	1.324791
C	2.653161	-0.755307	1.632312
C	0.714226	0.872395	1.634770
O	1.386410	1.849858	1.854621
O	-2.762095	0.109610	1.924902
H	0.573793	-2.537725	1.277865
H	-1.050281	1.922076	1.863143
H	-1.701012	-2.029394	1.541463
H	2.959491	-1.696647	1.181048
H	2.817442	-0.833152	2.711560
H	3.298194	0.033500	1.258784
$(\text{S}_1/\text{S}_0)_{\text{CI}}$ CASPT2(12e,12MOs)/ANO-S N,C,O[3s2p1d]/H[2s1p]			
C ₁ symmetry			
Et: -787.615430 au			
N	-1.586509	-0.762859	1.035520
N	0.601105	1.836724	0.935071
N	-1.574258	-1.085655	-1.268716
N	-0.474168	1.805148	-1.129034
C	-2.303789	-0.761344	-0.136622
C	-0.461589	2.268135	0.160892
C	-0.204711	-1.201709	-1.278956
C	0.443879	0.886483	-1.662139
C	0.448362	-1.590449	-0.009889
C	1.471430	0.376338	-0.788221
C	1.422267	-2.747310	0.033472
C	2.722856	-0.162422	-1.417427
C	-0.328674	-1.359972	1.209969
C	1.611573	0.972227	0.556133
O	0.040338	-1.639826	2.320221
O	2.538846	0.742898	1.281807
O	-3.466261	-0.490408	-0.202444
O	-1.303787	2.995501	0.600121
H	0.208146	-1.604691	-2.185655
H	0.656099	0.994170	-2.716163
H	-2.125853	-0.604634	1.865804
H	0.638885	2.201934	1.866729
H	-2.058402	-0.923889	-2.127567
H	-1.285539	2.066501	-1.651431
H	1.953028	-2.851814	-0.907793
H	3.333424	0.685195	-1.736233
H	0.902850	-3.688475	0.233672
H	2.498767	-0.762334	-2.297095
H	2.147820	-2.596394	0.829002
H	3.292271	-0.746922	-0.708417



Singlet oxygen generation in PUVA therapy studied using electronic structure calculations

Juan José Serrano-Pérez, Gloria Olaso-González, Manuela Merchán, Luis Serrano-Andrés*

Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València, Apartado 22085, ES-46071 Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2009

Accepted 22 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Phototherapy

Furocoumarins

Energy transfer

Singlet oxygen generation

PDT

ABSTRACT

The ability of furocoumarins to participate in the PUVA (Psoralen + UV-A) therapy against skin disorders and some types of cancer, is analyzed on quantum chemical grounds. The efficiency of the process relies on its capability to populate its lowest triplet excited state, and then either form adducts with thymine which interfere DNA replication or transfer its energy, generating singlet molecular oxygen damaging the cell membrane in photoactivated tissues. By determining the spin-orbit couplings, shown to be the key property, in the intersystem crossing yielding the triplet state of the furocoumarin, the electronic couplings in the triplet-triplet energy transfer process producing the singlet oxygen, and the reaction rates and lifetimes, the efficiency in the phototherapeutic action of the furocoumarin family is predicted as: khellin < 5-methoxypsoralen (5-MOP) < 8-methoxypsoralen (8-MOP) < psoralen < 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP) < 3-carbethoxypsoralen (3-CPS), the latter being the most efficient photosensitizer and singlet oxygen generator.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photomedicine applies the principles of photobiology, photochemistry, and photophysics to the diagnosis and therapy of diseases. One of the most active research areas in this field is photodynamic therapy (PDT), in which the affected living tissue is treated with a combination of a photosensitizer, activated by UV light, and molecular oxygen [1–3]. Utility of light in the medical field as a therapeutic tool traces its origin back to several thousands years, but the development of Phototherapy did not reach its heyday until the 20th century [4–6]. In particular for PDT, it was in 1976 that Weishaupt et al. [7] made a breakthrough postulating that singlet oxygen is the cytotoxic agent responsible for the photoinactivation of tumor cells. In PDT, unlike in radiation therapy, DNA is not the major target because photosensitizers tend to localize at the cell membranes. Future advances in the application of PDT rely on understanding the nature of the interaction of light, photosensitizer, and tissue [8–11].

Among the several groups of molecules with photosensitizing ability for PDT [4], we will focus the present research on furocoumarins (psoralens), a family of heterocyclic compounds protagonists of the PUVA (Psoralen + UV-A) therapy [12–15]. This technique, which is nowadays providing successful treatments against many diseases such as skin disorders (psoriasis, vitiligo) as well as some forms of cancer, is known to have a two-fold type

of therapeutic mechanism. Furocoumarins are known to exert their photosensitizing ability by reacting with thymine and forming adducts, interfering DNA replication in the affected cell [16]. Additionally, these compounds also interact with molecular oxygen in its triplet ground state ($^3\text{O}_2$) to produce singlet excited state ($^1\text{O}_2$) oxygen, a extremely reactive and cytotoxic species [17–23], together with the simultaneous generation of other radicals such as O_2^- or HO_2 [17]. These systems induce photooxidation of lipids and are considered responsible for cell membrane damaging effects, causing also the appearance of erythema and pigmentation activity in the human skin [18]. The relative contribution of one (adduct formation) or other (singlet oxygen generation) process to the effectiveness of the PUVA therapy is still unclear. It has been observed that molecular oxygen quenches the photochemical reaction between psoralens and thymine [20,24], whereas there are evidences indicating that the binding of 8-methoxypsoralen (8-MOP) to double stranded poly-(dA-dT) inhibits the furocoumarin ability to sensitize via singlet oxygen generation [20]. In some cases, however, furocoumarins are described to produce $^1\text{O}_2$ even when complexed with or covalently bound to DNA [25]. In principle both mechanisms can be expected to be competitive, not synergic, although higher values of singlet oxygen production have been reported for complexed furocoumarins than for the free compounds for psoralen, 8-MOP, and 5-methoxypsoralen (5-MOP) [26,27].

The yield of formation and activity of singlet oxygen from the different furocoumarins has been estimated by several research groups, but no agreement has been reached due to the problems

* Corresponding author. Tel.: +34 963544427; fax: +34 963543274.
E-mail address: Luis.Serrano@uv.es (L. Serrano-Andrés).

in evaluating the generation of the species in different conditions and the simultaneous production of other oxygen radicals [17]. In the family of the most common furocoumarins (see Fig. 1) psoralen and, mainly, 3-carbethoxypsoralen (3-CPS) are typically considered the most effective producers of $^1\text{O}_2$ in aqueous solution [17,18,20,28,29]. The situation is less clear for khellin, 8-MOP, 5-MOP, and 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP) [17,18,26–31]. Previously, by using *ab initio* quantum chemical electronic structure methods, we studied the ability of furocoumarins to populate their lowest-lying triplet state and its behavior as efficient photosensitizers [32–35], as well as the mechanisms of formation of psoralen-thymine adducts [16]. In the present contribution we aim to analyze the mechanisms to generate reactive singlet oxygen by furocoumarins and, from this point of view, to estimate the best photosensitizer for photodynamic therapy.

The interaction of molecular oxygen and organic molecules is believed to be produced through the so-called excitation energy transfer (ET) mechanism through the furocoumarin in its lowest triplet long-lifetime excited state, behaving as a photosensitizer, and the molecular oxygen, initially in its triplet ground state, $^3\Sigma_g^-$. Oxygen is present in the cellular environment ready to transform into singlet oxygen $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), which is a strong electrophilic species that reacts with different compounds [36], including some components of the cellular membrane causing cell death by apoptosis [37]. The ET process is triggered by electronic coupling be-

tween a molecule in an excited state, the donor (D^*), and a molecule, the acceptor (A) or quencher within a collision complex [38–46], a mechanism that strongly depends on the interfragment distance. At large separation between the moieties (20–30 Å or even larger) the electronic coupling arises from the Coulomb interaction between electronic transitions that, under the dipole approximation, reduces to the known Förster's dipole–dipole coupling [47]. The process is actually a non-radiative transfer of excitation occurring whenever the emission spectrum of D overlaps with the absorption spectrum of A (although no intermediate photon takes part on it). It is the electric field around D^* , behaving like a field generated by a classical oscillating dipole, that causes the excitation of A [48–52]. At larger separations than Förster's, fluorescence resonance ET (with photon emission by D^* and subsequent absorption by A) becomes more efficient than excitation ET [53]. At shorter interfragment distances, however, the so-called Dexter exchange coupling predominates, arising from the exchange integrals that account for the indistinguishability of the electrons in many-electron wave functions. This factor decreases steeply with separation [54]. If the interaction is assumed weak and overlap between D^* and A wave functions is produced, Fermi's Golden Rule for coupled transitions can be applied. Such processes have been studied theoretically in depth in recent years, in particular for singlet–singlet ET processes [55–59], which implies an exchange of electrons of the same spin but different energies, that is,

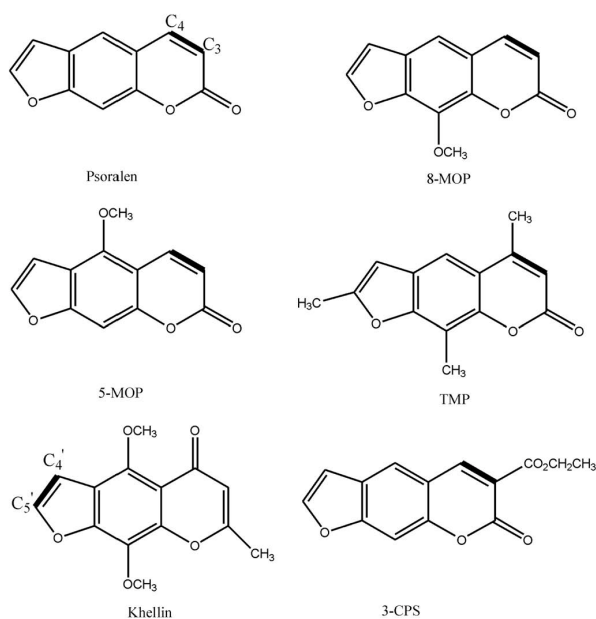


Fig. 1. Studied furocoumarins: psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP), 5-methoxypsoralen (5-MOP), 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP), khellin, and 3-carbethoxypsoralen (3-CPS). The most reactive double bond in the triplet state of the furocoumarin is highlighted in bold.

