

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

DOCTORADO EN QUÍMICA



---

**Interacción de cationes con bases del  
ADN: Estudio de sus propiedades  
espectroscópicas y caracterización  
estructural**

---

*Autor:*

Matías BERDAKIN

*Director:*

Dr. Gustavo A. PINO

*El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en*

INFIQC

Departamento de Fisicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Centro Láser de Ciencias Moleculares

UNC

*Se presenta a consideración de dicha facultad para optar al grado de*

Doctorado en Química

3 de marzo de 2015



El presente trabajo de Tesis fue realizado en el INFIQC, Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Centro Láser de Ciencias Moleculares, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Prof. Dr. Gustavo A. Pino y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

---

Prof. Dr. Gustavo A. Pino

---

Prof. Dr. Eduardo A. Coronado

---

Prof. Dr. Cristián G. Sánchez

---

Prof. Dr. Horacio Pastawski

---

Prof. Dr. Andrés H. Thomas  
(Evaluador Externo)



*“Como tú  
Piedra pequeña  
como tú”*

León Felipe



*Con mucho cariño a mis amigos, mi familia y Nati ...*





Universidad Nacional de Córdoba

## *Resumen*

INFIQC

Departamento de Fisicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Centro Láser de Ciencias Moleculares

UNC

Doctorado en Química

### **Interacción de cationes con bases del ADN: Estudio de sus propiedades espectroscópicas y caracterización estructural**

Por Matías BERDAKIN

La interacción entre cationes y bases del ADN puede inducir cambios que afectan desde el plegamiento macromolecular hasta el reconocimiento base···base siendo aspectos de gran interés tanto desde el punto de vista de la investigación básica como para el desarrollo de futuras aplicaciones tecnológicas. Por otro lado, la respuesta espectroscópica de los sistemas del tipo Cation···ADN resulta intrigante y ofrece un gran abanico de potenciales aplicaciones, sin embargo todavía no se conoce el mecanismo molecular que regula la espectroscopía de estos sistemas.

El objetivo central del este trabajo doctoral fue estudiar cómo la interacción con diferentes átomos y cationes permite estabilizar apareamientos y plegamientos no canónicos en el ADN/ARN y cómo dicha interacción determina las propiedades ópticas de los agregados generados, de forma tal de indagar en las razones que originan los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia de los sistemas híbridos  $\text{Ag}_n$ -ADN.

Para obtener información molecular detallada acerca del problema planteado, se eligieron sistemas modelo simplificados, factibles de ser estudiados en fase gaseosa, asilados y mediante técnicas de espectroscopía láser. De tal forma que los resultados obtenidos constituyan un punto de partida que permitan avanzar en el estudio del problema planteado, desde un enfoque “bottom-up” aumentando la complejidad del modelo empleado. En este marco, los sistemas químicos más relevantes empleados fueron la piridina, tirosina y las bases del ADN/ARN, interaccionando con  $\text{H}^+$ ,  $\text{Ag}^+$  y Ag. Para obtener información acerca de la estructura de los agregados estudiados se utilizó la espectroscopía de disociación multifotónica IR, y las técnicas de ionización multifotónica aumentada por resonancia y la fragmentación UV fueron empleadas para estudiar la fotofísica de dichos agregados. Los resultados experimentales siempre fueron contrastados con simulaciones de estructura electrónica.



# Índice general

Declaración	III
Resumen	IX
Índice de Contenidos	X
Índice de Figuras	XV
Índice Tablas	XVII
Nomenclatura y Acrónimos	XIX
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Generalidades Acerca de los Ácidos Nucleicos: Estructura Primaria, Secundaria y Terciaria. . . . .	2
1.2. Apareamientos y Plegamientos No Canónicos . . . . .	8
1.2.1. Apareamientos no convencionales . . . . .	8
1.2.2. Plegamientos no canónicos . . . . .	9
1.3. Propiedades Ópticas de Agregados de Ag <sub>n</sub> . . . . .	11
1.4. Objetivos y Organización de la Tesis . . . . .	17
<b>2. Fundamentos</b>	<b>19</b>
2.1. Espectrometría de masa . . . . .	20
2.1.1. Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo . . . . .	21
2.1.2. Multipolos Lineales: Analizadores de Masas, Trampas Iónicas y Celdas de Colisión . . . . .	25
2.1.2.1. Cuadrupolo Lineal . . . . .	25
2.1.2.2. Trampas Iónicas y Celdas de Colisión . . . . .	27
2.1.3. Trampa Iónica Cuadrupolar Tridimensional . . . . .	28
2.1.4. Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FTICR) . . . . .	30
2.2. Vaporización de muestras . . . . .	32
2.2.1. Electrospray . . . . .	32
2.2.1.1. Diseño Básico . . . . .	33
2.2.1.2. Generación de Iones Aislados en Fase Gaseosa . . . . .	34
2.2.2. Vaporización Láser . . . . .	36

2.2.2.1. Generalidades del Mecanismo . . . . .	36
2.3. Expansiones Supersónicas . . . . .	38
2.3.1. Breve Descripción del Proceso . . . . .	38
2.4. Espectroscopía . . . . .	40
2.4.1. Espectroscopía de ionización multifotónica resonante . . . . .	40
2.4.2. Espectroscopía de disociación multifotónica infrarroja . . . . .	42
2.4.3. Espectroscopía de Fragmentación UV . . . . .	47
<b>3. Sistemas Experimentales</b>	<b>51</b>
3.1. Espectroscopía REMPI y Estudio de la Formación de Agregados Iónicos Mediante Vaporización Láser: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser . . . . .	52
3.1.1. Cámara Principal . . . . .	53
3.1.2. Analizador de Masas TOF . . . . .	54
3.1.2.1. Diseño del TOF . . . . .	55
3.1.2.2. Sincronización de Eventos . . . . .	57
3.1.3. Sistema Láser . . . . .	59
3.2. Espectroscopía de Fragmentación UV de iones fríos: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser . . . . .	61
3.2.1. Sistema Láser . . . . .	63
3.3. Espectroscopía de Disociación Multifotónica IR: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser . . . . .	64
3.3.1. Sistemas Láser . . . . .	66
<b>4. Interacción de Átomos y Cationes Metálicos con Moléculas Orgánicas</b>	<b>71</b>
4.1. Introducción . . . . .	72
4.2. Resultados . . . . .	74
4.2.1. Agregados Neutros . . . . .	75
4.2.1.1. Generación de agregados de moléculas orgánicas . . . . .	75
4.2.1.2. Generación de agregados de átomos metálicos con moléculas orgánicas . . . . .	76
4.2.2. Agregados iónicos . . . . .	83
4.2.2.1. Generación de agregados de cationes metálicos con moléculas orgánicas . . . . .	83
4.3. Análisis y Discusión . . . . .	84
4.4. Conclusiones . . . . .	89
<b>5. Interacción de Bases del ADN/ARN con Protón</b>	<b>93</b>
5.1. Introducción . . . . .	94
5.1.1. Nota sobre la nomenclatura empleada para los sistemas protonados	94
5.1.2. Motivación y antecedentes . . . . .	95
5.2. Resultados . . . . .	99
5.2.1. Monómeros protonados . . . . .	99
5.2.2. Dímeros protonados de bases pirimidínicas . . . . .	103
5.3. Análisis y Discusión . . . . .	106
5.3.1. Validez de la estimación de los tiempos de vida a partir del ancho de banda . . . . .	106
5.3.2. Monómeros protonados . . . . .	107
5.3.2.1. Asignación de las estructuras . . . . .	107

5.3.2.2.	Tiempos de vida de los tautómeros asignados . . . . .	114
5.3.3.	Dímeros protonados de las bases pirimidínicas . . . . .	115
5.3.3.1.	Comparación entre monómeros y dímeros protonados . . . . .	115
5.3.3.2.	Estructuras en el estado fundamental . . . . .	118
5.3.3.3.	Asignación de las transiciones electrónicas . . . . .	120
5.3.3.4.	Estado electrónico excitado de los dímeros protonados . . . . .	122
5.3.3.5.	Tiempo de vida de los homodímeros protonados y comparación con los monómeros protonados . . . . .	123
5.4.	Conclusiones . . . . .	125
<b>6.</b>	<b>Interacción de Citosina con <math>\text{Ag}^+</math></b>	<b>127</b>
6.1.	Introducción . . . . .	128
6.2.	Resultados . . . . .	133
6.2.1.	Espectroscopía de DMIR de los sistemas $[\text{CAg}]^+$ , $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^+$ y $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	133
6.2.2.	Espectroscopía FUV del sistema $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	136
6.3.	Análisis y Discusión . . . . .	139
6.3.1.	Determinación estructural del ión $[\text{CAg}]^+$ mediante DMIR . . . . .	139
6.3.2.	Determinación estructural del ión $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^+$ mediante DMIR . . . . .	144
6.3.3.	Determinación estructural del ión $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ mediante DMIR . . . . .	148
6.3.4.	Efecto de la naturaleza catión en el tiempo de vida y propiedades electrónicas de los dímeros de bases del ADN: Comparación de los Sistemas $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ y $[\text{C}_2\text{H}]^+$ . . . . .	156
6.4.	Conclusiones . . . . .	162
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>165</b>
7.1.	Conclusiones y Perspectivas . . . . .	166
	<b>Bibliografía</b>	<b>175</b>
	<b>Agradecimientos</b>	<b>192</b>



# Índice de figuras

1.1. Estructura química y nomenclatura de los monómeros del ADN . . . . .	4
1.2. Concatenación de nucleótidos en una cadena de ADN . . . . .	4
1.3. Estructura conformacional de los nucleótidos . . . . .	5
1.4. Pares de bases de Watson Crick . . . . .	6
1.5. Estructuras terciarias del ADN/ARN . . . . .	7
1.6. Sintonización de espectros y marcado celular con sistemas híbridos $Ag_n$ -ADN . . . . .	13
1.7. Relación $Ag^+/Ag$ en la sintonización de los espectros $Ag_n$ -ADN . . . . .	15
2.1. Espectrómetro de masas por tiempo de vuelo . . . . .	23
2.2. Detector de iones MCP . . . . .	24
2.3. Espectrómetro de masas cuadrupolar . . . . .	26
2.4. Trampa iónica cuadrupolar tridimensional . . . . .	28
2.5. Trayectoria de iones en un FTICR . . . . .	31
2.6. Detección de iones en un espectrómetro FTICR . . . . .	32
2.7. Diseño Básico de un ESI . . . . .	34
2.8. Generación de iones aislados en fase gaseosa mediante un ESI . . . . .	35
2.9. Esquema de una expansión supersónica . . . . .	39
2.10. Esquema REMPI . . . . .	42
2.11. Esquema de DMIR . . . . .	44
2.12. Esquema FUV . . . . .	48
3.1. Cámara de haces moleculares . . . . .	54
3.2. Cámara desarrollada en el <i>Centro Láser de Ciencias Moleculares</i> UNC . . . . .	56
3.3. Sincronización de eventos en el sistema montado en el <i>Centro Láser de Ciencias Moleculares</i> UNC . . . . .	57
3.4. Láser de Ablación . . . . .	60
3.5. Láseres de excitación/ionización . . . . .	60
3.6. Sistema experimental del laboratorio de <i>Física de las Interacciones Iónicas y Moleculares</i> (PIIM) . . . . .	61
3.7. Sincronización de eventos para la obtención de un espectro FUV . . . . .	63
3.8. Láser de Fotofragmentación UV . . . . .	64
3.9. Sistema experimental empleado para los estudios de DMIR . . . . .	65
3.10. Láser electrones libres instalado en el <i>Centro Láser IR de Orsay</i> . . . . .	67
4.1. Generación de agregados moleculares de tolueno . . . . .	75
4.2. Generación de agregados moleculares del tipo $[Ba_n(Tol)_m]$ . . . . .	77
4.3. Generación de agregados moleculares del tipo $[Ag_n(MOV)_m]$ . . . . .	78
4.4. Generación de agregados moleculares del tipo $[Ag_n(Tyr)_m]$ . . . . .	80

4.5. Espectros REMPI de la Tirosina y el Dímero $\text{Ag}_2$ . . . . .	82
4.6. Generación de agregados moleculares del tipo $[\text{Ag}_n(\text{MOv})_m]^+$ . . . . .	84
4.7. Espectro REMPI de la tirosina . . . . .	86
4.8. Interacción $\text{Ag}/\text{Ba} \cdots \text{Tolueno}$ . . . . .	88
5.1. Pares de Bases de Watson-Crick . . . . .	96
5.2. Espectros FUV de las bases del ADN y ARN protonadas . . . . .	100
5.3. Ajuste de la progresión vibracional de las bases pirimidínicas protonadas . . . . .	101
5.4. Ensanchamiento vibracional de los espectros FUV de las bases púricas . . . . .	103
5.5. Espectros FUV de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas . . . . .	104
5.6. Ajuste de la progresión vibracional de los dímeros protonados de las bases pirimidínicas . . . . .	105
5.7. Simulación del espectro vibrorotacional de la Citosina . . . . .	110
5.8. Esquema de formación del complejo $[\text{U}_2\text{H}]^+$ . . . . .	119
5.9. Esquema de niveles del $[\text{U}_2\text{H}]^+$ . . . . .	120
5.10. Niveles de energía de las bases protonadas y los dímeros protonados . . . . .	123
6.1. Estructura determinada para el sistema $[\text{Pyr}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	131
6.2. Estructura y espectros de DMIR determinados para la sistemas del tipo $[\text{C-Metal Alcalino}]^+$ . . . . .	132
6.3. Espectro de masas y espectro de DMIR del sistema $[\text{CAg}]^+$ . . . . .	134
6.4. Espectro de masas y espectro de DMIR del sistema $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^+$ . . . . .	135
6.5. Espectro de masas y espectro de DMIR del sistema $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	137
6.6. Espectro de masas y espectro FUV del sistema $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	138
6.7. Espectros DMIR de $[\text{CAg}]^+$ . Comparación con espectros simulados . . . . .	142
6.8. Espectros DMIR de $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^+$ . Comparación con espectros simulados . . . . .	146
6.9. Estabilización por solvatación de los iones $[\text{CAg}]^+$ y $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^+$ . . . . .	149
6.10. Comparación de las estructuras $[\text{C}_2\text{H}]^+$ y $\text{KA}_\sigma\text{KA}_\sigma$ . . . . .	151
6.11. Espectro DMIR del Agregado $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	153
6.12. Espectros del isómero $\text{KA}_\sigma\text{KA}_\sigma$ . . . . .	154
6.13. Espectros de FUV de los sistemas $[\text{C}_2\text{H}]^+$ y $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	157
6.14. Orígenes de las transiciones electrónicas de los sistemas $[\text{C}_2\text{H}]^+$ y $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . . . . .	158
6.15. Esquema de la energética de los estado $\text{S}_0$ , $\text{A}'$ y $\text{A}''$ . . . . .	160
6.16. Orbitales involucrados en la transición electrónica de los complejos $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ y $[\text{C}_2\text{H}]^+$ . . . . .	161
7.1. Perspectivas. Espectros de DMIR de agregados con citidina y citidina monofosfato . . . . .	172



# Índice de tablas

4.1. Condiciones experimentales empleadas para la obtención de los espectros mostrados en la Figura 4.4 . . . . .	80
5.1. Tiempos de vida de las bases protonadas del ADN/ARN y los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas . . . . .	103
5.2. Bases Protonadas . . . . .	109
5.3. Estructura y energía de excitación electrónica de los dímeros protonados de bases pirimidínicas . . . . .	117
5.4. Tiempos de Vida de Dímeros Protonados de Bases Pirimidínicas . . . . .	124
6.1. Isómeros más estables del sistema $[C_{Ag}]^+$ . . . . .	141
6.2. Sitios de solvatación del ión $[C_{Ag}-H_2O]^+$ . . . . .	145
6.3. Isómeros del sistema $[C_2Ag]^+$ . . . . .	150
6.4. Estructura y excitación electrónica de los sistemas $[C_2Ag]^+$ y $[C_2H]^+$ . . . . .	159



# Nomenclatura y Acrónimos

## Fundamentos y Metodología

<b>m/z</b>	Relación <b>masa/carga</b>
<b>DMIR</b>	<b>Disociación Multifotónica InfraRroja</b>
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>TOF-MS</b>	Espectrometría de masas por tiempo de vuelo
<b>RF</b>	<b>Radio Frecuencias</b>
<b>MCP</b>	Detector <b>MicroChannel Plate</b>
<b>QIT</b>	Trampa caudrupolar tridimensional de iones
<b>FTICR</b>	Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de fourier
<b>REMPI</b>	Espectroscopía de ionización multifotónica aumentada por resonancia
<b>FUV</b>	<b>Fotofragmentación UltraVioleta</b>

## Bases del ADN/ARN

<b>T</b>	<b>Timina</b>
<b>C</b>	<b>Citosina</b>
<b>U</b>	<b>Uracilo</b>
<b>G</b>	<b>Guanina</b>
<b>A</b>	<b>Adenina</b>

## Tautomería de bases del ADN/ARN

<b>E</b>	<b>Enol</b>
<b>A</b>	<b>Amino</b>
<b>K</b>	<b>Kceto</b>
<b>I</b>	<b>Imino</b>



# Capítulo 1

## Introducción

---

La presente introducción tiene como principal finalidad, proveer un marco teórico general para establecer los objetivos de investigación de la tesis. Al avanzar en la lectura del texto, el lector encontrará que cada capítulo de resultados está acompañado de una introducción específica que contiene los antecedentes bibliográficos necesarios para sustentar el análisis y la discusión que se presenta en cada uno de ellos.