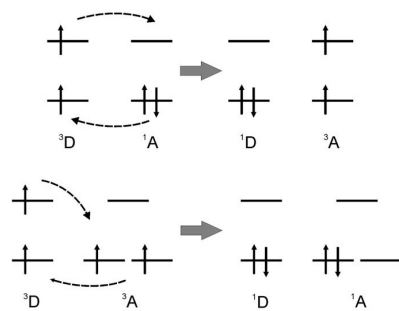


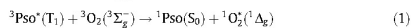
Fig. 2. Examples of TET, which can be understood as two simultaneous electron transfers between the donor (D) and the acceptor (A) with exchange of spin and energy in each fragment.

the spin state of each fragment is conserved. In PDT the actual mechanism is, on the other hand, an intermolecular triplet–triplet energy transfer (TET), that is, a process of exchanging both spin and energy between a pair of molecules or molecular fragments. This type of reactions are commonly used to efficiently populate the triplet states of many organic molecules [60–62].

TET processes can be therefore understood as two simultaneous ETs with spin exchange between the interacting fragments (see Fig. 2) [63] and it is similar to the Dexter coupling for singlet–singlet ET, in particular because, as it depends on an electron exchange mechanism, it only takes place at short donor–acceptor distances ($<10 \text{ \AA}$) [47,53]. In TET the Förster's mechanism will not contribute, because at short distances the dipole approximation breaks down and because the transitions are dipole forbidden [63]. The electronic coupling is not the only key factor that determines the efficiency of the ET process, but also the resonance condition, that is, the energy available in the donor must be at least equal or higher than that required to populate the excited state of the acceptor. If this is the case, the process is usually controlled by diffusion and described as exothermic. In the opposite situation, that is, if the energy of the acceptor is lower than that of the donor, the process becomes thermally activated and lies in the endother-

mic region. That means that there is an energy barrier whose height will depend on the nature of the acceptor, either classical (for rigid systems) or non-classical (flexible systems which might find conformations for efficient, non-vertical TET), with a corresponding larger or smaller, respectively, decay in the process rate [64].

In particular, the TET process taking place between psoralen and molecular oxygen is:



where activated psoralen behaves as a donor in its lowest triplet state, and triplet ground state oxygen is the acceptor. The lowest excited singlet state of molecular oxygen (${}^1\Delta_g$) is located at 0.97 eV [2,65–67]. Furocoumarins (psoralen, 8-MOP, 5-MOP, khellin, TMP, and 3-CPS) have their lowest-lying triplet T_1 state energy at least 1.4 eV higher than the oxygen singlet state, what makes the TET exothermic and diffusion-controlled, with molecular oxygen behaving as a rigid, classical acceptor [64]. Fig. 3 displays a scheme of the TET process for singlet oxygen generation from a triplet photosensitized psoralen molecule.

As mentioned above, our aim is to analyze the different factors taking part in the TET mechanism between furocoumarins and molecular oxygen in order to estimate the extent of singlet oxygen generation in PUVA therapy. Two basic aspects must be taken into account. Firstly, the rates for triplet energy transfer donor–acceptor will be estimated through the magnitudes of the corresponding electronic couplings by computing the potential energy curves of the system $\text{M}-\text{O}_2$ with respect to the interfragments distance (M is the furocoumarin molecule). Calculations on model systems will be performed to determine the adequacy of the procedure and the employed geometrical arrangements. Secondly, and as the efficiency of the reaction also relies on the ability of the photosensitizer to reach its lowest triplet excited state, the triplet population rate can be roughly estimated by using the spin–orbit coupling factor for the related intersystem crossing process in the furocoumarin. Accurate *ab initio* multiconfigurational second-order perturbation theory, the CASSCF/CASPT2 method, is used to compute electronic energies and spin–orbit coupling terms.

2. Methods and computational details

Using CASSCF multiconfigurational wave functions as reference, the second-order perturbation theory through the CASPT2 method (in its original zeroth-order Hamiltonian formulation) was employed to include dynamic correlation energy in the calculation

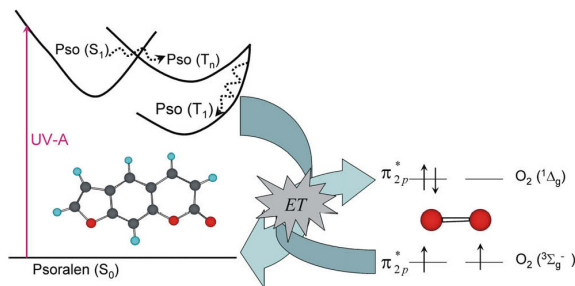


Fig. 3. Scheme of the oxygen-dependent PUVA mechanism. See text.

of the electronic excited states [68]. Such method has become particularly popular and has been successfully applied to elucidate the spectroscopy of organic and inorganic systems, including many biomolecules, yielding an advantageous ratio between the quality and the computational cost for the description of excited states in systems of relatively large molecular size [69–75]. The imaginary level-shift technique was employed in order to prevent the effect of intruder states, using a shift parameter of 0.3 au [76].

In order to analyze reaction rates for electron transfer in the organic molecule–molecular oxygen (M–O₂) photosystem we have at least to estimate the electronic coupling at some specific arrangement of the moieties. Looking for an appropriate arrangement yielding the most effective TET process is nontrivial and, in general, not even relevant, in particular in diffusion-controlled systems which may form a collision complex at short distances. It is important, however, to estimate reaction rates and lifetimes at different intermolecular distances. Furthermore, M–O₂ interaction potentials are very weak, and the potential surfaces are generally characterized by multiple shallow minima. Hence it is necessary to consider different orientations when approaching M and O₂ through a basic interfragment coordinate, here the distance *R* [77]. To find which orientation becomes the most favorable for an effective TET we have performed an initial exploration taken three molecular systems as models, studying how the relative orientation of both fragments (donor and acceptor) affects the ET process. In particular, we have studied the systems formed by two ethylene molecules (Et–Et), by the methaniminium cation and ethylene (MetN⁺–Et), and by ethylene and molecular oxygen (Et–O₂). We have computed the coupling between the states involved in the TET for the arrangements displayed in Fig. 4, named *face-to-face* (FF), used in the three cases, *side-by-side* (SS), used for Et–Et and Et–O₂, and *perpendicular* (PP), used only for Et–O₂.

The CASPT2 energies of the four lowest-lying singlet states and the three lowest-lying triplet states were obtained for Et–Et, MetN⁺–Et, and Et–O₂, at each arrangement and intermolecular distance considered. The active space used for the Et–Et and MetN⁺–Et supermolecules comprises the π orbitals and electrons, that is, 4 electrons/4 orbitals. Regarding the Et–O₂ supermolecule, 14 electrons and 10 orbitals have been employed as active space (8 of them correspond to the valence orbitals of each oxygen and 2 are the π orbitals of ethylene). The geometry for molecular oxygen in its triplet ground state was taken from experiment [78], whereas the ethylene molecule and the methaniminium cation (CH₂–

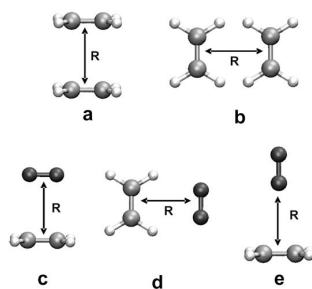


Fig. 4. Supermolecule arrangements employed for the ethylene–ethylene (Et–Et), methaniminium cation–ethylene (MetN⁺–Et), and ethylene–oxygen (Et–O₂) triplet–triplet energy transfer (TET) processes: (a) Et–Et and MetN⁺–Et face-to-face (FF), (b) Et–Et side-by-side (SS), (c) Et–O₂ FF, (d) Et–O₂ SS, and (e) Et–O₂ perpendicular (PP).

NH₂⁺) were optimized at the CASSCF level by using the π orbitals and electrons as active space. Both molecular structures were used unaltered in the different arrangements considering the general rigid character of these systems in ET processes [64]. The ANO-L one-electron basis set contracted as C,O,N[4s3p2d1f]/H[2s1p] was employed in the calculations of the Et–Et, MetN⁺–Et, and Et–O₂ model systems.

Using the information obtained from the model calculations, the supermolecule furocoumarin–O₂ was built placing the molecular oxygen at different distances with respect to the furocoumarin in a parallel FF orientation with respect to the reactive double bond (see Fig. 1). According to our previous studies [16,32–35], the furocoumarin in its long-lifetime and reactive lowest triplet state localizes the spin density in the C₃=C₄ double bond of the pyrone moiety (except for khellin). The geometries of both furocoumarin and molecular oxygen were kept fixed at the CASSCF optimized triplet excited (T₁) state structure [32–35] and the triplet ground (³Σ_g[−]) state experimental geometry [78], respectively. The active space employed in all cases (furocoumarin + O₂) was 14 electrons/11 orbitals (8/7 located in the furocoumarin and 6/4 located in O₂). The active space was validated after comparing the results with previous findings in the isolated furocoumarins [32–35] and control calculations on the oxygen molecule with larger active spaces and basis sets. The four lowest singlet states and the three lowest triplet states of the supermolecule were computed. No symmetry restrictions were imposed and the ANO-L basis set with the contraction scheme C,O[4s3p1d]/H[2s1p] was employed as in our previous studies in isolated furocoumarins [32–35].

In the weak coupling regime in which the electronic interaction is smaller than the vibrational reorganization energy, the rate for triplet–triplet energy transfer (k_{TET}), and the corresponding lifetime (τ_{TET}), between the donor and the acceptor can be estimated using Fermi's Golden Rule [53,63]:

$$k_{\text{TET}} = \frac{1}{\tau_{\text{TET}}} = \frac{4\pi^2}{\hbar} |\langle \psi_f | H | \psi_i \rangle|^2 \rho_E = \frac{4\pi^2}{\hbar} (H')^2 \rho_E \quad (2)$$

where the matrix element of the Hamiltonian, H' , is the electronic part of the energy transfer (*i.e.*, the electronic coupling) and ρ_E is the density of states in the initial and final states and their spectral overlap. The inverse of the rate is the lifetime of energy transfer. To obtain the TET rates for the systems Et–Et, MetN⁺–Et, Et–O₂, and furocoumarin–O₂ we have taken values of $\rho_E = 0.1 \text{ eV}^{-1}$ and $(4\pi^2/\hbar) = 9.55 \times 10^{15} \text{ eV}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This order of magnitude for the value of the density of states was used previously as a good estimation in systems of this size [63].

The calculation of the electronic coupling matrix element H' is the crucial part in the determination of ET rates and lifetimes. The extent of the coupling controls the energy transfer process, specifically the passage from one state to another and it can be taken as a measure of the efficiency of the ET process. Different procedures to estimate the ET coupling have been developed [56,58,79] based on diabatic localized dimer calculations, monomer transition densities or transition dipole moments, and a supermolecule ansatz of the dimer [53], whereas generalization of such approaches to determine TET couplings are also available [63]. From all procedures, an energy gap based method such as supermolecule dimer approach, in which the value of the coupling is obtained as half of the splitting or perturbation between the interacting states, has been shown to be convenient and accurate [53,63]. It is clear that its accuracy strongly relies on the quality of the quantum chemical method used to perform the electronic structure calculations, something guaranteed in the present study by the highly reliable and accurate CASPT2 method. Notice that the Basis Set Superposition Error (BSSE) problem does not affect the results of the coupling, which uses energy differences between states

computed at the same geometry [16]. More specific details will be provided when describing the calculations on the different systems.

The whole process of generation of singlet oxygen from a photosensitized furocoumarin does not only depend on the efficiency of the TET from the triplet state of the furocoumarin, but also on the rate of formation of the triplet state itself. As shown in previous theoretical studies [32–35], in furocoumarins the crucial step to populate the triplet manifold in the gas phase is the intersystem crossing (ISC) process between the initially populated singlet $S_0(\pi\pi^*)$ state and the lowest-lying triplet $T_1(n\pi^*)$ state. The latter state evolves subsequently toward the lowest triplet $T_1(\pi\pi^*)$ state via a corresponding (and essentially barrierless and ultrafast) internal conversion (IC). In a similar manner as for Eq. (2), the estimation of the rate constant, here for nonradiative ISC (k_{ISC}), can be obtained as

$$k_{ISC} = \frac{4\pi^2}{h} |H_{SO}|^2 \rho_E \quad (3)$$

where H_{SO} stands for the spin-orbit coupling terms for the nonradiative transition $S_0(\pi\pi^*) \rightarrow T_1(n\pi^*)$. An estimated value of 200 eV^{-1} will be employed for ρ_E as used for psoralen in studies explicitly computing vibronic factors [80]. Additionally to the H_{SO} strength, the presence of energy barriers in the potential energy hypersurfaces may strongly affect the value of the rate constants, which can be corrected using the Arrhenius exponential term in the framework of the transition state theory [81–85]. As a qualitative estimation of these effects, a corrected ISC rate (k_{ISC}^c) can be obtained from:

$$k_{ISC}^c = k_{ISC} e^{-\Delta E/RT} \quad (4)$$

where k_{ISC} is that computed from Eq. (3), ΔE is the energy of the barrier from the initial electronic singlet to the triplet state, R is the ideal gas constant, and T the temperature (298 K). In this particular context, that is, in the calculation of rate constants that implicitly involve a collective behavior, ΔE will be estimated as the energy difference between the singlet $S_0(\pi\pi^*)$ state, populated at the Franck-Condon geometry, and the triplet $T_1(n\pi^*)$ state in the computed crossing point with the singlet state (S_0/T_1), considering that the energy obtained initially to populate S_0 will be available, at least, to surmount the barrier and populate T_1 . In case of excess energy, that is, negative barriers, we will consider the energy difference as zero. Spin-orbit coupling (H_{SO}) terms and energy barriers (ΔE) were determined previously for the family of furocoumarins (see Fig. 1) at the CASPT2 level [33–35]. All calculations reported here employed the Molcas 6.0 program package [86,87].

3. Results and discussion

3.1. Ethylene-ethylene triplet-triplet energy transfer

The potential energy curves of the ground and the three lowest-lying triplet excited states of the system Et-Et in two different arrangements (see Fig. 4), SS and FF, along the intermolecular distance are displayed in Fig. 5. The electronic coupling leading to the triplet-triplet energy transfer between the two lowest triplet states has been computed as half of the splitting between the states protagonist of the TET process ($^3\text{Et} + ^1\text{Et} \rightarrow ^1\text{Et} + ^3\text{Et}$), that is, the two lowest triplet states of the supermolecule, according to a two-state model described elsewhere [63]. For both orientations, at large intermolecular distances these states are degenerate

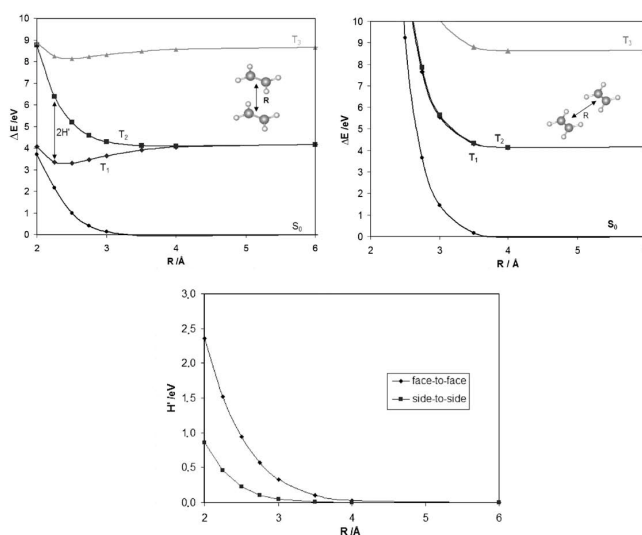


Fig. 5. CASPT2 potential energy curves of the ground and the three lowest triplet states of the Et-Et supermolecule in the face-to-face (top, left) and side-to-side (top, right) orientations. Included also (bottom) the dependence of the TET coupling (H) for the Et-Et system with the interfragment distance (R) and arrangement.

since both ethylene molecules do not interact. Once the intermolecular distance decreases, the behavior of the supermolecule is different for each arrangement. Whereas in the *FF* orientation, in which the two moieties are fully stacked, T_1 and T_2 become non-degenerated for distances smaller than 4.5 Å, pointing out a coupling between these states, in the *SS* orientation both triplet states remain extremely close in energy until distances near 3 Å.

The values for the coupling (H), computed as half of the energy gap between the lowest triplet states at each intermonomer distance, the rate constants (k_{TET}), and the lifetimes (τ_{TET}) for the TET process are collected in Table 1. These results share the same order of magnitude as reported elsewhere [63]. In previous studies it was established that the TET coupling and the attenuation rates were mainly determined by the relative contact area with respect to the size of molecular orbitals, irrespectively of the molecular size, and were strongly depending on the orientation [63]. In the *SS* arrangement, with a much smaller orbital overlap between the fragments, the TET coupling is roughly one order of magnitude lower than in the fully stacked *FF* orientation, which can be considered the optimal overlap, and therefore to yield an upper bound for the effectiveness of the TET coupling for conjugated molecules.

3.2. Methaninium cation–ethylene and ethylene– O_2 triplet–triplet energy transfer

In order to analyze the final furocoumarin– O_2 system, we have to move to models involving nonsymmetrical interacting moieties. The selected examples are the triplet–triplet energy transfer related with the deactivation process of the triplet state of the methaninium cation (donor) when interacting with ethylene (acceptor), $^3\text{MeN}^+ + ^1\text{Et} \rightarrow ^1\text{MeN}^+ + ^3\text{Et}$ and the triplet state of ethylene (donor) with oxygen molecule in its triplet ground state (acceptor), $^3\text{Et} + ^3O_2 \rightarrow ^1\text{Et} + ^1O_2$. In the former case the fragments are isolectronic with those of the Et–Et system and the two lowest triplet states of the molecule are involved in the TET process. However, the interaction is not symmetric and the triplet states are computed at 4.35 (Et) and 4.82 eV (MeN⁺) at infinite separation, where they localize on each of the moieties. Regarding the second model, the analysis of the CASSCF wave functions indicates that the states participating in the TET process are the S_1 and S_3 states of the Et– O_2 supermolecule, corresponding at infinite separation to Et(T_1) + $O_2(^3\Sigma_g^-)$ and Et(S_0) + $O_2(^1\Delta_g)$, respectively.