En una primera sección se repasan brevemente conceptos fundamentales respecto a los ácidos nucleicos (ADN/ARN), su composición, estructura y plegamientos. En la segunda sección de la introducción se comentan conceptos relacionados a los apareamientos y plegamientos no convencionales de los ácidos nucleicos. Por último se introducen aspectos relacionados con las propiedades ópticas de agregados de  $Ag_n$ , haciendo particular hincapié en la utilización de ADN como matriz para la síntesis de éstos, el efecto de la secuencia de ADN en la fotofísica de los agregados  $Ag_n$ -ADN y sus potenciales aplicaciones en diversas áreas de las ciencias.

## **1.1. Generalidades Acerca de los Ácidos Nucleicos: Estructura Primaria, Secundaria y Terciaria.**

En 1944 Avery, MacLeod y McCarty descubrieron el rol central que tienen los ácidos nucleicos (ADN/ARN) como agentes responsables de la transferencia de la información genética.[1] Las primeras investigaciones acerca de la estructura del ADN a partir de técnicas de difracción de rayos X, mostraron que en estado fibroso la macromolécula presenta una estructura en forma de hélice.[2, 3] Posteriormente Watson y Crick (WC) describieron la estructura del ADN como una doble hélice antiparalela, descubrimiento que se convirtió en el dogma fundamental de la biología molecular, y preparó el camino para describir los procesos de replicación, transcripción y traducción del ADN en términos moleculares.[4] Luego del descubrimiento de WC, se llevaron adelante una gran cantidad de estudios mediante diversas técnicas experimentales como difracción de rayos X, NMR y microscopía electrónica, con el objetivo de desentrañar la estructura de la macromolécula y proveer información acerca de la funcionalidad de ésta en la célula. Las referencias [5–9] son una breve reseña de la vasta bibliografía disponible, que se ocupa de revisar el conocimiento acerca de la estructura del ADN, su funcionalidad y la interacción de éste con proteínas y otros ligandos.

La macromolécula de los ácidos nucleicos está constituida por unidades monoméricas llamadas nucleótidos. La estructura primaria del polímero se define, al igual que para los polipéptidos, como la secuencia de monómeros que constituyen la biomolécula. Un nucleótido está compuesto por tres unidades química y estructuralmente diferentes, la base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato.[10]

El grupo fosfato es responsable de la acidez de la molécula ya que se encuentra completamente desprotonado a pH fisiológico. Existen dos azúcares naturales en los ácidos nucleicos, la  $\beta$ -D-deoxyribosa en el ADN y  $\beta$ -D-ribosa en el ARN, ambas pentosas cíclicas. Las bases son anillos aromáticos con nitrogénos heterocíclicos, provistas de varios grupos funcionales que puede actuar como donores o aceptores de enlaces puente hidrógeno.[10]

El análisis químico del material genético indica que existen 5 tipos de nucleótidos, que se diferencian únicamente por la base nitrogenada que lo compone. Existen dos bases púricas, adenina (A) y guanina (G) y tres pirimidínicas, citosina (C), timina (T) y uracilo (U). El U sustituye a la timina en el ARN, y se diferencia estructuralmente sólo en que la última se encuentra metilada en el C5. Además se ha demostrado que las relaciones molares G/C y A/T son cercanas a 1. Ésta información fue crítica para que Watson y Crick postularan la existencia de una doble hélice antiparalela unida por puentes hidrógeno.[10] En la Figura 1.1a se muestra la estructura y nomenclatura de las bases nitrogenadas que componen los nucleótidos.

En el ácido nucleico natural, los nucleótidos están compuestos en una primer instancia por un nucleósido, que se forma cuando una base y un azúcar se enlazan mediante un enlace glicosídico C-N, la posición de dicho enlace se muestra en la Figura 1.1a mediante línea de puntos. Luego el nucleósido se une a un grupo fosfato para dar lugar al nucleótido, dicho fosfato se une al carbono 3 de un nucleósido y al 5 de otro, lo que permite la prolongación de la molécula. A modo de ejemplo, en la Figura 1.1b se muestra la estructura bidimensional de dos nucleótidos, donde se esquematiza como se enlazan el azúcar, la base y el fosfato para dar lugar a la unidad monomérica. Por otro lado, para ejemplificar la concatenación de nucleótidos que da lugar a la formación de los ácidos nucleicos, en la Figura 1.2 se muestra la estructura bidimensional de una simple hebra de ARN de secuencia 5'GACC3'. [11]

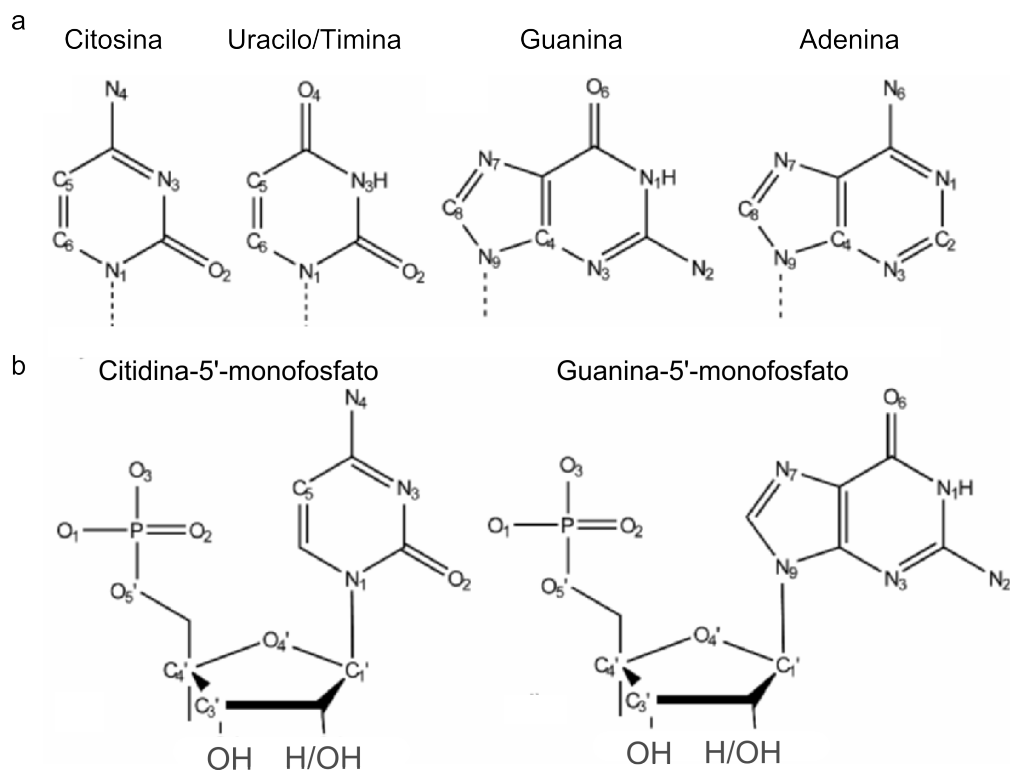


FIGURA 1.1: Estructura química y nomenclatura de los monómeros del ADN, figura tomada de la referencia [10].a) Bases nitrogenadas pirimidínicas (Citosina, Uracilo y Timina) y púricas (Guanina y Adenina). El Uracilo sustituye a la timina en el ARN, se diferencia estructuralmente sólo por una metilación en el C5. En línea de puntos se señala la posición del enlace glicosídico. b) Estructuras a modo de ejemplos de nucleótidos pirimidínicos y púricos, Citidina-5'-monofosfato y Guanina-5'-monofosfato.

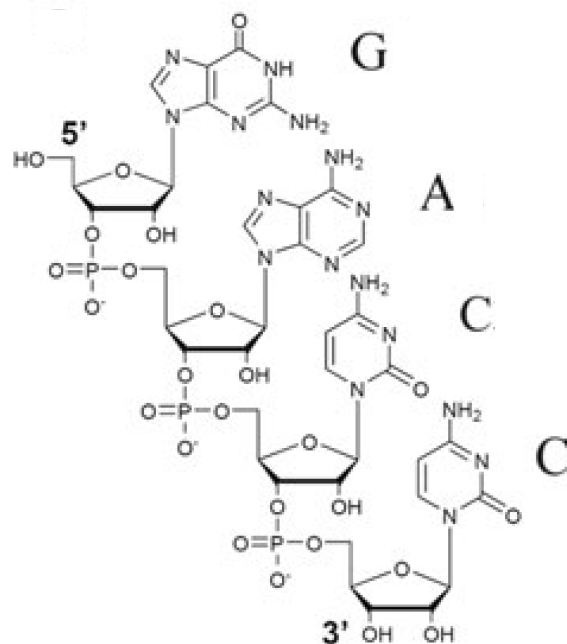


FIGURA 1.2: Estructura bidimensional de una hebra de ARN de secuencia 5'GACC3'. Esta imagen fue tomada de la referencia [11]



Los nucleótidos son moléculas estructuralmente complejas cuando se considera su conformación tridimensional, en la Figura 1.3 se muestran los conformeros relevantes para el plegamiento secundario y terciario de la macromolécula en su conjunto. La Figura 1.3a muestra las dos conformaciones biológicamente relevantes que puede adoptar el azúcar, se tratan de las estructuras de “Puckering” C3'-endo y C2'-endo. Al modificarse ésta conformación, el enlace fosfatídico del C3' pasa de encontrarse en posición ecuatorial a axial, lo que modifica el “esqueleto” de la molécula. Otra variación conformacional relevante es la rotación de la base respecto al enlace glicosídico, tal como se muestra en la Figura 1.3b. Cuando la rotación de dicho enlace es tal que la base se encuentra apartada de la azúcar se habla de una conformación anti. Mientras que, si la rotación del enlace aproxima la base al azúcar, se obtiene una conformación syn.

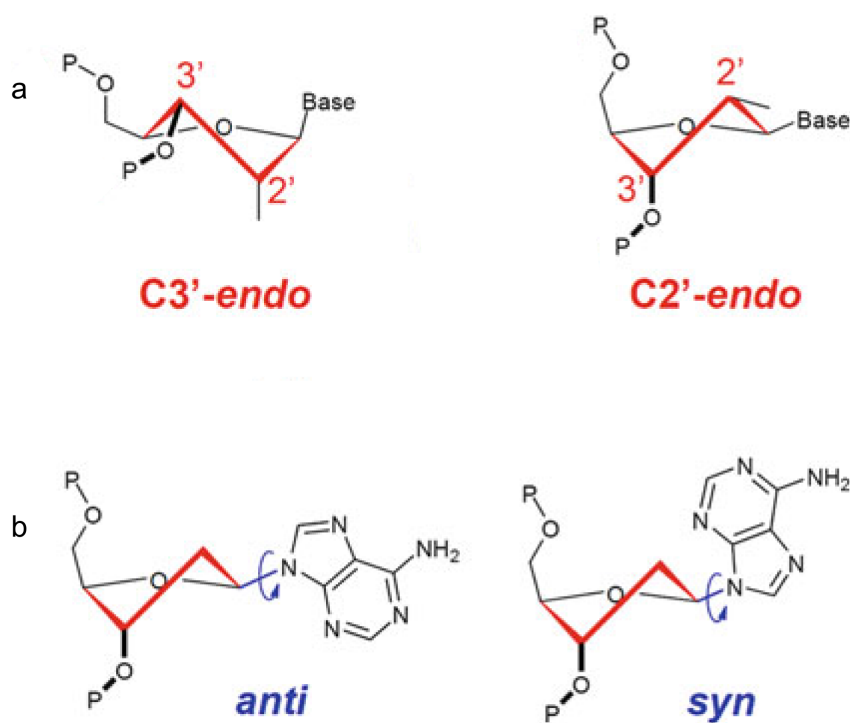


FIGURA 1.3: Estructura conformacional de los nucleótidos, esta imagen fue tomada de la referencia [11]. a) Conformeros rotacionales relevantes del azúcar. b) Rotación syn y anti del enlace glicosídico.

La estructura secundaria del ADN/ARN queda determinada por el apareamiento entre nucleótidos, que ocurre mediante los nitrógenos y oxígenos que las bases nitrogenadas presentan. Dichos grupos funcionales, además proveen el reconocimiento molecular necesario para la interacción ADN...proteína que posibilita tanto la replicación, transcripción y traducción de la información genética. En su forma canónica, las bases

adquieran tautomería ceto (K) y/o amino (A), la forma de interacción entre bases más conocida es la propuesta por WC,[4] en la que el reconocimiento molecular se produce por medio de los puentes H que forman los grupos K y A, y el puente hidrógeno  $N \cdots H-N$  formado entre los nitrógenos heterocíclicos de los anillos de 6 miembros, tal como se observa en la Figura 1.4. En la misma figura se muestra que, en las estructuras

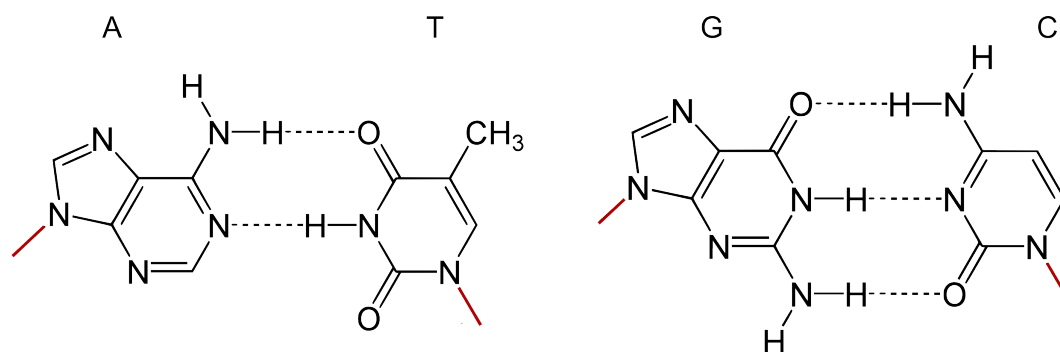


FIGURA 1.4: Pares de bases de WC. La G interacciona con la C y la A con la T, mediante tres y dos enlaces puente hidrógeno respectivamente. En las estructuras además se destaca en rojo la posición del enlace glicosídico, en los pares de WC dichos enlaces se encuentran de forma paralela (o cisoid), éste tipo de apareamiento conduce a la formación de la doble hélice del ADN.

de WC la G interacciona con la C y la A con la T, mediante tres y dos enlaces puente hidrógeno, respectivamente. En estas estructuras además se destaca en rojo la posición del enlace glicosídico, en los pares de WC dichos enlaces se encuentran de forma paralela (o cisoid). Éste tipo de reconocimiento molecular se conoce como apareamiento canónica y conduce a la formación de la doble hélice del ADN.[12] Sin embargo, como predijeron WC, la información genética puede alterarse por la presencia de bases en otros estados tautoméricos. Algunos años después de que WC propusieran el modelo de la doble hélice Löwdin señaló que un rearrreglo de los protones involucrados en la interacción de puente hidrógeno entre bases a través de efecto túnel, conduciría a la generación de tautómeros no canónicos, de tal manera que la duplicación de estas cadenas produciría la perpetración de un error en el código genético.[13] El rearrreglo necesario para modificar la tautomería de las bases es poco probable en el caso de que ambas se encuentren en estado neutro. Sin embargo, la transferencia de protón puede favorecerse en el caso de que alguna de las bases se encuentre en estado iónico,[13] ya sea formando un radical catión o por la interacción con otro ión, cuando esto ocurre la transferencia de protón por efecto túnel se ve favorecida, y de ésta manera la información genética se ve dañada irreversiblemente. Algunos de los mecanismos que podrían conllevar a la

obtención de cargas formales por parte de alguna de las bases involucradas en un par de WC son, la reacciones con aceptores o donores de electrones, ionización por interacción con radiación de alta energía, reacciones de protonación o interacción con otro tipo de cationes.[10, 13–15]

La estructura terciaria del ADN/ARN consiste en el plegamiento tridimensional que la macromolécula adopta, condicionada por la interacción entre pares de bases (estructura secundaria) y la estructura tridimensional de los nucleótidos. En la Figura 1.5 se muestran de forma esquemática algunas de las estructuras terciarias que pueden adoptar los ácidos nucleicos. Los plegamientos más comunes son los derivados de la doble

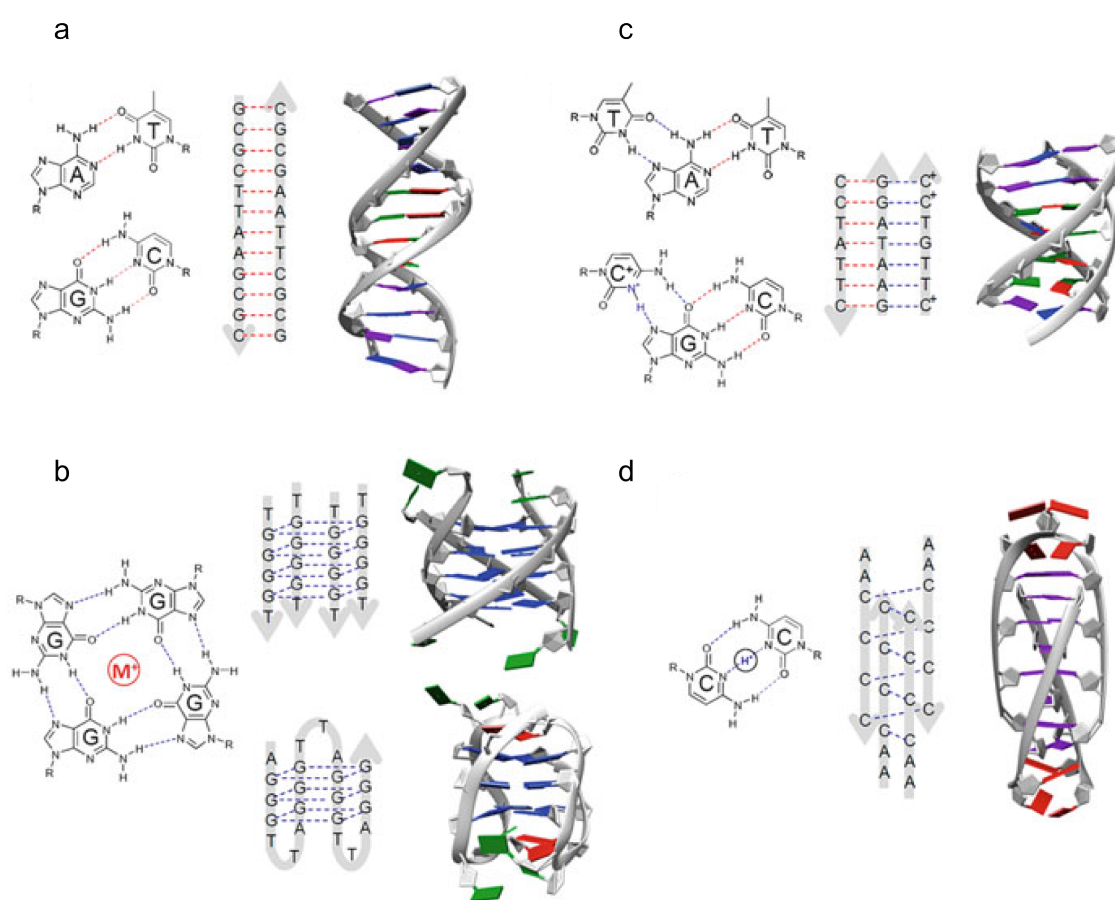


FIGURA 1.5: Esta imagen fue tomada de la referencia [11]. Principales estructuras terciarias junto con sus correspondientes estructuras secundarias. a) Doble hélice B de WC. b) Estructura de G-cuadruplex, en ésta se muestran dos ejemplos, el primer caso muestra la formación del G-cuadruplex a partir de cuatro cadenas de ADN mientras que el segundo caso muestra la formación de la misma estructura a partir de una única cadena de ADN. c) Formación de un triplex de ADN. d) Formación de un i-motif a partir de cuatro cadenas de ADN. A, G, T, y C se esquematizan en rojo, azul, verde y púrpura respectivamente.

hélice originalmente descrita por WC. Genéricamente existen tres estructuras de doble

hélice denotadas con las siglas A, B y Z. Las estructuras A y B son dextrorrotatorias, mientras que la estructura Z es levorrotatoria.[10] Las dobles hélices dextrorrotatorias son las comúnmente encontradas tanto en ADN como en ARN.[16] A modo de ejemplo, en la Figura 1.5a se muestra una doble hélice B de ADN tomada de la referencia [11]. En el caso del ADN, la estructura más estable bajo condiciones fisiológicas es la doble hélice B, formada mediante el apareamiento canónico de los pares A·T y G·C. El diámetro de la doble hélice es de 20 Å y un giro completo de la misma se produce cada 10 pares de bases, en esta estructura los azúcares se encuentran en conformación C2'-endo con todas las bases en posición anti.[10] Por otro lado en el caso de la estructura A, el azúcar se encuentra en posición C3'-endo, lo que acerca los fosfatos consecutivos de las bases y altera el ángulo del enlace glicosídico.[10] La doble hélice Z es estructuralmente compleja y poco común, en ella, los enlaces glicosídicos se encuentran en posición syn o anti según si la base es purica o pirimidínica, respectivamente. Algo similar ocurre con la conformación del azúcar, que para las bases puricas se encuentra en conformación C3'-endo y C2'-endo para las pirimidínicas.[10] Esta conformación es muy poco común bajo condiciones fisiológicas, sin embargo puede formar complejos con proteínas y se cree que dicha interacción puede constituir un mecanismo de regulación de la transcripción.[17]

## 1.2. Apareamientos y Plegamientos No Canónicos

### 1.2.1. Apareamientos no convencionales

Otras estructuras de apareamientos entre bases, distintas a las descritas por WC, pueden generarse en los ácidos nucleicos, a estos apareamientos no convencionales se los llama genéricamente “pares de bases no canónicos”. Éstos pueden formarse por la existencia de bases que presenten tautomerismos diferentes a los canónicos,[13] o por otras causas como la interacción con ligandos o cationes presentes en el medio,[18–20] o más aún, debido a la inserción mediante métodos químicos de bases nitrogenadas exógenas al ADN/ARN.[21] El apareamiento no canónico, posteriormente puede conducir a modificaciones en la estructura terciaria de la macromolécula en su conjunto, o la generación de dominios con plegamientos particulares. La idea de modificar el tipo de interacciones entre bases para generar nuevos apareamientos no canónicos ha cobrado gran interés en los últimos años, debido a las potenciales aplicaciones que pueden derivar del hecho de

manipular la estructura del ADN/ARN tanto natural como artificial en el ámbito de las ciencias biológicas y de desarrollo de materiales.[22–26] La idea central se basa en modificar la interacción canónica que opera en el apareamiento de tipo WC, por nuevas interacciones no covalentes (por ejemplo enlaces de puente hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, complementariedad estructural y funcionalizaciones específicas),[21] que conduzcan a nuevas formas de apareamiento entre bases. Un método que en los últimos años ha cobrado gran importancia para la generación de pares de bases no canónicos, es la formación de pares de bases mediados por metales (PBMM). La idea que subyace a la generación de éstos es, la de remplazar los átomos de hidrógeno involucrados en los enlaces de puente hidrógeno entre bases, por cationes metálicos.[21] Los PBMM constituyen un gran avance en el intento de expandir el código genético, debido a que se han encontrado al menos 23 PBMM que se han logrado incluir en la doble hélice del ADN. En la referencia [21] se realiza una descripción completa de los diferentes PBMM estudiados a lo largo del tiempo, y además se detalla su potencial aplicación a áreas de la investigación como la biología molecular, el desarrollo de materiales y aplicaciones nanotecnológicas.

### 1.2.2. Plegamientos no canónicos

Además de las estructuras de doble hélice, se han encontrado otras estructuras de plegamiento terciario de los ácidos nucleicos que involucran apareamientos no canónicos entre bases.[11] A continuación se describen brevemente las características de algunos de los plegamientos no canónicos más relevantes:

- Se ha encontrado que secciones de material genético rico en G puede plegarse de forma no canónica en la estructura conocida como “G-cuadruplex” que se muestra en la Figura 1.5b. Estas estructuras se encuentran tanto en ADN como en ARN y se genera a partir de la interacción no canónica por puente hidrógeno entre cuatro G provenientes de una, dos o cuatro cadenas de ácidos nucleicos. Esta estructura a su vez es estabilizada por la presencia de un catión monovalente, generalmente  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , que se sitúa en el centro del canal que genera el cuadruplex.[27] En los últimos años se han encontrado secuencias de bases susceptibles a adoptar conformaciones de tipo “G-cuadruplex” en secciones teloméricas y en promotores de oncogenes, lo que ha convertido éste tipo

de estructuras en el blanco de investigación para el desarrollo de nuevos tratamientos médicos.[28]

- El “triplex de ADN” es una estructura en la que tres cadenas de oligonucleótidos forman una tripe hélice, la cual se esquematiza en la Figura 1.5c. En este tipo de estructuras, dos cadenas forman una doble hélice B canónica, mientras que la tercer hebra se une a la doblé hélice mediante interacciones no canónicas. Éste tipo de plegamientos posee actividad regulatoria de la expresión génica, y actualmente su manipulación tiene gran interés en el área de la biotecnología.[29]
- Otro plegamiento macromolecular importante que puede adoptar el ADN/ARN es el llamado “i-motif”, que se muestra en la Figura 1.5d. Al igual que el “G-cuadruplex”, ésta es una estructura tetramérica que se puede formar entre una, dos o cuatro cadena de ácidos nucleicos. Generalmente esta estructura se produce en condiciones ligeramente ácidas y en particular, cuando las cadenas son ricas en C.[30] Es sabido que este tipo de plegamiento es muy importante por estar relacionadas con el desarrollo de enfermedades de retardo mental.[31] El i-motif es producido por la interacción no convencional, mediada por un  $H^+$ , entre dos C de dos cadenas paralelas, que da lugar a la formación de un par C- $H^+$ -C, con sus enlaces glicosídicos en posición antiparalela (o transoid). El plegamiento global se estabiliza por intercalación de los pares C- $H^+$ -C provenientes de dos cadenas diméricas.[32]

En literatura existen muy pocos ejemplos de formación de i-motif a pH fisiológico,[33–35] sin embargo, recientemente Day y colaboradores han demostrado que se pueden obtener estructuras del tipo i-motif a dicho pH en presencia de iones  $Ag^+$ , los cuales son responsables de inducir el plegamiento del ADN tomando el lugar del protón.[36] En el Capítulo 6 se profundizará el estudio de la formación y estabilización de estas estructuras en presencia del catión  $Ag^+$  mediante la formación del par C- $Ag^+$ -C.

En los últimos años, el estudio y manipulación de la estructura secundaria y terciaria del ADN/ARN, que pueden formarse a partir de interacciones no canónicas, en regiones con secuencias específicas, o en momentos particulares del ciclo celular, ha ganado un gran impulso debido a su vinculación a funciones biológicas específicas y a su potencial aplicación en áreas de investigación como la medicina, desarrollo de materiales y nuevas tecnologías. Es por ésto que, el estudio de la estructura, termodinámica e interacción

con ligandos de estas estructuras no canónicas se ha convertido en una importante área de investigación.[11]

### 1.3. Propiedades Ópticas de Agregados de $\text{Ag}_n$

El estudio de agregados (o clusters) metálicos de unos pocos átomos, es objeto de gran interés actual por constituir el nexo entre las propiedades de los átomos aislados, nanopartículas (NPs) y el sólido extendido, y por sus fascinantes propiedades fotofísicas.[37] La respuesta óptica de los metales en la nanoescala puede ser clasificada en tres escalas de tamaño:[38] 1) nanopartículas (NP) grandes; 2) NP pequeñas y 3) agregado (ó cluster), que se corresponden a tres escalas de longitud características.