Unlike in the previous case (Et + Et), for asymmetric systems the resonance condition between the zeroth-order states is not generally fulfilled. As for electron transfer processes [88], two possibilities can be considered. First, to assume the validity of the Condon approximation, which neglects the variation of the coupling with respect to all molecular coordinates except for those which affect the main donor–acceptor separation distance [89]. A second alternative is to obtain the resonance condition and estimate the ET

couplings by including the variation of an external electric field. In practice, the field strength is scanned at the different intermolecular distances varying the geometry of the system with a selected coordinate leading to a decrease of the energy gap between the interacting states [63,90]. For diffusion-controlled processes in the exothermic region when a collision complex is formed and for classical rigid acceptors, such as molecular oxygen [64], it is unlikely that geometrical distortions at the different interfragment distances play a definite role in the magnitude of the interaction. In these cases, as seen before in similar processes [88], the Condon approximation behaves reasonably well over a large range of structural variations. We decided then to determine the value of the coupling obtained (using fixed donor–acceptor structures at different intermonomer distances) as the perturbation in the energies of the electronic states caused by dimerization [53]. This approach to compute the electronic coupling uses for symmetric fragments (as in Et–Et) half of the splitting between the corresponding state and it can be extended to nonsymmetric systems in the same fashion. The perturbation of the states by dimerization can be obtained within the adiabatic framework as half of the energy difference between the separation of the states of the monomers and the separation of the states in the supermolecule at the different interfragment distances. The procedure can be expected valid in the weakly coupling regime provided that the interacting states remain quasi-adiabatic, that is, with wave functions clearly localized in each of the monomers, as it occurs in all the systems considered here at least until the intermonomer distance is made extremely short (<2.5 Å). This approach relates to those based on diabatic frameworks for studying electron transfer processes [88].

In order to compare the approximation employed to previous studies, we used the TET between the lowest triplet states in the dimer methaninium cation–ethylene. The comparison of our values for the electronic coupling with those obtained by You et al. [63] by using half the splitting between the states in a minimum energy gap conformation (estimated from Fig. 6 in Ref. [63]) is compiled in Table 2. Both procedures yield TET couplings basically within the same order of magnitude, although our approach leads to somewhat smaller and larger values at large and short distances, respectively. However, the couplings obtained earlier using CIS as quantum chemical method [63] tend to considerably increase with the quality of the basis set, and can be expected larger with a superior one-electron basis set like the ANO-L type employed here. The Condon approach can therefore be considered quite reasonable in these systems, in particular if we stress (and this must be emphasized) that our main goal is to compare the relative strength of the interaction within the family of furocoumarins more than obtaining absolute values for the rate constants. The energy gap model described here is then considered appropriate and used in the other systems studied.

Table 1
Couplings (H), rate constants (k_{TET}), and lifetimes (τ_{TET}) of the triplet–triplet energy transfer (TET) process between two ethylene molecules in the face-to-face and side-by-side arrangements.

R (Å)	Face-to-face			Side-by-side		
	H (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)
10.00	0	–	–	0	–	–
8.00	5.79×10^{-6}	3.20×10^6	3.12×10^{-5}	5.07×10^{-7}	2.46×10^6	4.07×10^{-3}
6.00	1.47×10^{-4}	2.06×10^7	4.84×10^{-6}	3.57×10^{-6}	1.22×10^6	8.21×10^{-5}
4.00	2.89×10^{-2}	8.00×10^{11}	1.25×10^{12}	2.01×10^{-3}	3.85×10^9	2.60×10^{-10}
3.50	1.01×10^{-1}	9.67×10^{12}	1.03×10^{13}	9.48×10^{-3}	8.58×10^{10}	1.17×10^{-13}
3.00	3.28×10^{-1}	1.02×10^{16}	9.76×10^{15}	4.62×10^{-2}	2.04×10^{12}	4.90×10^{-13}
2.75	5.66×10^{-1}	3.06×10^{16}	3.27×10^{15}	1.03×10^{-1}	1.01×10^{13}	9.88×10^{-14}
2.50	9.43×10^{-1}	8.49×10^{14}	1.18×10^{15}	2.25×10^{-1}	4.82×10^{13}	2.07×10^{-14}
2.25	1.516	2.19×10^{15}	4.56×10^{16}	4.61×10^{-1}	2.03×10^{14}	4.92×10^{-15}
2.00	2.357	5.31×10^{15}	1.88×10^{16}	8.59×10^{-1}	7.04×10^{14}	1.42×10^{-15}

Table 2

Triplet–triplet energy transfer electronic coupling terms (H') computed for the process ${}^3\text{MetN}^+ + {}^1\text{Et} \rightarrow {}^1\text{MetN}^+ + {}^3\text{Et}$ at different intermolecular distances (R). Face-to-face arrangement.^a

R (Å)	H' (eV) ^b	H' (eV) ^c
5.0	6.0×10^{-4}	$\sim 5.0 \times 10^{-3}$
4.5	4.1×10^{-2}	$\sim 2.0 \times 10^{-2}$
4.0	1.6×10^{-1}	$\sim 8.0 \times 10^{-2}$
3.5	4.1×10^{-1}	$\sim 2.0 \times 10^{-1}$

^a MetN⁺ (methaniminium cation); Et (ethylene).

^b Present work. See text.

^c Estimated from Fig. 6 of Ref. [63]. CIS/6-311+G(d).

The next process studied is the TET between triplet excited ethylene and triplet ground state oxygen in the three different arrangements depicted in Figs. 4 and 6. In all cases, the energies of both states (S_1 and S_2) remain constant for intermolecular distances (R) larger than 4 Å. As expected, it is the strongly overlapping *FF* orientation which gives rise to a stronger interaction, as shown in the values of the couplings in Table 3. In general, the stacked *FF* arrangement is the most favorable orientation for the TET process to take place, in agreement with the analysis on the ethylene dimer, because it yields values for the rate constants from one to four orders of magnitude larger than for the other conformations. These results suggest that also in the furocoumarin–O₂ com-

plex the best computational strategy to look for efficient TET is to use the *FF* arrangement involving the reactive double bond of the furocoumarin in the triplet state (see Fig. 1) and the molecular oxygen at different intermolecular distances.

Comparison among the model systems in the *FF* arrangement just reveals electronic effects, as we are using the same estimate for the vibronic state density. Thus, Et–Et (displaying the maximum orbital overlap) yields couplings and rate constants nearly one order of magnitude larger than Et–O₂ (less overlap) at each distance. For instance, at 3.5 Å the process lifetimes are roughly 0.1 and 2 ps for Et–Et and Et–O₂, respectively. MetN⁺–Et gives rise, on the other hand, to couplings nearly three times larger than for the isoelectronic system Et–Et (as observed earlier [63]). In this case the orbital overlap is quite similar in both cases, and the nuclei–electrons interactions will determine the difference. In summary, the orbital overlap between the interacting donor and acceptor seems to be the key factor controlling the efficiency of the electronic coupling and therefore the TET process.

3.3. Furocoumarin–O₂ triplet–triplet energy transfer

3.3.1. Triplet–triplet energy-transfer rates and lifetimes

We turn now to the study of the TET process involving the system furocoumarin–O₂ for each one of the members of the family

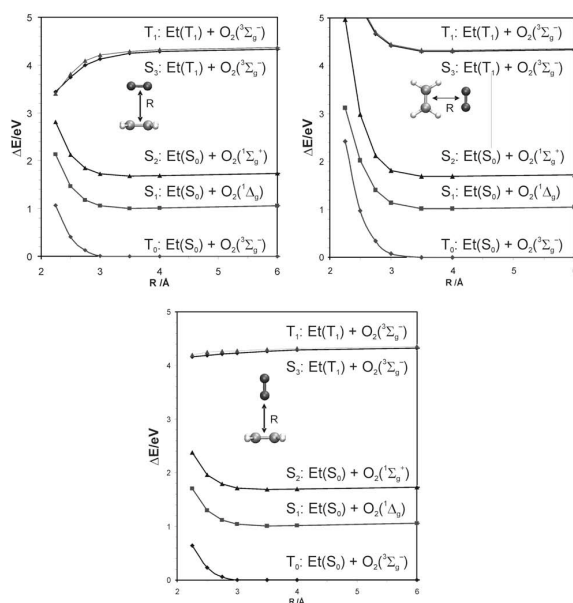


Fig. 6. CASPT2 potential energy curves of the ground and the low-lying excited states of the Et–O₂ supermolecule in the face-to-face (top, left), side-by-side (top, right) and perpendicular (bottom) arrangements.

Table 3
Couplings (H), rate constant (k_{TET}) and lifetimes (τ_{TET}) of the triplet–triplet energy transfer (TET) process between ethylene and molecular oxygen ($\text{Et}-\text{O}_2$) in the face-to-face, side-by-side, and perpendicular arrangements.