Para NPs grandes, cuyo tamaño es mayor que la longitud de onda ( $\lambda$ ) incidente, la respuesta óptica depende de su tamaño, forma y densidad de electrones libres, y por lo tanto pueden ser descritas por la constante dieléctrica del metal relativa al medio externo, por medio de la electrodinámica clásica.[38]

En el caso de las NPs pequeñas, cuando el tamaño de la partícula se aproxima al recorrido libre medio del electrón en el sólido extendido (aproximadamente 40-50 nm para Au y Ag), la constante dieléctrica se torna dependiente del tamaño de la NP, pero efectuando correcciones apropiadas a dicha constante, la electrodinámica clásica puede describir adecuadamente sus propiedades ópticas.[39]

Tanto las NP grandes como las pequeñas exhiben oscilaciones colectivas de los electrones de conducción, conocidas como plasmones superficiales. La excitación fotónica de los plasmones a la longitud de onda a la cual ocurre la resonancia, produce una banda de absorción plasmónica en la región UV-vis, la cual es fuertemente dependiente del tamaño y forma de la partícula.[38]

Eventualmente, cuando el tamaño de la partícula se torna comparable a la tercera longitud característica (longitud de onda de Fermi del electrón o la longitud de onda de Broglie a la energía de Fermi), la cual se encuentra entre 0,5 – 1,0 nm para Au y Ag, las propiedades ópticas, electrónicas y químicas del metal, difieren dramáticamente con respecto a los otros dos regímenes de tamaño.[38, 40–42]

El interés en el estudio de estos agregados pequeños radica en sus fascinantes propiedades fotofísicas, en particular, su rendimiento cuántico de fluorescencia, el cual es comparable al de los quantum-dots semiconductores (nanopartículas pequeñas de Cd-Se, calcogenuros, etc.), con las ventajas frente a estos de tener baja toxicidad y ser biocompatibles.[43] Además, poseen la propiedad de que los espectros de absorción y emisión son sintonizables, cambiando el número de átomos que componen el cluster y la naturaleza de las interacciones intermoleculares de las matrices orgánicas en las cuales se generan.[38]

Así por ejemplo, Dickson ha mostrado que puede obtenerse un gran incremento en las señales de fluorescencia, encapsulando pequeños clusters de  $Ag_{2-8}$  en dendrímeros,[44] estructuras peptídicas [45] y cadenas de ADN. [46] Entre las diversas moléculas empleadas para estabilizar agregados de Ag, la utilización de ADN como matriz para su síntesis reviste particular interés debido a que, se ha encontrado que los agregados de  $Ag_n$  sintetizados en dichas matrices exhiben espectros de fluorescencia que dependen fuertemente de la secuencia de bases que constituyen las cadenas empleadas, lo que permite sintonizar el espectro de absorción/emisión de los mismos desde el IR al UV.[47–51] La utilización de diversos oligómeros de ADN o ARN para seleccionar y modificar la longitud de onda de emisión fluorescente, es la clave que subyace a las recientes aplicaciones de este tipo de fluoróforos en el mercado celular,[52] aplicaciones analíticas relacionadas a la detección de cadenas oligoméricas[53] o cationes metálicos específicos,[54] y en esquemas de puertas lógicas moleculares.[55]

La Figura 1.6, tomada de la referencia [52], constituye un ejemplo elegante, de la capacidad de sintonización de los espectros de absorción y emisión que provee la utilización de matrices de ADN para la síntesis de agregados de Ag, y su potencial aplicación como marcadores celulares. En la Figura 1.6a se muestran los espectros de emisión de una serie de agregados de Ag sintetizados en matrices de ADN con diferentes secuencias de nucleótidos. En la misma se observa claramente que, dependiendo de la cadena empleada para la síntesis, el espectro de emisión se puede sintonizar desde 500 a 750 nm. En la Figura 1.6b, se muestra una imagen de microscopía de fluorescencia con focal de una célula NIH 3T3, en la que dos anticuerpos, anti mitocondria y anti membrana celular, han sido modificados con secuencias de ADN específicos para generar agregados  $Ag_n$ -ADN fluorescentes “rojos” y “verdes”, respectivamente. En el mismo trabajo [52] además, se analiza la fotoestabilidad de los agregados de  $Ag_n$ -ADN en



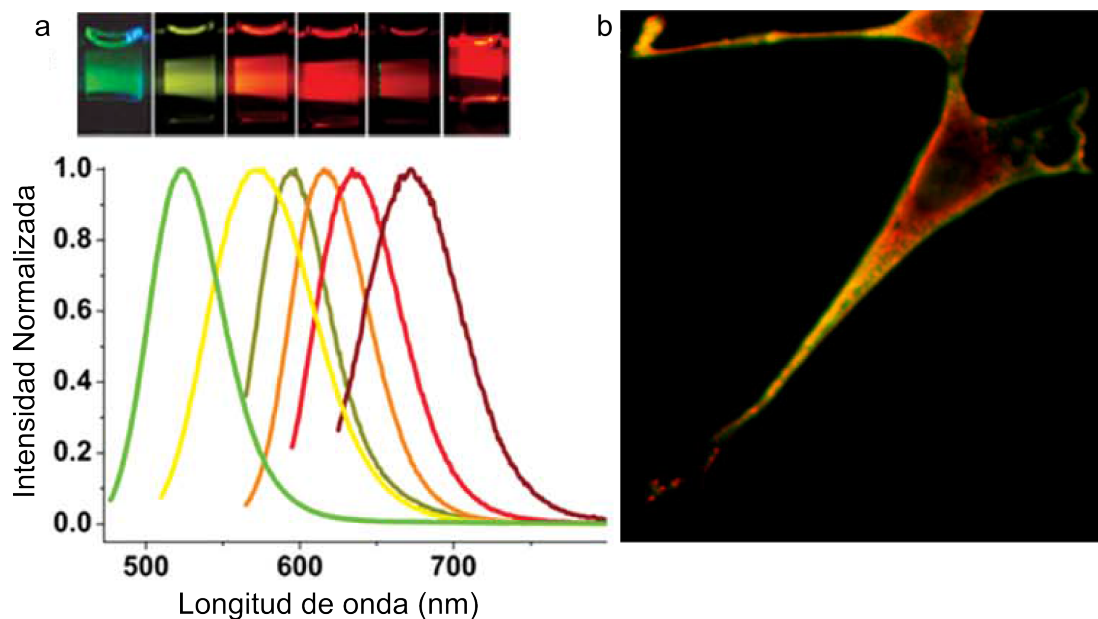


FIGURA 1.6: Esta imagen fue tomada de la referencia [52]. a) Espectros de emisión de agregados  $Ag_n$ -ADN generados con diferentes cadenas de oligonucleótidos. Las secuencias de bases, de menor a mayor longitud de onda de emisión son, 523 nm ( $C_{20}$ ), 562 nm ( $AATTC_{12}$ ), 590 nm ( $CGAAC_{12}$ ), 615 nm ( $CGCGC_{12}$ ), 635 nm ( $ATATC_8$ ), 670 nm ( $GGGGC_8$ ). b) Imagen de microscopia de fluorescencia con focal obtenida por doble marcado con anticuerpos anti mitocondria y anti membrana celular, modificados con cadenas de nucleótidos para generar emisores rojos y verdes respectivamente.

comparación con el marcador celular convencional HCS, midiendo el decaimiento de la intensidad de la emisión fluorescente en una misma célula como función del tiempo de irradiación, a diferentes energías de excitación. Los resultados muestran que, para las energías de excitación empleadas, los marcadores sintetizados en las matrices de ADN son muy superiores en estabilidad respecto al marcador convencional. Estos resultados son una prueba contundente de la potencialidad que tiene los agregados  $Ag_n$ -ADN para la síntesis de bio-marcadores.

Mas allá de la gran potencialidad que este tipo de fluoróforos presenta para el desarrollo de diversas aplicaciones tecnológicas, todavía no se comprenden los factores que controlan su respuesta espectroscópica. Debido a que las secuencias de ADN/ARN que pueden ensayarse para la síntesis de estos agregados son virtualmente infinitas, profundizar en el entendimiento de la naturaleza de su fotofísica es de primordial importancia para desarrollar esquemas de síntesis racionales.[56]

Algunas de las preguntas que se abren respecto a la fotofísica de éstos sistemas son

los siguientes: ¿a cuántas bases se enlaza el agregado de  $\text{Ag}_n$ ?, ¿Las bases que no interactúan con el agregado, afectan a la fotofísica del sistema en su conjunto?, ¿Cómo influye la estructura primaria del oligonucleótido en la sintonización de los espectros?, ¿Cómo afecta la estructura secundaria del ADN a la estabilidad y fotofísica de los agregados?, ¿Qué estados de carga tiene los clusters  $\text{Ag}_n$ ?.[49] Si bien la diversidad de aspectos que quedan por entender respecto a la fotofísica de estos fluoróforos puede parecer abrumadora, en los últimos años algunos trabajos experimentales han contribuido a comenzar a desentrañar la naturaleza de sus propiedades distintivas. Algunos de los resultados más importantes a destacar se comentan brevemente a continuación:

- El estudio de la dependencia de la intensidad de fluorescencia obtenida, en función del pH empleado para la síntesis de agregados de  $\text{Ag}_n$ , brindan indicios respecto al sitio de interacción del metal con el ADN. Al utilizar cadenas de doce nucleótidos de C como matriz para la síntesis, los autores muestran que se obtiene una notable disminución de la intensidad de fluorescencia a  $\text{pH} < 5,5$  por debajo del  $\text{pK}_a$  del N3 de la C, lograndose un máximo de fluorescencia a pH cercanos al  $\text{pK}_a$  de dicho nitrógeno.[46] Los autores sugieren que éstos resultados indican que el sitio de unión del cluster de  $\text{Ag}_n$  es el N3 de la citosina.
- En la referencia [56], Gwinn y colaboradores estudiaron la composición de los agregados  $\text{Ag}_n$ -ADN por medio de de HPLC con detección de fluorescencia acoplada espectrometría de masas de alta resolución. Una parte de los resultados que se presentan en dicho trabajo están condensados en la Figura 1.7, y constituyen una de las primeras descripciones detalladas de la estructura de éstos fluoróforos, que aquí discutiremos brevemente.

En la Figura 1.7a se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis de los patrones isotópicos de los picos de los espectros de masa, con el que los autores determinaron el estado de carga de los agregados de  $\text{Ag}_n$  y la proporción de especies  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  que estos presentan. En ésta se grafica la carga del agregado ( $Q_{\text{cluster}}$ ) vs. el número de total de átomos presentes ( $N_{\text{Ag}}$ ). Los clusters que presenta fluorescencia se denotan con triángulos, mientras que los sistemas no fluorescentes se grafican en círculos, los colores rojo y verde se utilizan para distinguir los clusters formados por una o dos cadenas de ADN, respectivamente. En línea punteada negra, se resalta la situación en la que todos los átomos metálicos se encuentran en estado iónico, los resultados muestran que éstos no presentan fluorescencia, e indican que sólo los agregados formados por combinación de átomos Ag e iones  $\text{Ag}^+$  son fluorescentes. En base a la relación de iones y átomos neutros

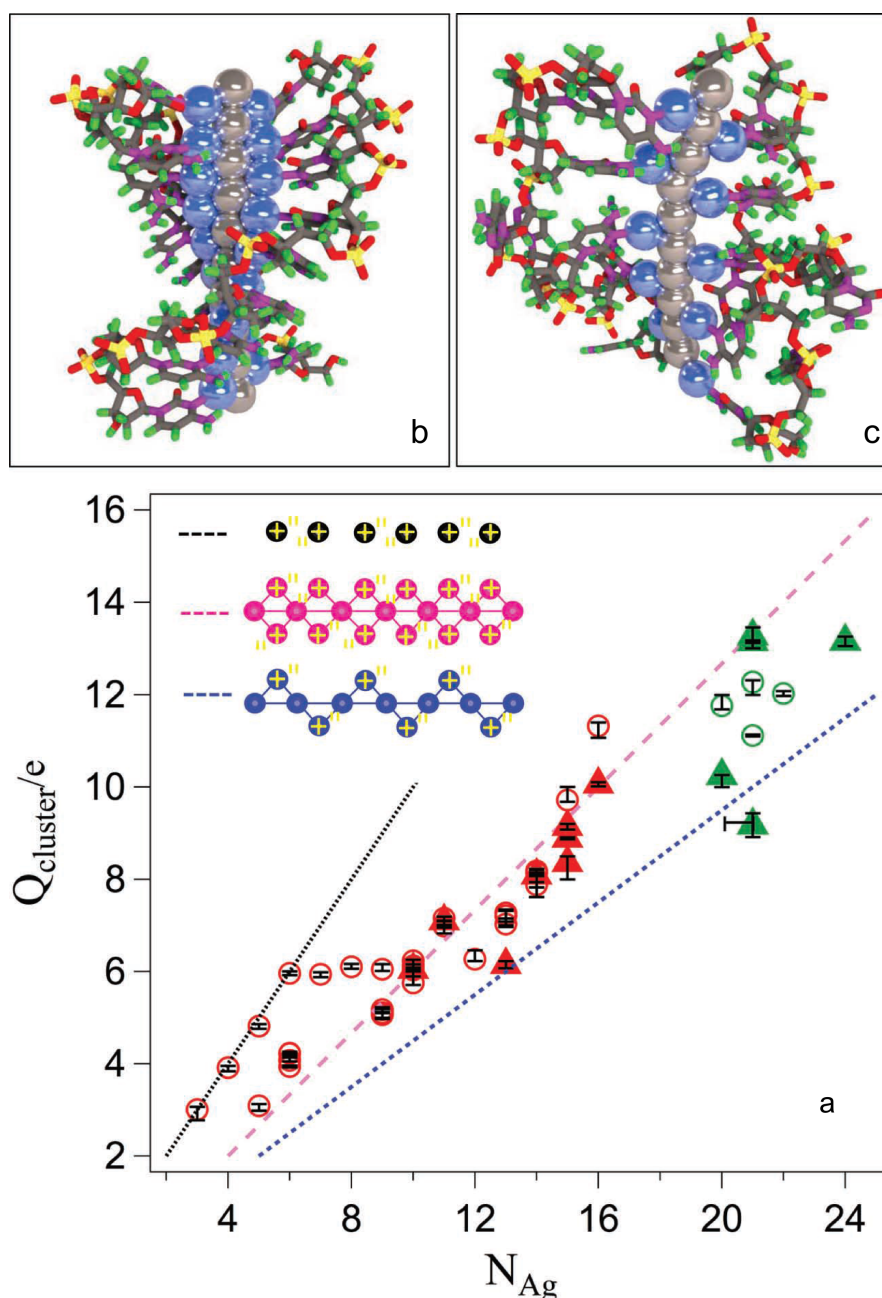


FIGURA 1.7: Esta imagen fue tomada de la referencia [56]. a) Gráfico de la carga del agregado ( $Q_{\text{cluster}}$ ) en función del número total de átomos y cationes  $\text{Ag}+\text{Ag}^+$  ( $N_{\text{Ag}}$ ). En círculos y triángulos se grafican los agregados “oscuros” y fluorescentes, respectivamente. El código de colores se emplea para distinguir entre los agregados formados por una cadena de ADN (rojo) y los formados por una doble hebra (verdes). La línea de trazos negra corresponde a la relación  $Q_{\text{cluster}} = N_{\text{Ag}}$ , por lo que todos los átomos se encuentran en forma catiónica, éstos no presentan fluorescencia. La línea rosa y púrpura corresponden a agregados cuya relaciones  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  fue asignada a estructuras de tipo rod, y esquematizados en la parte superior de la figura, utilizando círculos para los átomos de  $\text{Ag}$  y  $+$  para los cationes. b-c) Ejemplos de estructuras tridimensionales, esquematizadas utilizando esferas grises y azules para los átomos neutros y cationes, respectivamente.

presentes en los agregados, se propuso que la geometría de los clusters de  $\text{Ag}_n$  debe consistir probablemente en bastones (o “rods”), más que estructuras planas o globulares. La estabilización entre átomos neutros e iones que se propuso se encuentra esquematizada en la parte superior de la Figura 1.7a, mientras que en las Figuras 1.7(b y c) muestran ejemplos de estructuras tridimensionales propuestas. La comparación de las energías de excitación experimentales y simuladas apoyan la conclusión de la presencia de agregados en forma de “rods”, y más aún, considerando estas estructuras se logró relacionar la cantidad de átomos neutros presentes en el “rod” con la energía de excitación del agregado. En base a estos resultados, se considera que los agregados  $\text{Ag}_n$ -ADN deben consistir en una doble hélice de ADN (formada por una o dos hebras) que estabiliza un “rod” compuesto por iones  $\text{Ag}^+$  y átomos  $\text{Ag}$ . Finalmente los autores concluyen que la relación entre la sintonización del espectro y la secuencia del oligonucleótido está dada mayormente, por la capacidad de la matriz de estabilizar “rods” de diferentes largos y estados de carga.[56]

Los sistemas  $\text{Ag}_n$ -ADN poseen dos bandas intensas de absorción, una en la región visible del espectro que es sintonizable con la secuencia de oligonucleótidos empleados, y otra en la región UV del espectro, que es común a todos los fluoróforos sin importar la posición de la banda visible. La banda de absorción UV está localizada en la región espectral donde se espera que absorban las cadenas de oligonucleótidos (260-270 nm). Fygenon y colaboradores,[49] mostraron que la excitación de la banda UV produce el mismo espectro de emisión que la excitación de la banda visible, y descartó que dicha excitación se deba a estados electrónicos de alta energía como originalmente se había propuesto,[57] sino que se debe a la excitación del oligonucleótido. Esta conclusión abre un nuevo interrogante puesto a que se conoce muy bien que las bases del ADN poseen tiempos de vida cortos en sus estados electrónicos excitados y rendimientos cuánticos de fluorescencia extremadamente bajos,[58–60] por lo que cabe plantearse ¿por qué razón la interacción con  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  incrementa el rendimiento de fluorescencia en los sistemas  $\text{Ag}_n$ -ADN?. En el Capítulo 6 de la tesis, se profundizara sobre los fundamentos de esta última pregunta en base a los tiempos de vida de los estados electrónicos excitados de las bases del ADN y se estudiara la naturaleza de la banda de absorción UV.

## 1.4. Objetivos y Organización de la Tesis

En virtud de los antecedentes descritos en las secciones anteriores, el objetivo general planteado para esta tesis fue estudiar la interacción de ADN con cationes desde dos puntos de vista: por un lado para avanzar en el entendimiento del efecto de dicha interacción sobre la estabilización de estructuras no canónicas en el ADN; Por otro lado, estudiar a nivel molecular la fotofísica de los sistemas que surgen de dicha interacción con el objeto de generar un modelo reduccionista de los sistemas  $\text{Ag}_n\text{-ADN}$ , que permita brindar información detallada de la fotofísica de éste tipo de fluoróforos en la banda de excitación UV. Específicamente, se propuso estudiar la estructura de agregados formados por  $\text{Ag}^+$  con bases del ADN (en particular C) mediante la técnica de disociación multifotónica IR, para determinar la estructura del PBMM  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$  que permite estabilizar estructuras no canónicas como los i-motif. Además se propuso estudiar la espectroscopía electrónica de las bases protonadas y homodimeros de las bases pirimidínicas protonadas, para posteriormente comparar el efecto de la naturaleza del catión, en los sistemas  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  y  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , sobre el tiempo de vida del estado electrónico excitado de los agregados.

Al avanzar en la lectura del presente trabajo, inicialmente el lector se encontrará con una descripción detallada de los fundamentos fisicoquímicos de las técnicas de espectrometría de masas y de espectroscopía láser empleadas en la tesis. En el Capítulo 3 se describen los sistemas experimentales empleados, desde su construcción y partes constituyentes, hasta la sincronización de los eventos necesarios para llevar a cabo los experimentos, además se describen los sistemas láseres empleados para cada tipo de espectroscopía.

En el Capítulo 4, se presentan los resultados obtenidos respecto a la generación de agregados de Ag en estado iónico y neutro con diversas moléculas orgánicas, mediante vaporización láser acoplada a expansiones supersónicas. Las moléculas empleadas para tal fin (Tolueno, Tirosina y Piridina), fueron elegidas por ser modelos simples de las matrices empleadas para la síntesis de agregados de  $\text{Ag}_n$  en solución.

En el Capítulo 5, se presentan los resultados obtenidos mediante espectroscopía de fragmentación UV de las bases protonadas del ADN, y los homodimeros protonados de

las bases pirimidínicas. En el mismo se comparan, el origen de las transiciones electrónicas con cálculos computacionales del estado electrónico excitado de dichos sistemas protonados, con el fin de asignar la respuesta espectroscópica experimental a los diferentes tautómeros de las bases protonadas y sus dímeros. El ancho de las bandas vibracionales se emplea para realizar una estimación del tiempo de vida del estado excitado de dichos tautómeros.

En el Capítulo 6, mediante la técnica de espectroscopía de disociación multifotónica IR, se estudia desde un enfoque *bottom up*, la estructura de agregados de  $\text{Ag}^+\cdots\text{C}$  de complejidad creciente. Esta primera etapa permitió caracterizar estructuralmente los agregados  $[\text{C}\text{Ag}]^+$ ,  $[\text{C}\text{Ag}-\text{H}_2\text{O}]^+$  y el PBMM  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , y relacionar este apareamiento no convencional con estructuras no canónicas del ADN. En una segunda instancia, se muestran los resultados de la espectroscopía de fragmentación UV del agregado  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , y se discuten contrastando con los resultados obtenidos para el homodímero protonado  $[\text{C}_2\text{H}]^+$ . Bajo la aproximación de utilizar dichos sistemas como un modelo reduccionista de los fluoróforos  $\text{Ag}_n\text{-ADN}$ , se obtuvo información a nivel molecular acerca del efecto de la naturaleza del catión en la fotofísica de la banda de absorción UV de las bases del ADN y el origen de la misma.

En el Capítulo 7 se condensan las conclusiones más relevantes de la tesis y se comentan brevemente las perspectivas de trabajo que quedan abiertas a partir de la realización del presente trabajo doctoral.

## Capítulo 2

# Fundamentos

---

Las herramientas principales utilizadas durante el desarrollo de esta tesis para el estudio de las interacciones entre átomos/cationes y bases del ADN fueron la espectroscopía electrónica y vibracional, en ambos casos acopladas a espectrometría de masas. A partir de éstas, se caracterizaron estructuralmente los complejos ADN... Átomos/Cationes y se obtuvo información acerca de la dinámica del estado electrónico excitado.

En los sistemas experimentales empleados, la existencia del proceso de absorción de radiación se infiere a partir de la detección de iones mediante espectrometría de masas. Por lo que, en este capítulo en una primera instancia repasaremos el principio de funcionamiento de las partes constituyentes de los espectrómetros de masas utilizados para los diferentes experimentos espectroscópicos. La descripción de los esquemas experimentales en su conjunto, y el funcionamiento de dichos espectrómetros se trata en el Capítulo 3.

En la segunda sección del capítulo, se describen los fundamentos de los métodos de vaporización de muestras empleados durante el desarrollo de la tesis.

Luego, en una tercera instancia, se describen brevemente los fundamentos fisicoquímicos que subyacen al funcionamiento de las expansiones supersónicas, debido a que se utilizaron durante el desarrollo de la tesis para producir enfriamiento y agregación de moléculas vaporizadas por irradiación láser.

Finalmente, en la cuarta sección del presente capítulo, se establecen los fundamentos fisicoquímicos de las técnicas espectroscópicas utilizadas, y se describe la información que puede inferirse a partir de cada una de éstas.

## 2.1. Espectrometría de masa

La espectrometría de masas es una herramienta indispensable para el desarrollo de diversas áreas de la ciencia como la química, bioquímica, farmacia y medicina. Se utiliza para llevar a cabo diversas tareas como la identificación de compuestos mediante comparación con librerías de datos,[61] secuenciación de biomoléculas,[62] exploración de células y tejidos,[63] determinación estructural de nuevos compuestos,[64] y además tiene un gran número de aplicaciones en química analítica relacionada con el análisis ambiental y control de calidad,[65, 66] sólo para nombrar algunas. Durante el desarrollo de esta tesis se utilizó la espectrometría de masas en combinación con fuentes de radiación



láser, dicha combinación permite la generación de diversos arreglos experimentales que constituyen el estado del arte de la espectroscopía moderna.

El principio de funcionamiento de la espectrometría de masas se basa en la generación de iones a partir de especies orgánicas o inorgánicas, la separación de dichos iones según su relación masa/carga ( $m/z$ ) y la posterior detección cualitativa o cuantitativa de la abundancia de cada ión según su  $m/z$ . [67] La ionización del analito puede efectuarse de diversas formas, mediante la ionización térmica, por la aplicación de campos eléctricos, por el impacto de partículas neutras o cargadas (electrones o iones), con fotones de alta energía (proceso denominada fotoionización), por desorción láser y por “*electrospray*” (ESI). La separación en función de la relación  $m/z$  puede llevarse a cabo mediante la aplicación estática o dinámica de campos eléctricos, magnéticos y radiofrecuencias (RF), o incluso en ausencia de campos, si previamente se provee de igual energía cinética a todos los iones. [67]

Un espectrómetro de masa es un sistema experimental que consta de una fuente de iones, un analizador y un detector, que funcionan conjuntamente en alto vacío. Claramente cualquier técnica que pueda utilizarse para conseguir los diferentes objetivos de ionización, separación y detección de iones se puede emplear para la construcción de un espectrómetro de masas, por lo que en la actualidad existe una gran diversidad de ensamblajes experimentales entre los cuales el usuario debe elegir en función del objetivo de su estudio. Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron diferentes espectrómetros de masas (MS) y masa en tándem (MS/MS). En esta sección se explicará brevemente el principio de funcionamiento de los diferentes espectrómetros de masas, para poder comprender globalmente el funcionamiento de los diferentes esquemas experimentales empleados para desarrollar los estudios espectroscópicos.

### 2.1.1. Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo

La espectrometría de masa por tiempo de vuelo (TOF, del inglés “*time of flight*”) fue desarrollada por W. E. Stephens cuyo trabajo original fue publicado en 1946. [68] El principio de funcionamiento de un espectrómetro TOF es sencillo. Los iones generados por una fuente son acelerados de forma tal que todos posean la misma energía cinética, y por tanto velocidades diferentes según su  $m/z$ . De esta forma los iones se separan temporalmente en una “carrera” a lo largo de un trayecto libre de campos eléctricos o

magnéticos, tal que los iones de menor  $m/z$  llegaran al detector a tiempos más cortos que las de mayor  $m/z$ . [69] Esta característica convierte en requisito que la fuente de iones utilizada sea pulsada y en el caso de utilizar fuentes continuas es necesario adaptarlas para generar “paquetes de iones” (véase Sección 2.1.2). Entre las principales ventajas de este tipo de analizadores se puede mencionar su bajo costo de construcción, un rango de  $m/z$  virtualmente ilimitado, su gran sensibilidad y que, por cada evento de ionización, se obtiene un espectro de masa completo en el orden de los milisegundos. [67]

La energía cinética ( $E_K$ ) que adquiere un ion de masa  $m$  y carga  $q$  ( $q = ez$ ) que atraviesa una diferencia de potencial  $\Delta V$  es:

$$E_K = ez\Delta V = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2.1)$$

Suponiendo que antes de la etapa de aceleración, el ión no tiene una componente de velocidad en la dirección del gradiente del campo, la velocidad final que éste adquiere se obtiene de re ordenar la Ecuación 2.1

$$v = \sqrt{\frac{2ez\Delta V}{m}} \quad (2.2)$$

Entonces, teniendo en cuenta que el tiempo que un ión necesita para recorrer una distancia  $L$ , libre de campos, es  $t = L/v$  y sustituyendo la Ecuación 2.2, encontramos que el tiempo que le requiere a un ión recorrer  $L$ , posterior a una etapa de aceleración con un campo  $\Delta V$ , es proporcional a la raíz cuadrada de la relación  $m/z$  :

$$t = \frac{L}{\sqrt{2ez\Delta V}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad (2.3)$$

De esta forma, la medición del tiempo de arribo de los iones al detector en un dado arreglo experimental ( $L$  y  $\Delta V$ ) es suficiente para la determinación de su relación  $m/z$ .

Para la situación ideal en la que todos los iones son generados en una región infinitesimal del espacio, el esquema experimental de un espectrómetro de masas TOF

consta de dos placas  $p_1$  y  $p_2$  cargadas con una diferencia de potencial  $\Delta V$ , separadas por una distancia  $d$ . De esta forma, el “paquete ideal” de iones es acelerado entre las dos placas y entra a la zona de vuelo libre donde los iones se separan según su  $m/z$ . Esta situación claramente no es realista dado que los iones se obtienen en una región finita del espacio, lo que reviste un problema en relación a la resolución del equipo, debido a que iones de igual  $m/z$  en diferentes regiones de la zona de extracción (es decir, a diferentes distancias de las placas) serán sometidos a campos eléctricos diferentes, y por tanto, tendrán diferentes energías cinéticas entre sí.[70] Para resolver esta limitación Wiley y McLaren introdujeron dos zonas de aceleración [71] (véase Figura 2.1). La primera zona, llamada “zona de extracción”, está formada por dos placas  $p_1$  y  $p_2$  a las cuales se denominan “placa repulsora” y “placa extractora” respectivamente, entre las que se genera una diferencia de potencial de algunos cientos de voltios. La segunda zona, “zona de aceleración”, está formada por la placa  $p_2$  y una placa  $p_3$  que se encuentra conectada a tierra. Entre estas dos placas se produce una caída de potencial de algunos kV. Las modificaciones introducida por Wiley y McLaren permiten, mediante la modificación de las distancias entre las placas y las caídas de potencial en cada zona, compensar las diferencias en el campo eléctrico al que se someten los iones debido a su posición entre las placas, obteniéndose así condiciones de focalización espacial que son independientes de la  $m/z$  de los iones.

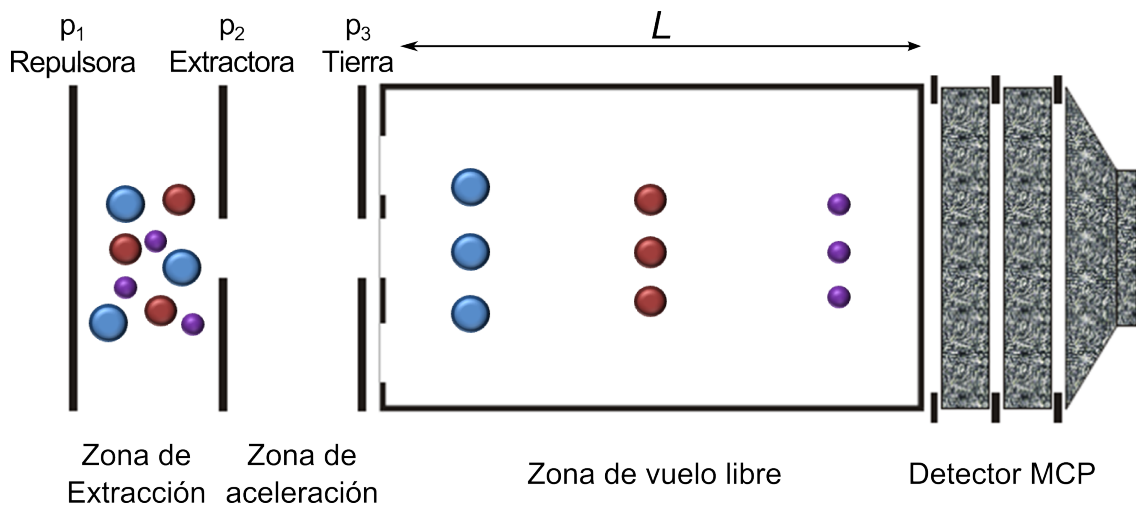


FIGURA 2.1: Gráfico esquemático de la construcción y separación de iones en un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo con dos zonas de aceleración. En la figura se esquematiza, como la incorporación realizada por Wiley y McLaren permite compensar la diferencia de campos eléctricos a los que son sometidos los iones debido a las diferentes distancia a las placas. Consiguiéndose así, condiciones de focalización espacial independientes de la  $m/z$ .