R (Å)	Face-to-face			Side-by-side			Perpendicular		
	H (eV)	k_{TET} (s $^{-1}$)	τ_{TET} (s)	H (eV)	k_{TET} (s $^{-1}$)	τ_{TET} (s)	H (eV)	k_{TET} (s $^{-1}$)	τ_{TET} (s)
10.00	0	–	–	0	–	–	0	–	–
8.00	1.21×10^{-4}	1.40×10^7	7.15×10^8	6.56×10^{-5}	4.11×10^6	2.43×10^7	7.39×10^{-5}	5.22×10^6	1.92×10^7
6.00	3.69×10^{-4}	1.30×10^8	7.69×10^9	1.11×10^{-4}	1.18×10^7	8.49×10^8	5.30×10^{-4}	2.69×10^8	3.72×10^9
4.00	3.71×10^{-3}	1.31×10^{10}	7.62×10^{11}	1.11×10^{-3}	1.18×10^9	8.45×10^{10}	1.33×10^{-3}	1.68×10^7	5.96×10^8
3.50	2.12×10^{-2}	4.29×10^{11}	2.33×10^{12}	2.16×10^{-3}	4.45×10^9	2.24×10^{10}	7.13×10^{-3}	4.85×10^{10}	2.06×10^{11}
3.00	1.05×10^{-1}	1.06×10^{13}	9.46×10^{14}	1.95×10^{-2}	3.61×10^{11}	2.77×10^{12}	3.89×10^{-2}	1.44×10^{12}	6.93×10^{13}
2.75	2.32×10^{-1}	5.16×10^{13}	1.94×10^{14}	3.05×10^{-2}	8.87×10^{11}	1.13×10^{12}	8.54×10^{-2}	6.96×10^{12}	1.44×10^{13}
2.50	4.99×10^{-1}	2.38×10^{14}	4.20×10^{15}	1.71×10^{-1}	2.80×10^{13}	3.57×10^{14}	1.86×10^{-1}	3.32×10^{13}	3.02×10^{14}
2.25	9.85×10^{-1}	9.26×10^{14}	1.08×10^{15}	5.53×10^{-1}	2.92×10^{14}	3.43×10^{15}	4.06×10^{-1}	1.57×10^{14}	6.36×10^{15}

displayed in Fig. 1. As already stated, the furocoumarin acts as a very efficient triplet photosensitizer, because, after initial population of the lowest singlet excited state by UV-A radiation, the ISC mechanism to switch the population toward the triplet manifold is very efficient [32–35,80]. The molecule behaves as a donor in its triplet state and it is capable to transfer its energy to molecular oxygen in its triplet ground state to generate the singlet ground state furocoumarin and excited singlet oxygen ($^1\Delta_g$, see Eq. (1)). In all cases the energy of the triplet state of the furocoumarin (computed adiabatically from 2.42 eV in khellin to 2.14 eV in 3-CPS, see Supplementary material) is much higher than the energy of the oxygen $^1\Delta_g$ state (computed 1.09 eV, experimental 0.97 eV [4]), and the process falls clearly into the exothermic regime, expected to be controlled by diffusion. Fig. 7 displays the potential energy curves of the lowest-lying singlet and triplet states of the supermolecule psoralen–O $_2$ in a FF arrangement with respect to the C $_3$ –C $_4$ bond of the pyrone ring (the reactive bond in the triplet state, where the spin density is basically located [32–35]) at different intermolecular distances. The states of the supermolecule protagonist of the TET are 4^1A (T_1 of psoralen and $^3\Sigma_g^-$ of O $_2$) as initial energy level and 1^1A (S_0 of psoralen and $^1\Delta_g$ of O $_2$) as the final outcome of the process in which both moieties have changed spin and energy. Within the present approach the electronic coupling (H) is

obtained (see Fig. 7) as half the difference $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$, where ϵ_∞ and ϵ_i are the energy gaps between the states 4^1A and 1^1A at infinite distance (at 10 Å in the current computation) and at the different interfragment distances, respectively. In this way, the coupling represents the perturbation introduced in each state due to the interaction within the dimer. It is important to notice how advantageous is that definition, because the results are in practice independent of the number of states considered. Potential energy curves for the other furocoumarin–O $_2$ systems are included in the Supplementary material, whereas Table 4 compiles the computed couplings, reaction rates, and lifetimes for the processes of interest. As the goal is studying the differential behavior of the furocoumarins, our attention will be focused on the relative (more than the absolute) values obtained for rate constants and lifetimes.

The inspection of the results of the electronic couplings and reaction rates in Table 4 indicates that the differences between the furocoumarins in this respect are very small. At distances larger than 3 Å, the extent of the coupling is not large and similar in all cases, leading to lifetimes in the order of the picosecond or larger, in general nearly one order of magnitude smaller than for the model systems. Including more vibrational contributions in the calculation of the rate constants would surely enlarge their absolute value. At shorter distances it is possible to identify khellin

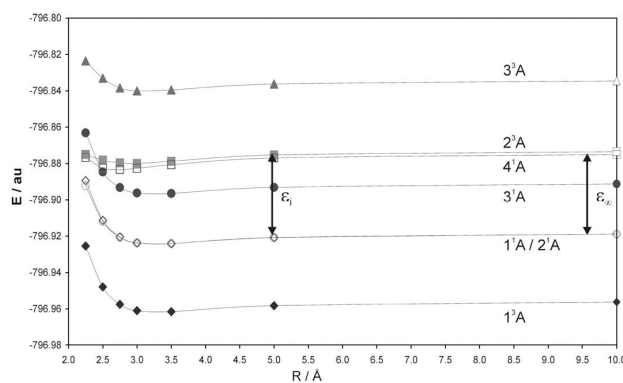


Fig. 7. Potential energy curves of the low-lying excited states of the supermolecule psoralen-molecular oxygen along the interfragment distance (R). The energy coupling H is obtained as half of the energy difference $|\epsilon_\infty - \epsilon_i|$ between the initial 4^1A (T_1 of psoralen and $^3\Sigma_g^-$ of O $_2$) and final 1^1A (S_0 of psoralen and $^1\Delta_g$ of O $_2$) states of the supermolecule at infinite distance (ϵ_∞ , zero coupling situation) and at each of the distances (ϵ_i).

Table 4
Couplings (H), rate constants (k_{TET}), and lifetimes (τ_{TET}) of the TET process between a furocoumarin and O_2 at different interfragment distances (R). Face-to-face arrangement.

R (Å)	H (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)	H (eV)	k_{TET} (s^{-1})	τ_{TET} (s)
	Psoralen			8-MOP			5-MOP		
10.00	0.0000	—	—	0.0000	—	—	0.0000	—	—
5.00	0.0012	1.43×10^9	6.98×10^{10}	0.0028	7.35×10^9	1.36×10^{10}	0.0020	3.71×10^9	2.69×10^{10}
3.50	0.0038	1.41×10^{10}	7.10×10^{11}	0.0033	1.07×10^{10}	9.39×10^{11}	0.0044	1.82×10^{10}	5.50×10^{11}
3.00	0.0357	1.21×10^{12}	8.23×10^{13}	0.0370	1.31×10^{12}	7.65×10^{13}	0.0388	1.44×10^{12}	6.97×10^{13}
2.75	0.0870	7.23×10^{12}	1.38×10^{13}	0.0909	7.88×10^{12}	1.27×10^{13}	0.0921	8.11×10^{12}	1.23×10^{13}
2.50	0.1966	3.69×10^{13}	2.71×10^{14}	0.2067	4.08×10^{13}	2.45×10^{14}	0.2025	3.92×10^{13}	2.55×10^{14}
2.25	0.3833	1.40×10^{14}	7.13×10^{15}	0.4101	1.61×10^{14}	6.23×10^{15}	0.3707	1.31×10^{14}	7.62×10^{15}
	Khellin			TMP			3-CPS		
10.00	0.0000	—	—	0.0000	—	—	0.0000	—	—
5.00	0.0015	2.29×10^9	4.37×10^{10}	0.0028	7.56×10^9	1.32×10^{10}	0.0020	3.70×10^9	2.70×10^{10}
3.50	0.0051	2.49×10^{10}	4.01×10^{11}	0.0023	5.14×10^9	1.94×10^{10}	0.0031	9.21×10^9	1.09×10^{10}
3.00	0.0387	1.43×10^{12}	6.98×10^{13}	0.0379	1.37×10^{12}	7.29×10^{13}	0.0330	1.04×10^{12}	9.61×10^{13}
2.75	0.0948	8.59×10^{12}	1.16×10^{13}	0.0996	9.47×10^{12}	1.06×10^{13}	0.0805	6.19×10^{12}	1.61×10^{13}
2.50	0.2283	4.98×10^{13}	2.01×10^{14}	0.2417	5.58×10^{13}	1.79×10^{14}	0.1816	3.15×10^{13}	3.18×10^{14}
2.25	0.5197	2.58×10^{14}	3.88×10^{15}	0.5257	2.64×10^{14}	3.79×10^{15}	0.3406	1.11×10^{14}	9.02×10^{15}

and TMP as increasing the coupling with respect to the other species, in particular 3-CPS, which yields the smallest values. Below 2.5 Å, that is, in the range of the collision complex, is unlikely that the obtained values for the couplings are accurate. The states are in this case strongly perturbed and far from the quasi-adiabatic picture, showing strong delocalization and configurational mixing in the CASSCF wave function, and the Condon approximation is no longer valid. Fig. 8 displays a graphical comparison for the values of the couplings for the various complexes and interfragment distances. Some small differences can be noted, producing an approximate order for the efficiency of the TET process based on the couplings and rate constants as 3-CPS < psoralen < 8-MOP < 5-MOP < khellin < TMP, with TMP and khellin yielding the largest couplings and psoralen and 3-CPS the smallest. Such differences are not large enough to make a clear distinction between the systems. In fact, the mentioned tendencies obtained are at odds with the experimental findings, most of them measured anyway in solvated phases. Despite somewhat contradictory results, 3-CPS and psoralen were reported in most cases as better singlet oxygen generators than the other furocoumarins [17–20,28,29], just opposite to the tendencies found here for the efficiency of the coupling, whereas the situation for the other systems was unclear. Even if

the present results are obtained for the isolated systems (and only strictly comparable to the gas-phase measurements) and they can be slightly modified when including solvent effects, we do not expect the changes to be of importance, as shown by control test calculations. It is then possible to safely conclude that the electronic coupling factor is not the key aspect controlling a differential efficiency in the generation of singlet oxygen by the furocoumarins. This outcome has been obtained also in other recent studies involving a common acceptor and a series of donors of similar structure. The value of the electronic coupling did not deviate substantially from an average value characteristic of the whole donor series [64]. If the electronic coupling is therefore not the control effect to modulate the differential efficiency of the TET process in molecules with similar structures like furocoumarins, we have to turn our attention to other aspect of the process such as the efficiency of the molecule as photosensitizer (that is, the population of the lowest triplet state), which is also related to the overall efficiency of the system as a phototherapeutic compound [16].

3.3.2. Intersystem crossing rates and lifetimes in furocoumarins

As described in Section 2, Eq. (3) was employed to initially compute ISC reaction rates for the population of the triplet manifold in

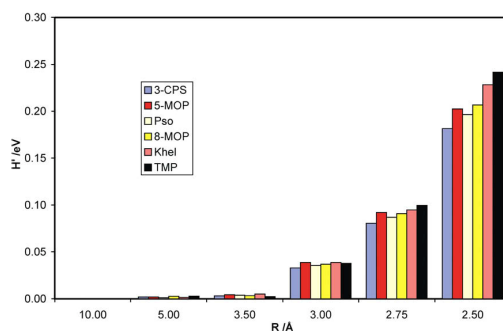


Fig. 8. Comparison between the electronic couplings (H) triggering the TET process between a furocoumarin and molecular oxygen at the different interfragment distances (R).

each of the furocoumarin molecules. In particular, and as determined previously [32–35], the ISC nonradiative process corresponds to the transfer $S_n(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$ in each furocoumarin donor, a process which will take place more efficiently in the region of the $(S_n/T_n)_X$ singlet–triplet crossing, and that subsequently will give rise to an ultrafast population of the lowest $T_n(\pi\pi^*)$ by internal conversion in the triplet manifold. The spin–orbit coupling factors (H_{SO}) between the lowest S_n and T_n states, computed at the crossing region structure as determined previously [32–35] and the ISC rates (k_{ISC}) are compiled in Table 5. This procedure to obtain the rates (see Eq. (3)) just represent to take into consideration the spin–orbit coupling factors to account for the efficiency of the process. Obviously, TMP, in particular, and also psoralen and 3-CPS, having the largest coupling, leads to the largest rates. However, and in order to properly account for reaction rates, it is also required to consider the energy barriers found along the process, at least in the simplified manner introduced by Eq. (4). Table 5 compiles the energy barriers computed earlier [32–35] for the process $S_n(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$ in the different systems. Unlike in previous discussions [35] in which we considered as barrier the energy difference between the minimum of the S_n state and the crossing point $(S_n/T_n)_X$, the present approach accounts for the excess energy available in the system from the initially populated S_n state (at the Franck–Condon geometry) to the crossing point (see Table 4), which seems to be more relevant in this context, where the interest focuses on rate constants. Most of the studied furocoumarins have their initially populated S_n state well above the crossing point energy, what leads to negative barriers. In such cases, as we consider that the system has sufficient energy to reach the ISC region and such process is in the exothermic regime, the energy barrier on Eq. (4) has been made zero. Once all factors considered, the ISC rates and lifetimes (in the nanosecond range), although similar for the different compounds, allows to establish an approximate order of efficiency of the furocoumarin: khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS, an order which slightly differs from that proposed in our previous study [35] because of the different type of energy barrier considered earlier. The present results can be compared, at least qualitatively, with those reported in the literature, which are summarized in Table 6 for simplicity.

Despite the sometimes contradictory reports of the solution experiments (see Table 6) and the absence of solvation effects in the calculation [35], the basic order of efficiency holds true in most cases. In particular, 3-CPS is confirmed as the best singlet oxygen generator because its ability to populate the triplet state, in contrast to the smallest value obtained for the coupling term in this molecule in the previous section. Comparison with experiment seems to support the approach based on spin–orbit couplings and energy barriers. Psoralen is also confirmed as good photosensitizer, whereas TMP and 8-MOP have intermediate efficiency. As

Table 5
Rate constants (k) and decay times (τ) of the radiationless intersystem crossing (ISC) process $S_n \rightarrow T_n$ in the family of the furocoumarins.

Furocoumarin	ΔE (eV) ^a	H_{SO} (cm ⁻¹) ^b	k_{ISC} (s ⁻¹) ^c	k_{ISC}^d (s ⁻¹) ^d	τ_{ISC}^e (ns) ^e
Psoralen	0.03	9.2	3.58×10^9	1.11×10^9	0.90
8-MOP	-0.01	4.9	1.02×10^9	1.02×10^9	0.98
5-MOP	-0.10	3.5	5.18×10^8	5.18×10^8	1.93
Khellin	-0.19	2.9	3.56×10^8	3.56×10^8	2.81
TMP	0.09	32.2	4.39×10^{10}	1.32×10^9	0.76
3-CPS	-0.24	9.2	3.58×10^9	3.58×10^9	0.28

^a Energy barriers from S_n (at the Franck–Condon region) to T_n (at the S_n – T_n crossing region) [35].

^b Spin–orbit coupling terms at the S_n – T_n crossing region [35].

^c ISC rate constants obtained using Eq. (3).

^d ISC rate constants obtained using Eq. (4). Negative barriers are taken as zero.

^e ISC decay times. Inverse of the rate constant as obtained using Eq. (4).

Table 6
Summary of computed and experimental estimated efficiency orders of the singlet oxygen generation process by photosensitized furocoumarins.

Efficiency of the process	Ref.
<i>Theory</i> ^a	
Khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS	Present
<i>Experiment</i>	
Khellin < 8-MOP < psoralen < 5-MOP	31
TMP ≈ 5-MOP ≈ 8-MOP ≪ psoralen < 3-CPS	29
5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP	17
8-MOP < 5-MOP < TMP < khellin < 3-CPS	26
5-MOP < 8-MOP < psoralen < 3-CPS	27
5-MOP < TMP < 8-MOP < psoralen	28

^a The theoretical results are based on the estimated efficiency of the ISC process $S_n(\pi\pi^*) \rightarrow T_n(n\pi^*)$, the crucial step to populate the lowest triplet state of the furocoumarin, $T_n(\pi\pi^*)$, and initiate the TET process.

most of the experiments show and our calculations predict, 5-MOP would be a much poorer oxygen generator. For khellin we also predict a less favorable situation, which more exhaustive experiments will have to confirm.

4. Conclusions

A theoretical analysis of the triplet–triplet energy transfer (TET) process in the complex furocoumarin–O₂ has been performed using quantum chemical methods, in particular the *ab initio* multi-configurational CASPT2 approach. In the framework of a two-state model and a weakly coupling regime, Fermi's Golden Rule has been employed to estimate TET rate constants and lifetimes. To this end, a supermolecule dimer approach and an energy-gap procedure have been used to determine the strength of the electronic coupling between the protagonist states, which in the furocoumarin–O₂ systems are the lowest triplet excited state of the former, acting as donor, and the triplet ground state of molecular oxygen, acting as acceptor. In order to test the procedure and also to determine the proper orientation of the two moieties, several model systems as ethylene–ethylene, methaniminium cation–ethylene, and ethylene–molecular oxygen have been analyzed. A face-to-face arrangement, in which the orbital overlap between the π clouds of the C=C π bonds is maximized, was selected as the most favorable orientation to efficiently boost TET. Values for electronic coupling have been computed at different intermonomer separations in which the molecular oxygen has been placed in a parallel disposition with respect to the pyrone double C=C bond of the furocoumarin (except in the case of khellin), which is the reactive bond in the triplet state of the compound.

The estimated values for the electronic couplings, TET rate constants, and lifetimes in the different furocoumarin–O₂ systems are too similar to provide clear trends to understand the differential yields of singlet oxygen formation measured in experiment. The determined rates do not follow the reported tendencies. Despite the qualitative goal intended for this type of study we can clearly conclude that the electronic coupling factor does not permit rationalizing the differential efficiency in the generation of singlet oxygen by the furocoumarins, because it is too similar for donors with similar structures. This conclusion was obtained earlier in other systems [64].

A second aspect upon which the efficiency of the overall TET process depends, such it is the population of the photosensitizing lowest triplet state in furocoumarin, has also been analyzed based on the magnitude of the reaction rates. In this case, the relevant operator is the strength of the spin–orbit coupling related to the intersystem crossing (ISC) process between the initially excited singlet state and the triplet manifold. The effect on the ISC rates

of the energy barrier required to access the triplet state has also been taken into account. The qualitative estimation of the efficiency of the ISC process leads us to suggest an order for the efficiency of the singlet oxygen generation in the different furocoumarins for PUVA therapy such as khellin < 5-MOP < 8-MOP < psoralen < TMP < 3-CPS. In this respect, from all compounds studied here, 3-CPS can be predicted the best photosensitizer (as singlet oxygen generator), followed by TMP and psoralen. 5-MOP and, particularly, khellin would not be, on the other hand, so efficient. The determined tendencies seem to agree with most of the experimental determinations in aqueous solution based on the production of reactive singlet oxygen. These results account for the triplet state population, and therefore are equally valid to estimate the efficiency of the TET process or the formation of furocoumarin–thymine adducts (initiated also in the triplet state of the furocoumarin), although the latter reaction may depend on many other structural factors [16]. It is therefore hardly possible to establish which type of phototherapeutic action predominates in each compound. In any case, and although determining absolute rates and lifetimes should be still considered too complex, the present results lead to validate some of the reported trends [17,27–29], and establish a promising strategy to evaluate the efficiency of different systems for the photodynamic therapy. Corresponding research for other relevant compounds is currently on the way.

Acknowledgments

The authors thank Dr. L.M. Frutos, from Universidad de Alcalá (Spain), for useful discussions. The research has been supported by projects CTQ2007-61260 and CSD2007-0010 Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience of the Spanish MEC/FEDER.

Appendix A. Supplementary material

Potential energy curves furocoumarin–oxygen and energies of triplet and singlet states of the furocoumarins. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemphys.2009.04.014.