**El detector de iones.** Existen muchas clases de detectores de iones que pueden acoplarse a la espectrometría de masas por TOF. Desde hace algún tiempo la implementación de los MCP (del inglés “*microchannel plate*”) se ha extendido masivamente, por ser sistemas de bajo costo, compactos, de simple implementación en espectrómetros de fabricación casera y principalmente por ser lo suficientemente rápidos para detectar la llegada de los iones de distintos  $m/z$  en pocos ns. Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron detectores MCP para los dos espectrómetros de masas por tiempo de vuelo descritos en el Capítulo 3. A los fines prácticos el funcionamiento de un MCP es similar al de los tradicionales CEM (del inglés “*Channel electron multipliers*”), la diferencia radica en que en vez de tratarse de un único canal multiplicador de electrones, los MCP consisten en un arreglo de millones de canales de unos pocos micrómetros de diámetro en los que cada uno actúa como un electrodo.[67] En la Figura 2.2a se muestra una imagen de barrido electrónico (SEM) donde se observa un arreglo de MCP con canales de  $2\mu\text{m}$  de diámetro. En el esquema experimental, el MCP se encuentra ligeramente inclinado

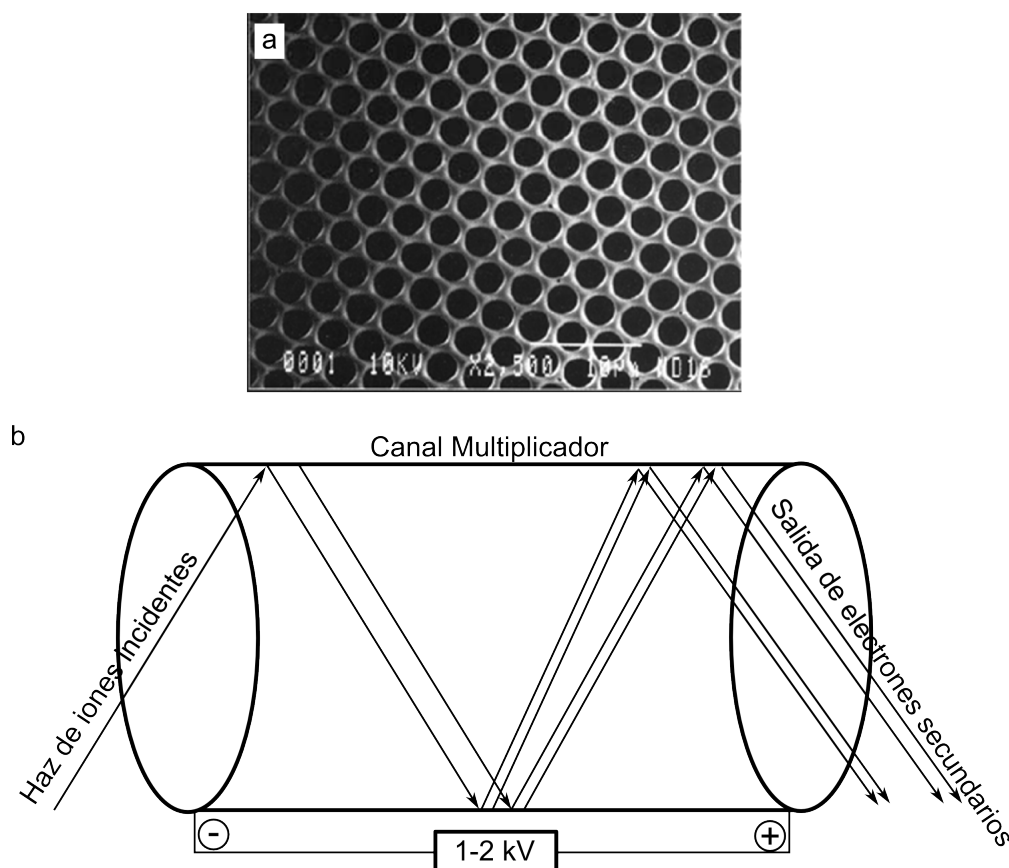


FIGURA 2.2: (a) Microscopía de barrido electrónico (SEM) de un detector MCP donde se observan canales de  $2\mu\text{m}$  de diámetro, imagen tomada de la cita [67]. (b) Gráfico esquemático del proceso de amplificación de la señal en un canal del MCP

respecto a la trayectoria de los iones de forma tal que estos colisionen con las paredes del material, así el impacto de los iones de alta energía cinética produce la emisión de electrones secundarios. Estos últimos son amplificados mediante sucesivos impactos con las paredes interiores de los canales, Figura 2.2b. Para generar la cascada de amplificación se utiliza una caída continua de potencia entre la entrada de los iones y la salida de la corriente de electrones.[72]

### 2.1.2. Multipolos Lineales: Analizadores de Masas, Trampas Iónicas y Celdas de Colisión

Los iones pueden ser almacenados y analizados en arreglos de multipolos lineales. Esta clase de espectrómetro está basado en la aplicación de campos de radiofrecuencias (RF) para la generación de trayectorias controladas dentro del multipolo. Durante el desarrollo de la tesis, en los diversos arreglos experimentales empleados se utilizaron cuadrupolos, hexapolos y octupolos como analizadores de masas, trampas iónicas y celdas de colisión. Por tanto, en la presente sección explicaremos brevemente el principio de funcionamiento de esta clase de espectrómetro utilizando como ejemplo el cuadrupolo lineal. El fundamento de funcionamiento de este tipo de equipamiento es complejo y no es la intención de esta sección realizar una descripción pormenorizada de la misma. En caso de requerir una descripción detallada el lector puede consultar bibliografía especializada citada en [67, 73].

#### 2.1.2.1. Cuadrupolo Lineal

Un cuadrupolo lineal consiste en un arreglo de cuatro electrodos cilíndricos o hiperbólicos dispuestos simétricamente en el plano  $xy$  y que se extienden en el eje  $z$  (Figura 2.3). A cada par de electrodos enfrentados se les aplica el mismo potencial eléctrico compuesto por una fase continua (DC, que llamaremos  $U$ ) y una fase alterna (AC, que llamaremos  $V$ ) de RF con una frecuencia  $\omega$ , de forma tal que el potencial total aplicado ( $\Phi_0$ ) puede escribirse como:

$$\Phi_0 = U + V \cos(\omega t) \quad \text{Donde } t = \text{tiempo} \quad (2.4)$$

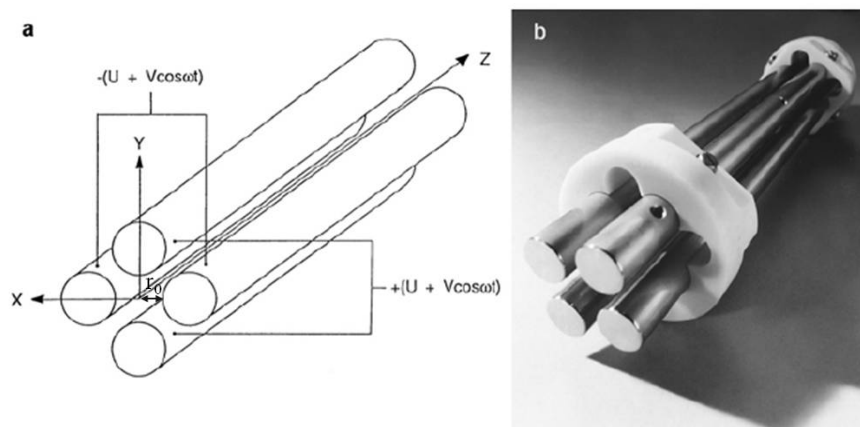


FIGURA 2.3: Imagen tomada de la cita [67]. (a) Gráfico esquemático de los electrodos de un cuadrupolo lineal, en el que se indican los ejes de coordenadas y los pares de electrodos conectados al mismo potencial. (b) Imagen de los electrodos de un espectrómetro comercial.

Cuando un ión entra en el cuadrupolo en la dirección  $z$ , éste experimentará fuerzas en el plano  $xy$ , atractivas hacia el par de electrodos con carga opuesta a la del ión y repulsivas hacia el par de electrodos con igual carga que el ión. Sin embargo, la contribución de la fase alterna del campo eléctrico aplicado hace que la carga en cada par de electrodos varíe periódicamente, por lo que, la dirección de las fuerzas de atracción y repulsión también lo hacen. De esta forma, es posible que un ión atraviese el cuadrupolo sin colisionar con los electrodos suponiendo que durante el trayecto en el eje  $z$  la amplitud de su movimiento en el plano  $xy$  sea menor que  $2r_0$  (donde  $r_0$  representa el radio de la circunferencia interna del multipolo).[67] Se pueden derivar las condiciones para la estabilidad de un dado ión a lo largo de la trayectoria en el eje  $z$  a partir de la solución de las ecuaciones de movimiento obtenidas de Ecuación 2.4 comúnmente denominadas ecuaciones de Mathieu:[67]

Las ecuaciones de movimiento quedan expresadas como:

$$\begin{aligned} \frac{d^2 x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos(2\tau))x &= 0 \\ \frac{d^2 y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos(2\tau))y &= 0 \end{aligned} \quad (2.5)$$

Donde los parámetros  $a$  y  $q$  (parámetros Mathieu) dependen de la relación  $m/z$  del ión, de las condiciones experimentales ( $U, V$  y  $\omega$ ), y se definen de la siguiente manera:

$$a_x = -a_y = \frac{4eU}{mr_0^2\omega^2} \quad q_x = -q_y = \frac{2eV}{mr_0^2\omega^2} \quad \tau = \frac{\omega t}{2} \quad (2.6)$$

Así, para unas dadas condiciones de  $U, V$  y  $\omega$ , la trayectoria de iones con una dada  $m/z$  resultará estable en el plano  $xy$ , atravesará el cuadrupolo y llegará a la zona de detección. Para operar un cuadrupolo como analizador, se varía  $U$  y  $V$  manteniendo la relación  $U/V$  constante (esta relación determina la resolución del espectrómetro). De esta manera, a mayores valores de  $U$  y  $V$ , mayor será la relación  $m/z$  de los iones que atraviesan el cuadrupolo.[67, 70]

El fundamento en el que se basa el funcionamiento del espectrómetro cuadrupolar aquí descrito es directamente extrapolable al funcionamiento de multipolos de mayor orden. Una descripción más detallada acerca del funcionamiento de estos espectrómetros puede encontrarse en la referencia [73].

### 2.1.2.2. Trampas Iónicas y Celdas de Colisión

Cuando en un multipolo se disminuye la intensidad del campo continuo ( $U$ ) en relación al campo alterno ( $V$ ) un intervalo cada vez más amplio de relaciones  $m/z$  tendrán trayectorias estables en el plano  $xy$ . Las trampas iónicas hacen uso de este efecto, por lo que operan en ausencia de campo continuo transformándose en “filtros de banda ancha”. Con el fin de confinar los iones en el eje  $z$ , se agregan electrodos de alta potencia a la entrada y salida del multipolo creando un “pozo” de potencial que atrapa los iones dentro del éste. Los potenciales de entrada y salida de la trampa iónica funcionan de forma pulsada y sincronizada con el resto del experimento, esto permite cargar iones dentro de la trampa, confinarlos por el tiempo deseado y vaciar la trampa en etapas sucesivas según el experimento lo requiera.

Si dentro de las trampas iónicas se agrega una pequeña cantidad de gas no reactivo (generalmente se utilizan gases nobles como He o Ar), éstas pueden operar como celdas de colisión, ya sea para termalizar los iones o para inducir su fragmentación. Una

aplicación particularmente interesante de las celdas de termalización es que pueden utilizarse para “enfriar” los modos internos del ion, si el gas inerte es enfriado mediante la utilización de un criostato. Esta aplicación de las celdas de termalización se convirtió en un hito de la espectroscopía moderna, dado que permite obtener temperaturas vibro-rotacionales de unos pocos K.[74] Por otro lado, para inducir el proceso de fragmentación, además del agregado del gas inerte, se debe ajustar el potencial RF para generar colisiones lo suficientemente energéticas para producir la fragmentación del ión inducida por colisiones (CID, del inglés “*Collision Induced Dissociation*”).

### 2.1.3. Trampa Iónica Cuadrupolar Tridimensional

Las trampas iónicas cuadrupolares tridimensionales o “QIT” (del inglés “*quadrupole ion trap*”) deben su nombre a que la geometría del arreglo de electrodos puede visualizarse como, el sólido de revolución que surge de rotar  $360^\circ$  la sección transversal de un cuadrupolo lineal. Este tipo de trampas tridimensionales están constituidas por un par de electrodos hiperbólicos, que comúnmente se denominan “end caps” o “tapas” de la trampa, y un electrodo en forma de anillo que reemplaza uno de los pares de electrodos del cuadrupolo lineal, en la Figura 2.4a se esquematiza una QIT. Al igual que en el

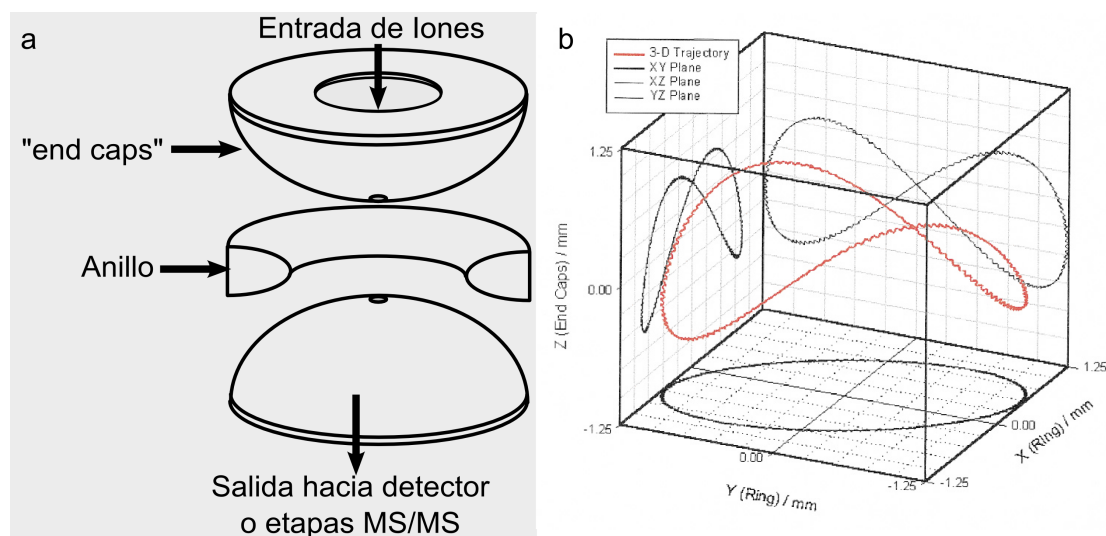


FIGURA 2.4: (a) Gráfico esquemático los electrodos de una QIT. (b) Trayectoria de los iones bajo el campo eléctrico de una QIT, la simulación se extrajo de la referencia [75]

caso de los multipolos lineales, se aplica un potencial eléctrico con una componente DC ( $U$ ) y otra AC ( $V$ ). En este caso, los dos electrodos “end caps” están conectados entre



sí como ocurre con los electrodos enfrentados del cuadrupolo lineal, y el anillo se conecta independientemente. En este tipo de espectrómetro se pueden producir trayectorias estables para iones de una dada relación  $m/z$  (o intervalo de  $m/z$ ) según los parámetros experimentales  $U$ ,  $V$ ,  $\omega$  y  $\Omega$  (donde  $\omega$  y  $\Omega$  corresponden a la frecuencia del campo RF de los electrodos hiperbólicos y del anillo respectivamente). Los iones cuyas trayectorias no sean estables, colisionaran con los electrodos o serán expulsados aleatoriamente de la trampa.[76] En la Figura 2.4b se muestra el resultado de las simulaciones de las trayectorias obtenidas a través de la integración de las ecuaciones de movimiento para iones bajo el campo generado en una QIT,[75] dicha imagen ayuda a la visualización del movimiento de los iones, en ésta puede observarse que el movimiento complejo se puede caracterizar por dos oscilaciones periódicas en el plano del anillo y en el eje  $z$ .