References

- [1] D. Phillips, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 117.
- [2] R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* 24 (1995) 19.
- [3] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 66 (2002) 89.
- [4] R. Bonnett, *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Advanced Chemistry Texts, Gordon & Breach Science, Amsterdam, 2000.
- [5] O. Arad, A. Gavaldá, Ó. Rey, N. Rubio, D. Sánchez-García, J.I. Borrell, J. Teixidó, S. Norell, M. Cañete, A. Juaranz, A. Villanueva, J.C. Stockert, P.J. Diaz, *Affinidad* 59 (243) (2002).
- [6] S.K. Pushpan, S. Venkatraman, V.G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan, T.K. Chandrashekar, *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* 2 (2002) 187.
- [7] K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty, *Cancer Res.* 36 (1976) 2326.
- [8] B.C. Wilson, M.S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* 31 (1986) 327.
- [9] W.F. Cheong, S.A. Prahl, A.J. Welch, *IEEE J. Quantum Electron.* 26 (1990) 2166.
- [10] B.C. Wilson, M.S. Patterson, *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61.
- [11] M. Ochsner, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39 (1997) 1.
- [12] P.-S. Song, K.J. Tapley Jr., *Photochem. Photobiol.* 29 (1979) 1177.
- [13] E. Ben-Hur, P.-S. Song, *Adv. Radi. Biol.* 11 (1984) 131.
- [14] J.E. Hearst, *Chem. Res. Toxicol.* 2 (1989) 69.
- [15] D. Averbek, *Photochem. Photobiol.* 50 (1989) 859.
- [16] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 14002.
- [17] P.C. Joshi, M.A. Pathak, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1983) 638.
- [18] N.J. de Mol, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, *Photochem. Photobiol.* 33 (1981) 815.
- [19] C.N. Knox, E.J. Land, T.G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 359.
- [20] W. Poppe, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* 22 (1975) 217.
- [21] J.C. Ronfard-Haret, D. Averbek, R.V. Bensasson, E. Bisagni, E.J. Land, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 473.
- [22] N.J. de Mol, *Pharmaceutisch Weekblad* 3 (1981) 599.
- [23] D. Averbek, L. Dubertret, M. Crow, T.G. Truscott, F. Dall'Acqua, P. Rodighiero, D. Vedaldi, E.J. Land, *Il Farmaco* 39 (1983) 57.
- [24] R. Bevilacqua, F. Bordin, *Photochem. Photobiol.* 17 (1973) 191.
- [25] N.J. de Mol, G.M.J. Beijersbergen van Henegouwen, B. van Beele, *Photochem. Photobiol.* 34 (1981) 661.
- [26] S.G. Jones, A.R. Young, T.G. Truscott, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 21 (1993) 223.
- [27] D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, A. Gennaro, G. Rodighiero, Z. Naturforsch. 38 (1983) 866.
- [28] Q.A. Blan, L.I. Grossweiner, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 177.
- [29] M.A. Pathak, P.C. Joshi, *Biochim. Biophys. Acta* 798 (1984) 115.
- [30] P. Marzelli, L. Bovolini, S. Ferri, G.G. Franchi, M. Bari, *Fests Lett.* 189 (1985) 255.
- [31] H.V. Aboul-Enen, A. Kladna, I. Kruk, K. Lichszield, T. Michalska, *Biopolymers (Biospectroscopy)* 72 (2003) 59.
- [32] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 124502.
- [33] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys. Lett.* 434 (2007) 107.
- [34] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *Chem. Phys.* 347 (2008) 422.
- [35] J.J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 199 (2008) 34.
- [36] M. Hozokka, B.O. Roos, P. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 5263.
- [37] W.H. Elliott, D.C. Elliott, *Chemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, 2005.
- [38] F. Wilkinson, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 2569.
- [39] G.W. Robinson, R.P. Frosch, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 1187.
- [40] A.A. Gorman, I. Hamblett, C. Lambert, B. Spencer, M.C. Standen, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 8053.
- [41] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Portier, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (69) (1973) 708.
- [42] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Portier, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (69) (1973) 721.
- [43] O.L.J. Gijzeman, F. Kaufman, G. Portier, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* (70) (1974) 1143.
- [44] F. Wilkinson, D.J. McCarvey, A.F. Olea, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 3762.
- [45] A.F. Olea, F. Wilkinson, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 4518.
- [46] S. Wang, R. Gao, F. Zhou, M. Selke, *J. Mater. Chem.* 14 (2004) 487.
- [47] Th. Förster, *Ann. Phys.* 2 (1948) 55.
- [48] M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, 1995.
- [49] J. Barber, *Rep. Prog. Phys.* 41 (1978) 1159.
- [50] H. Singh, B. Bagchi, *Curr. Sci.* 89 (2005) 1710.
- [51] L. Stryer, R.P. Haugland, *Biochemistry* 58 (1967) 719.
- [52] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, second ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [53] R.F. Fink, J. Pfister, A. Schneider, H. Zhao, B. Engels, *Chem. Phys.* 343 (2008) 353.
- [54] D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 836.
- [55] D.W. Liao, W.D. Cheng, J. Bigman, Y. Karri, S. Speiser, S.H. Lin, *J. Chin. Chem. Soc.* 42 (1995) 177.
- [56] G.D. Scholes, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 1251.
- [57] R.D. Harcourt, G.D. Scholes, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 101 (1994) 10521.
- [58] G.D. Scholes, R.D. Harcourt, *J. Chem. Phys.* 104 (1996) 5054.
- [59] G.D. Scholes, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 18731.
- [60] M. Klessinger, J. Michl, *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, New York, 1995.
- [61] A. Terenin, V. Ermolaev, *Trans. Faraday Soc.* 52 (1956) 1042.
- [62] N.J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, 1991.
- [63] Z.-Q. You, C.-P. Hsu, G.R. Fleming, *J. Chem. Phys.* 124 (2006) 44506.
- [64] L.M. Frutos, O. Castaño, *J. Chem. Phys.* 123 (2005) 104108.
- [65] P.H. Krupenie, *J. Phys. Chem.* 1 (1972) 423.
- [66] F. Nyssli, J. Macklin, W. Cusworth III, *J. Chem. Ed.* 79 (2002) 356.
- [67] D. Tudela, V. Fernández, *J. Chem. Ed.* 80 (2003) 1381.
- [68] K. Andersson, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 1218.
- [69] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, L. Nebot-Gil, R. Lindh, B.O. Roos, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 3151.
- [70] B.O. Roos, K. Andersson, M.P. Fülcher, P.-Å. Malmqvist, L. Serrano-Andrés, K. Pierloot, M. Merchán, *Adv. Chem. Phys.* 93 (1996) 219.
- [71] M. Rubio, B.O. Roos, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, *J. Chem. Phys.* 110 (1999) 7202.
- [72] M. Merchán, L. Serrano-Andrés, in: M. Olivucci (Ed.), *Computational Photochemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [73] M. Merchán, R. González-Luque, T. Climent, L. Serrano-Andrés, E. Rodríguez, M. Reguero, D. Peláez, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 26471.
- [74] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, A.C. Borin AC, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 6559.
- [75] L. Serrano-Andrés, M. Merchán, in: M.K. Shukla, J. Leszczynski (Eds.), *Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acids: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis*, Springer, The Netherlands, 2008.
- [76] N. Forsberg, P.-Å. Malmqvist, *Chem. Phys. Lett.* 274 (1997) 196.
- [77] M.J. Paterson, O. Christensen, F. Jensen, P.R. Ogilby, *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1136.

- [78] D.C. Harris, M.D. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, Dover, Publications, Inc., New York, 1989.
- [79] G.D. Scholes, R.D. Harcourt, K.P. Ghiggino, *J. Chem. Phys.* 102 (1995) 9574.
- [80] J. Tatchen, N. Gilka, C.M. Marian, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9 (2007) 5209.
- [81] D.G. Truhlar, *J. Phys. Chem.* 83 (1979) 188.
- [82] D.G. Truhlar, B.C. Garrett, *Acc. Chem. Res.* 13 (1980) 440.
- [83] A.D. Isaacson, D.G. Truhlar, *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 1380.
- [84] D.G. Truhlar, W.L. Hase, J.T. Hynes, *J. Phys. Chem.* 87 (1983) 2664.
- [85] D.G. Truhlar, B.C. Garrett, S.J. Klippenstein, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 12771.
- [86] G. Karlström, R. Lindh, P.-Å. Malmqvist, B.O. Roos, U. Ryde, V. Veryazov, P.-O. Widmark, M. Cossi, B. Schimmelpfennig, P. Neogrády, L. Seijo, *Comp. Mater. Sci.* 28 (2003) 222.
- [87] V. Veryazov, P.-O. Widmark, L. Serrano-Andrés, R. Lindh, B.O. Roos, *Int. J. Quantum Chem.* 100 (2004) 626.
- [88] R.J. Cave, M.D. Newton, *J. Chem. Phys.* 106 (1997) 9213.
- [89] M.D. Newton, *Chem. Rev.* 91 (1991) 767.
- [90] L.A. Curtiss, C.A. Naleway, J.R. Miller, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 1182.

**Singlet Oxygen Generation in PUVA Therapy
Studied using Electronic Structure Calculations**

Juan José Serrano-Pérez, Gloria Olasso-González, Manuela Merchán,
and Luis Serrano-Andrés*

*Instituto de Ciencia Molecular, Universitat de València,
Apartado de correos 22085, ES-46071 Valencia, Spain*

Supplementary Material

1

References

- [1] R.Bonnett, Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Advanced Chemistry Texts. Gordon & Breach Science, Amsterdam. 2000.
- [2] J.J. Serrano-Pérez, L. Serrano-Andrés, M. Merchán, J. Chem. Phys. 124 (2006) 1.
- [3] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, Chem. Phys. Lett. 434 (2007) 107.
- [4] J.J. Serrano-Pérez, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, Chem. Phys. 347 (2008) 422.
- [5] J.J. Serrano-Pérez, R. González-Luque, M. Merchán, L. Serrano-Andrés, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 199 (2008) 34.

Table S1. Energies (with respect to the ground state of the furocoumarin at the Franck-Condon geometry) of the low-lying excited states of the molecules implied in the TET process [2-5].