Una vez que los iones están dentro de la QIT, ésta puede utilizarse como un analizador de masas o como una trampa ionica ya sea, para inducir procesos de fragmentación (por colisiones, impacto electrónico o absorción de fotones) o termalización colisional.

Existen diversos modos en los que la QIT puede utilizarse como un analizador de masas, entre los que pueden mencionarse:

- *Modo de selectividad de iones por estabilidad.* En este modo de operación se seleccionan parámetros experimentales ( $U$ ,  $V$ ,  $\omega$  y  $\Omega$ ) para aislar una única  $m/z$ , luego dichos iones se eyectan de la trampa por la aplicación de un campo pulsado en una de las “end caps” de forma tal que impacten en el detector situado a la salida de la trampa. Este modo de operación es muy lento debido a que para obtener el espectro de masas completo, se debe repetir la operación para cada  $m/z$ .
- *Modo de selectividad de iones por inestabilidad.* En este caso, todo el intervalo de  $m/z$  de interés es almacenado en la QIT, luego se anula el potencial de los “end caps” y se barre el potencial de radiofrecuencias ( $V$ ) aplicado al anillo, esto produce la eyección secuencial de iones según su relación  $m/z$ . Luego, puede relacionarse el valor del potencial  $V$  al cual un ión es eyectado con su  $m/z$  a partir de los parámetros de Mathieu para la trampa.[67]
- *Eyección resonante.* En una trampa ideal, el movimiento de los iones en el plano radial (plano del anillo) y el plano axial (plano que contiene a ambos electrodos hiperbólicos) pueden considerarse mutuamente independientes, cada uno con una frecuencia característica asociada a la relación  $m/z$  del ión. La aplicación de un

campo RF con una frecuencia resonante a la del movimiento axial de los iones produce la eyección de éstos. En este modo de operación, al igual que en el anterior, todo el intervalo de  $m/z$  de interés se confina en la trampa y luego se obtiene el espectro de masas mediante el barrido de la frecuencia del campo (V) aplicado a los electrodos hiperbólicos.

En el caso de que la QIT se emplee como una trampa de iones, se pueden almacenar dentro de ésta un ión con una dada  $m/z$  o un intervalo de  $m/z$ . Luego del tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de interés (por ejemplo fragmentación con un láser UV, o termalización colisional) los iones contenidos pueden ser analizados en la misma trampa, o pueden ser eyectados mediante la aplicación de un campo (U) en una de las “endcaps” y posteriormente analizados en un segundo espectrómetro de masas.

#### 2.1.4. Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (FTICR)

El desarrollo de la resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier FTICR (del inglés “*Fourier transform ion cyclotron resonance*”) constituye uno de los hitos en cuanto al estado del arte de la espectrometría de masas, en lo que respecta a resolución espectral,[77] capacidades analíticas[66] y potencialidad para realizar sucesivos eventos de MS/MS.[70]

El principio del funcionamiento este tipo de espectrometría se puede resumir como sigue. Un ion con velocidad  $v$ , que entra en un campo magnético homogéneo  $B$  perpendicular al desplazamiento original del ión, describirá una trayectoria circular de radio  $r_m$  debido a las fuerzas de Lorentz tal que:

$$r_m = \frac{mv}{qB} \quad \text{siendo } q = ze \quad (2.7)$$

Sustituyendo  $v = r_m\omega$ , se puede obtener la velocidad angular del ión

$$\omega = \frac{qB}{m} \quad (2.8)$$

De donde se observa que la velocidad angular del ión es función de su relación  $m/z$  y

del campo magnético aplicado, e independiente de la velocidad tangencial  $v$  original. La aplicación de un campo eléctrico AC transversal al movimiento de ión con una frecuencia resonante con la frecuencia ciclotrónica del ión ( $f = \frac{\omega}{2\pi}$ ), produce una gran aceleración de éste y por tanto un aumento del radio de giro, dando como resultado un movimiento en forma de espiral, tal como se observa en la Figura 2.5.[78] Para iones más livianos la espiral alcanza el mismo radio en menos ciclos que para los iones más pesados, debido a que necesitan menos energía para incrementar su velocidad.

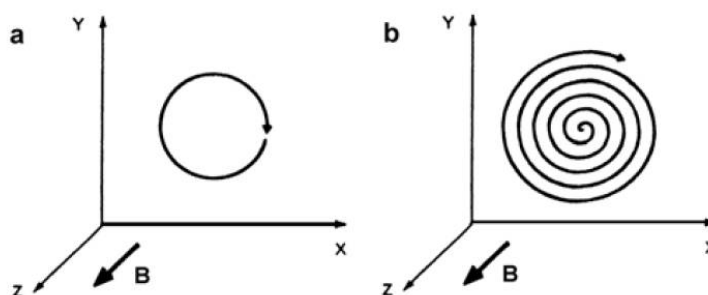


FIGURA 2.5: Imagen tomada de la cita [67]. Movimiento de iones (a) en un campo magnético homogéneo, el radio de la circunferencia es función de la velocidad, pero no la frecuencia (b) en un campo magnético homogéneo y la aplicación de una excitación con un campo eléctrico alterno en resonancia con la frecuencia ciclotrónica de los iones, bajo estas circunstancias los iones describen un movimiento en forma de espiral.

En los espectrómetros FTICR modernos, el proceso de detección es un evento no destructivo y se basa en la medición de la carga imagen que generan los iones al moverse cerca de un electrodo. Los paquetes de iones, separados según su relación  $m/z$  por la excitación producida por el campo alterno, al “girar” en las proximidades de un par de electrodos detectores a su frecuencia ciclotrónica característica, producen una respuesta de corriente en el tiempo (FID del inglés “*free induction decay*”) que puede convertirse al dominio de las frecuencias mediante una transformada de Fourier. Finalmente las frecuencias obtenidas están relacionadas con la velocidad angular de los iones y ésta con su  $m/z$  según la Ecuación 2.8.[78] En la Figura 2.6 se esquematiza la composición y el funcionamiento de una celda de espectrometría FTICR, la que está constituida por cuatro “paredes” que sirven de electrodos, dos de ellos son responsables de la excitación mediante el campo alterno y el otro par es responsable de la detección. En una primera instancia todos los iones aislados en la celda son excitados mediante un campo RF, éste se conoce como “chirp” y consiste en un “paquete” de frecuencias que excita a todos los iones en el intervalo de  $m/z$  de interés.[79] Luego de producirse la excitación se registra el decaimiento de corriente producido en el par de electrodos detectores durante un

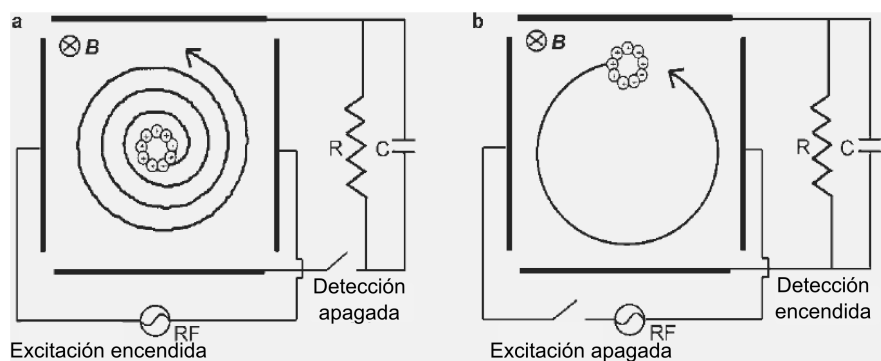


FIGURA 2.6: Imagen tomada de la cita [67]. Esquema de la sección transversal de una celda de ICR donde se observan los electrodos de excitación y detección. Secuencia de (a) excitación y (b) detección en un espectrómetro FTICR

periodo de tiempo que puede variar entre 0,5 y 30 segundos. Finalmente se obtiene el espectro de masas a partir de la transformada de Fourier de la señal y la aplicación de la Ecuación 2.8.[80]

## 2.2. Vaporización de muestras

Como se mencionó al comienzo de la Sección 2.1, el primer paso a cumplirse dentro del esquema experimental de un espectrómetro de masa es la vaporización e introducción de la muestra. En esta sección describiremos los fundamentos del funcionamiento de los diversos métodos de vaporización utilizados durante el desarrollo de la tesis.

### 2.2.1. Electrospray

La ionización por electrospray (ESI, del inglés “*electrospray ionization*”) es una técnica de vaporización e ionización suave, que opera a presión ambiente y que se utiliza para transferir analitos de interés desde la fase líquida a la fase gaseosa. La fuente ESI debe su gran éxito en diversas aplicaciones de espectrometría de masas a que, es una de las pocas fuentes de vaporización lo suficientemente flexible como para ser utilizada para vaporizar desde analitos orgánicos e inorgánicos comunes, hasta complejos metálicos y moléculas grandes (biomoléculas) poco volátiles y térmicamente lábiles.[81, 82] En el desarrollo de esta tesis, se utilizaron las fuente ESI para vaporizar muestras líquidas de bases de ADN y mezclas de dichas bases con sales de  $\text{Ag}^+$ .

En ESI una solución electrolítica del analito de interés, en concentraciones que pueden ir desde los micro a los mili molar es pulverizada desde un capilar por la acción de un campo eléctrico. De esta forma se produce un rocío formado por gotas micrométricas cargadas eléctricamente, estas gotas reducen su volumen debido a la evaporación de solvente. Como esta fuente no opera en vacío, las colisiones con el gas circundante proveen la energía necesaria para iniciar el proceso de desolvatación, lo que produce un aumento de la densidad de carga superficial que eventualmente lleva a la destrucción de las gotas. La repetición de este proceso de desolvatación y fragmentación de las gotas da como resultado iones aislados en fase gaseosa.[67]

#### **2.2.1.1. Diseño Básico**

En la Figura 2.7 se esquematiza el diseño básico de una fuente ESI y su modo de operación puede describirse brevemente como sigue.[82] La disolución del analito de interés es introducida a través de una jeringa con una aguja hipodérmica a una velocidad de algunos microlitros por minutos. La aguja se mantiene a un potencial de entre 3 y 4 kV con respecto a un electrodo cilíndrico que la rodea. El aerosol generado, se expande contra una corriente de nitrógeno seco que sirve para iniciar el proceso de evaporación de solvente en las gotas. Una porción del rocío entra por un pequeño capilar (aproximadamente 0,2 mm de diámetro interno y 60 mm de largo) que sirve de interfase hacia la primera etapa de vacío donde ocurre el proceso de evaporación del solvente. Luego, un colimador tronco cónico sirve como segunda interfase a la región de alto vacío, las especies iónicas son introducidas mediante lentes electroestáticas en una primer etapa de análisis de masas, que suele consistir en un multipolo lineal dado que permite operar a presiones moderadas y generar paquetes de iones (Sección 2.1.2) para posteriores análisis MS/MS. Para maximizar la eficiencia de la transferencia de los iones se pueden ajustar los potenciales aplicados al capilar, el colimador y las lentes electroestáticas. Comúnmente en las aplicaciones comerciales de ESI el módulo que contiene el capilar pueda termalizarse entre 300 y 400 K para mejora el proceso de evaporación del solvente.[67]

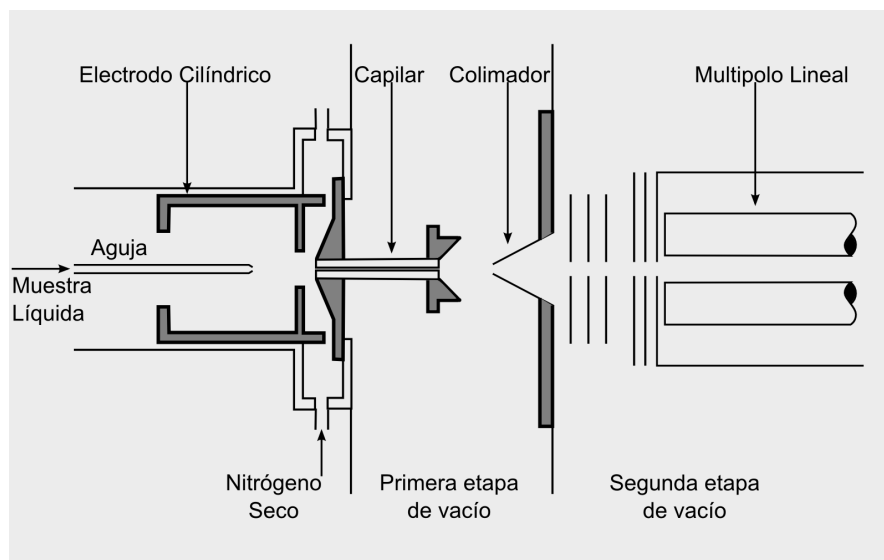


FIGURA 2.7: Diseño Básico de un ESI

### 2.2.1.2. Generación de Iones Aislados en Fase Gaseosa

El mecanismo de la generación de iones aislados en fase gaseosa mediante una fuente ESI puede dividirse a grandes rasgos en tres etapas, primero la formación de un rocío, luego la reducción del tamaño de estas gotas y por último la “liberación” de los iones a partir de las gotas. La Figura 2.8a pretende esquematizar los procesos que tienen lugar a lo largo de este mecanismo.[67] El capilar se mantiene a unos 3-4 kV respecto a un segundo electrodo situado a unos pocos centímetros, por lo que cuando el electrolito llega al extremo del capilar éste se expone a un campo eléctrico de alrededor de  $10^6 \text{ Vm}^{-1}$ , que produce la separación de cargas en el electrolito y una deformación del menisco en forma de cono, denominado cono de Taylor.[83] El campo eléctrico produce deformaciones en el extremo del cono de Taylor en forma de óvalos, cuando la repulsión entre cargas contrarresta la tensión superficial, éste comienza a eyectar un “jet” de líquido en forma de vórtice, que se expande en dirección al electrodo de carga opuesta.[84] Este “jet” posee una gran cantidad de iones de igual carga (su signo depende del modo de operación del ESI) por lo que se fragmenta en finas gotas que a la vez se repelen entre sí por interacciones coulombicas. Este proceso da como resultado un rocío de gotas cargadas eléctricamente. En la Figura 2.8b se muestra una fotografía de un ESI en funcionamiento donde se puede distinguir claramente la formación del cono de Taylor, el “jet” y el rocío formado.