Molecule	Geometry	State	E (eV)
O ₂	T ₀ (gs)	S ₁ (¹ Δ _g)	1.09 (exp. 0.97) [1]
	T ₀ (gs)	S ₂ (¹ Σ _g ⁺)	1.76 (exp. 1.61) [1]
psoralen	T ₁	S ₁	3.56
	T ₁	T ₁	2.29
8-MOP	T ₁	S ₁	3.45
	T ₁	T ₁	2.33
5-MOP	T ₁	S ₁	3.56
	T ₁	T ₁	2.28
TMP	T ₁	S ₁	3.15
	T ₁	T ₁	2.24
khellin	T ₁	S ₁	3.39
	T ₁	T ₁	2.42
3-CPS	T ₁	S ₁	3.11
	T ₁	T ₁	2.14

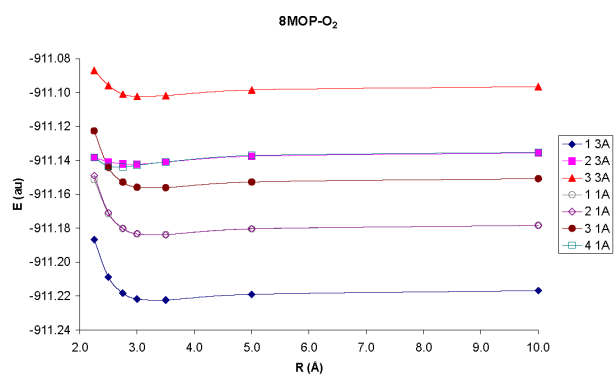


Figure S11. Evolution of the low-lying excited states of the supermolecule furocoumarin (8-MOP)-oxygen with the distance between the moieties.

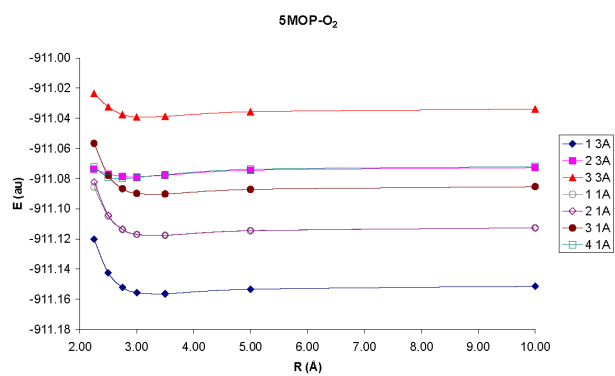


Figure S12. Evolution of the low-lying excited states of the supermolecule furocoumarin (5-MOP)-oxygen with the distance between the moieties.

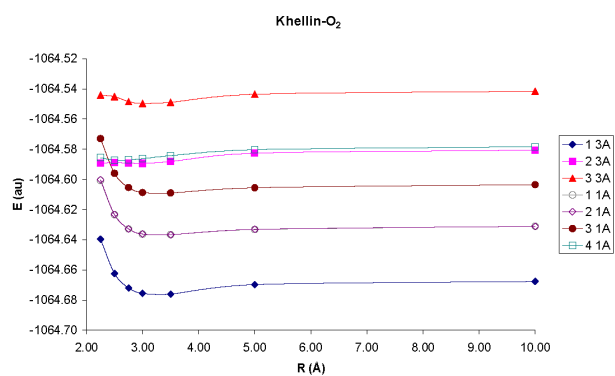


Figure S13. Evolution of the low-lying excited states of the supermolecule furocoumarin (khellin)-oxygen with the distance between the moieties.

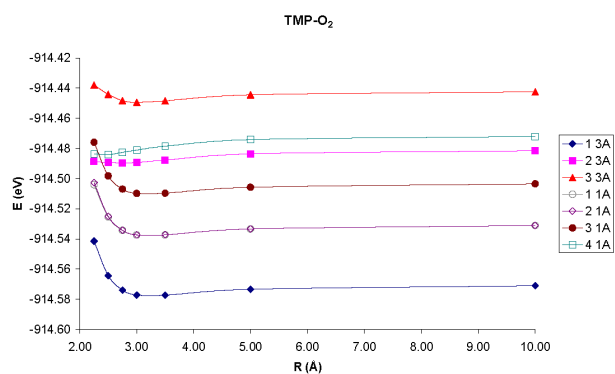


Figure S14. Evolution of the low-lying excited states of the supermolecule furocoumarin (TMP)-oxygen with the distance between the moieties.

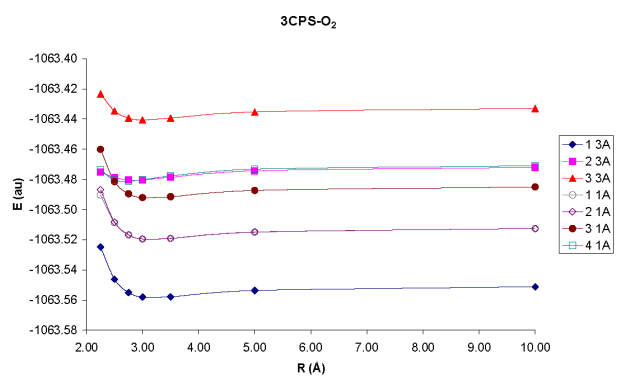


Figure S15. Evolution of the low-lying excited states of the supermolecule furocoumarin (3-CPS)-oxygen with the distance between the moieties.

FE DE ERRATAS

Se deben tener en cuenta las siguientes correcciones y/o mejoras del manuscrito original:

Página	Dónde pone...	Debe poner...
74	<i>Añadir después del primer párrafo</i>	Sin embargo, una mejor energía variacional no implica necesariamente una mejor descripción de otras propiedades.
78	Pie de página (13): La energía del conjunto de dos sistemas no interaccionantes no coincide con la suma de las energías individuales.	La energía del conjunto de dos sistemas no interaccionantes coincide con la suma de las energías individuales. En otras palabras: $E_{AB}(R \rightarrow \infty) = E_A + E_B$.
80	<i>Añadir antes de la representación de la matriz Hamiltoniana</i>	La base polielectrónica puede estar constituida por determinantes de Slater (lo que conduce a algoritmos CI más eficientes) o por CSFs (lo que conduce a expansiones CI más cortas y a funciones propias de espín).
83	<i>Añadir después del primer párrafo</i>	Los orbitales inactivos también se optimizan en el proceso (digamos que son tratados como en la función RHF).
84	La energía CASSCF es invariante frente a rotaciones entre orbitales inactivos o entre orbitales secundarios.	La energía CASSCF es invariante frente a rotaciones entre los orbitales activos.
87	Pie de página (15): Que implica un correcto escalado, tal y como lo hace la energía, con el número de partículas.	La energía calculada mediante un método dado escala linealmente con el número de partículas.
104	$SOC_{lk} = \sqrt{\sum_{\mu} \langle T_{l,u} \hat{H}_{SO} S_k \rangle ^2} \quad \quad u = x, y, z$	$SOC_{lk} = \sqrt{\sum_u \langle T_{l,u} \hat{H}_{SO} S_k \rangle ^2} \quad \quad u = x, y, z$

114	Figura 20: x_3, x_4, \dots, x_n	x_3, x_4, \dots, x_F
123	También se ha empleado el método RASSCF para calcular MEPs, como se describe en otro trabajo, y para la búsqueda de STCs y CIs se ha empleado el método CASSCF.	Para calcular los MEPs y para la búsqueda de STCs y CIs se ha empleado el método CASSCF.
124	llegamos a un mínimo bajo la restricción de degeneración entre estados,	llegamos a un mínimo en el espacio de intersección de dimensión $F - 2$ bajo la restricción de degeneración entre estados,
125	<i>Añadir después del segundo párrafo (tras simetría)</i>	En el caso del psoraleno, para realizar el MEP a lo largo de S1 se empleó un espacio activo CASSCF (12,12), sin restricción de simetría. Por otro lado, en la búsqueda de los cruces STC y CI se empleó la misma simetría (C_S) y el mismo espacio activo que para el cálculo de energía, esto es, CASSCF (14,13).
135	Tabla IV: $1^1 A'(\pi\pi^*)$	$1^1 A'$
160	Como hipótesis inicial, seleccionamos dos estructuras...	Como hipótesis inicial, para buscar el mínimo del estado fundamental de cada monoadocto, seleccionamos dos estructuras...
173	Tabla IX: <ul style="list-style-type: none"> ➤ State ➤ Ignorar los TDM_{dir} de los estados triplete 	Estado
182	<i>Añadir al final de la página</i>	Para calcular la barrera se empleó la expresión: $E_{\text{cruce}} = \frac{(E_{S_\pi}^{\text{cruce}} + E_{T_n}^{\text{cruce}})}{2}$ $\Delta E_{\text{barrera}} = E_{S_\pi}^{\text{min}} - E_{\text{cruce}} $
197	Tabla XVI: Energías (con respecto al estado fundamental de la furocumarina a la geometría Franck-Condon) de los estados excitados implicados en el proceso TET.	Energías de los estados excitados implicados en el proceso TET, con respecto al estado fundamental de la furocumarina a la geometría Franck-Condon.

201	<i>Añadir al final de la página</i>	Nótese que no hay BSSE en estos cálculos, ya que estamos restando, para distintas distancias intermoleculares, diferencias de <i>gaps</i> energéticos a una distancia dada, con lo que el error se elimina en dicha sustracción.
209	<i>Añadir al final de la página</i>	Por consiguiente, el mínimo del estado S_{π} ya no es la referencia energética.
217	Dado que el esqueleto del ADN es flexible,	Por otro lado, dado que el esqueleto del ADN es flexible,
219	tiene lugar en el mismo rango de energías que la correspondiente al monómero.	tiene lugar en el mismo rango de energías que la cónica correspondiente a la desexcitación del monómero.