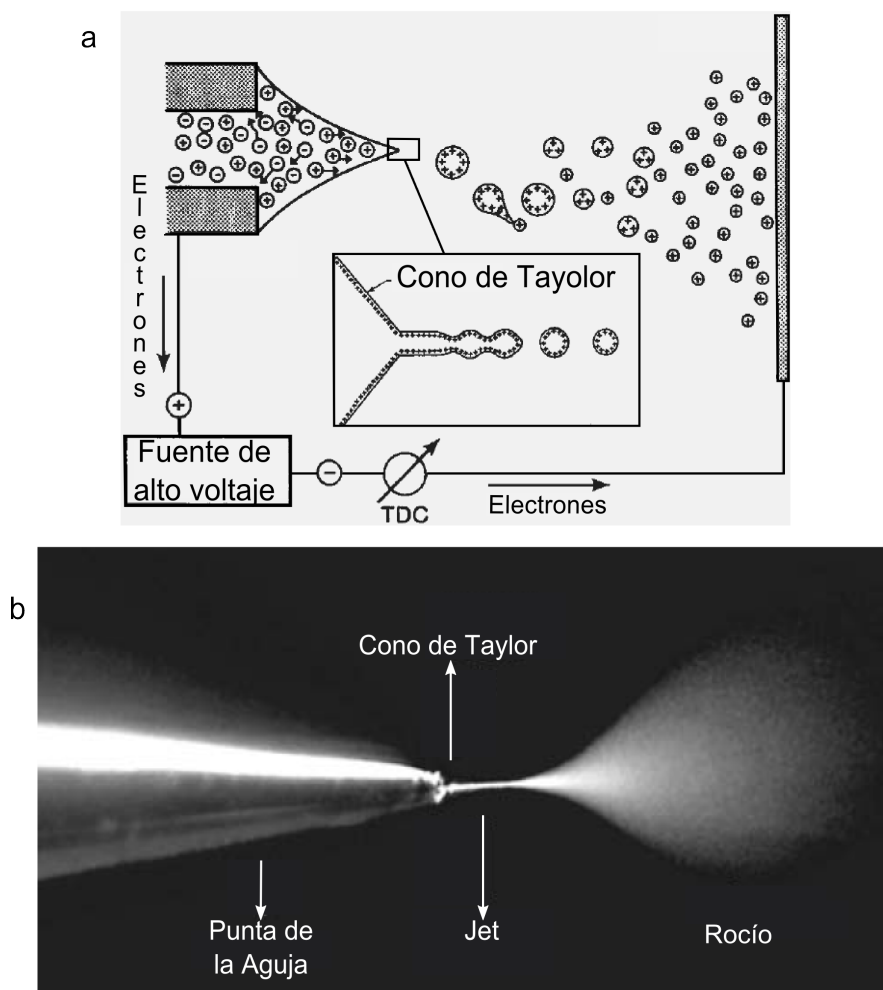


FIGURA 2.8: Imagen tomada de la cita [67]. (a) Diagrama esquemático del proceso de formación de iones en fase gaseosa mediante un ESI donde se distingue la formación del cono de Taylor entre dos electrodos, la posterior eyección de gotas debido a la intensidad del campo eléctrico y finalmente la evaporación del solvente para dar como producto iones aislados. (b) Fotografía de un ESI en funcionamiento.

Luego las gotas formadas por el mecanismo anteriormente descrito, son susceptibles a evaporar solvente ya sea por efecto de calentamiento en el módulo que contiene el capilar, o por colisiones con el nitrógeno seco. Sea cual fuese la causa, la evaporación de solvente aumenta la densidad de carga que contiene dicha gota. El proceso final de liberación de los iones aún se encuentra en discusión. Uno de los modelos más aceptados propone que las gotas sufren sucesivos procesos de explosiones Coulombicas, que dan como resultado la desolvatación total de los iones.[67] Sin embargo, más recientemente se ha propuesto que el mecanismo de liberación de los iones consiste en una eyección continua de material desde la gota altamente cargada, (de forma análoga al proceso inicial que ocurre en el cono de Taylor) debido a la forma irregular que el campo eléctrico

produce en las gotas, esta hipótesis se encuentra en la literatura bajo el nombre de “*droplet jet fission*”. [85]

### 2.2.2. Vaporización Láser

Durante el desarrollo de la tesis, se emplearon las fuentes de radiación láser para producir la vaporización de muestras sólidas, de altos puntos de fusión y labilidad térmica. En esta sección se describen brevemente los fundamentos que subyacen a éste método.

Sin lugar a duda la aparición del primer láser en 1960 [86] constituye un hito histórico que revolucionó diversas áreas de la ciencia y la tecnología. Entre los primeros experimentos que se realizaron utilizando este tipo de fuentes de radiación electromagnética se encuentra el estudio de la interacción del láser con superficies sólidas, que conduce a la eyección de partículas y fotones. [87] Los mecanismos por los cuales ocurren los fenómenos conocidos genéricamente como *desorción y ablación láser* son extremadamente complejos y aún hoy se encuentran en discusión. En líneas generales, la energía electromagnética del haz láser incidente sobre el sólido se transforma en energía electrónica, térmica, química y mecánica, dando lugar a la emisión de partículas desde la fase sólida a la gaseosa.

El término *desorción láser* se utiliza cuando la emisión de partículas tiene lugar sin una alteración macroscópica en la composición o estructura de la superficie sólida, además las partículas eyectadas a la fase gaseosa reproduce en buena medida la composición del sólido, permitiendo la vaporización de moléculas intactas. En cambio la *ablación láser* es un proceso mucho más energético, acompañado por el desarrollo de altas temperaturas y la formación de cráteres en la superficie, además se caracteriza por la generación de un plasma compuesto por átomos, iones, partículas, fotones y electrones, llamado comúnmente pluma de ablación. [69]

#### 2.2.2.1. Generalidades del Mecanismo

La descripción detallada de los procesos involucrados en la dinámica de la ablación y desorción láser ha sido objetivo de numerosas investigaciones, pero su gran complejidad y variabilidad con las condiciones en que se estudia, han conducido a diferencias no poco sutiles en su tratamiento según el autor que se consulte. La complejidad de la naturaleza



de la pluma de ablación está determinada principalmente por aspectos dinámicos relacionados con la evolución temporal del material componente del plasma, la composición y distribución angular de las especies presentes y la posibilidad de agregación, disociación, emisión o absorción de radiación, o incluso la reactividad entre especies eyectadas.[88]

Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados destacan la influencia de dos aspectos fundamentales, las características de la radiación incidente (longitud de onda, densidad de potencia y duración del pulso) y la conductividad térmica del material.

De modo general el proceso de vaporización láser se puede describir a través de dos mecanismos llamados *térmico* y *fotoquímico*. Debe recalarse que la descripción de estos mecanismos corresponde a situaciones extremas ideales. En condiciones normales generalmente ambos mecanismos ocurren simultáneamente siendo posible que uno prime frente al otro según las condiciones experimentales de trabajo.

- *Mecanismo térmico*. Este comportamiento se caracteriza por el hecho de que la energía electromagnética del haz incidente produce la excitación electrónica de los átomos o moléculas que constituyen la muestra sólida. Esta energía inicialmente depositada en forma de excitación electrónica posteriormente es transferida a los estados vibracionales de la red, generando un aumento local de la temperatura, que conduce a la vaporización del material y a la emisión térmica de partículas desde la superficie. En este caso, la temperatura máxima alcanzada localmente es proporcional a la potencia absorbida por unidad de área.[89] En este proceso, la presión de vapor de la zona irradiada es suficiente para que ocurra la vaporización de la muestra, por lo que las partículas son emitidas desde la superficie con energías cinéticas determinadas por la distribución estadística de Maxwell-Boltzmann.
- *Mecanismo fotoquímico*. En este caso, la emisión de átomos o moléculas desde la superficie se debe a la ruptura fotoquímica de enlace. Esto ocurre cuando la energía incidente provista por el haz láser se acumula en estados antienlazantes de la muestra. El exceso de energía, respecto a la necesaria para producir la ruptura fotoquímica, se disipa en forma de energía cinética y energía interna de las partículas emitidas.

## 2.3. Expansiones Supersónicas

Las expansiones supersónicas son una técnica de enfriamiento de los modos internos de una molécula que se utiliza con fines espectroscópicos. Durante el desarrollo de esta tesis las expansiones supersónicas se emplearon para producir el enfriamiento de los productos de la vaporización láser, e introducir dichos productos en un espectrómetro de masas. Además se emplearon para co-expandir moléculas orgánicas de baja presión de vapor junto con la vaporización láser. Es por esto que en esta sección incluimos una breve descripción de los fundamentos fisicoquímicos del funcionamiento de esta técnica. Es importante remarcar que no es la finalidad de esta sección llevar a cabo una descripción pormenorizada de la termodinámica de las expansiones supersónicas, de ser necesario el lector puede referirse a bibliografía especializada citada en [90].

Un “jet” libre se produce mediante la expansión de un gas a presión moderadamente alta (entre 0,5 y 100 atm) a través de un pequeño orificio o tobera (“*nozzle*”) en una región de alto vacío. Comúnmente se define dicho “jet” como expansión supersónica debido a que la velocidad de éste es característicamente superior a la velocidad del sonido.[69] Desde el punto de vista molecular, se considera que la expansión supersónica es un evento que *monocromatiza* la velocidad del gas, convirtiendo el movimiento térmico al azar presente en el reservorio, en un movimiento unidireccional en frente a la tobera (Figura 2.9a).[91]

Las expansiones supersónicas comenzaron a utilizarse en el campo de la espectroscopía debido a que permiten subsanar tres dificultades esenciales que aparecen a la hora de realizar estudios espectroscópicos de alta resolución. La primera consiste en obtener el sistema de interés en un único estado cuántico, la segunda, minimizar el efecto Doppler y por último, mantener la densidad del sistema lo suficientemente baja como para poder despreciar el efecto de las interacciones intermoleculares con el entorno.[90]

### 2.3.1. Breve Descripción del Proceso

Como se mencionó al principio de la sección, una expansión supersónica se obtiene expandiendo un gas almacenado en una cámara sometido a condiciones de presión  $p_0$  y temperatura  $T_0$ , a través de una tobera de diámetro  $D$ , hacia una cámara de vacío que se encuentra a una presión  $p$  muy inferior a  $p_0$ . Cuando el régimen de flujo adquirido por

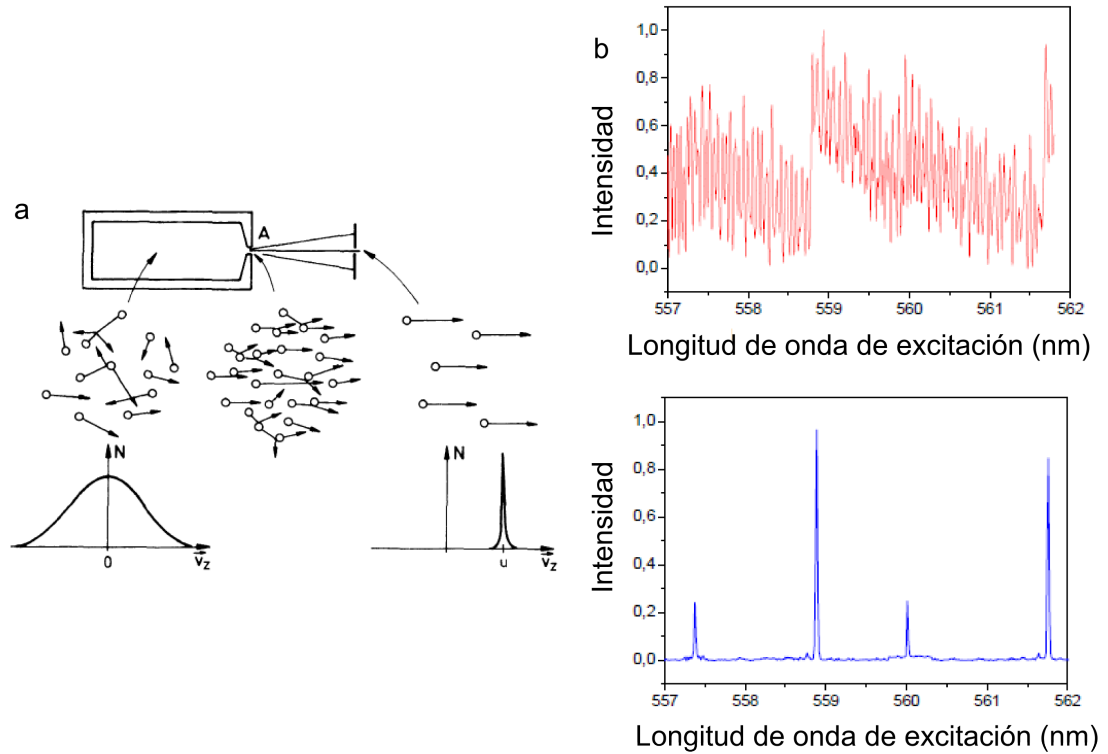


FIGURA 2.9: (a) Imagen tomada de la cita [90]. Diagrama cualitativo donde se muestra que el proceso de la expansión supersónica convierte el movimiento térmico al azar presente en el reservorio, en un movimiento unidireccional en frente a la tobera. Aumentando la velocidad de flujo total, pero disminuyendo la distribución de velocidades presentes en el gas. (b) Imagen tomada de la cita [69]. Espectros de fluorescencia del  $I_2$  ( $B \leftarrow X$ ), en el panel superior se muestra el espectro a temperatura ambiente, mientras que en el panel inferior el obtenido a partir de un expansión supersónica de una mezcla He- $I_2$ . Puede verse claramente la simplificación del espectro obtenido debido al enfriamiento logrado por la implementación de la expansión supersónica.

el gas es hidrodinámico [69] (caracterizado por un numero de Kudsén  $Kn_0 = \frac{\lambda}{D} \ll 1$  donde  $\lambda$  corresponde al recorrido libre medio del gas) la expansión tiene lugar de forma tan rápida que puede considerarse que ocurre sin intercambio de energía entre las moléculas del gas y las paredes de la tobera, así la expansión obtenida es adiabática.[92] Bajo estas condiciones, en el transcurso de una expansión supersónica ocurren una gran cantidad de colisiones dentro de la tobera y en la región subyacente a ésta, que produce una gran disminución de la temperatura translacional del gas portador, generalmente un gas noble, a valores que rondan las décimas de grados Kelvin. El agregado de un analito de interés al “baño frío” que provee el gas portador, produce un gran enfriamiento de todos los grados de libertad de dicha molécula mediada por colisiones entre dos y tres cuerpos. A modo de ejemplo en la Figura 2.9b se muestran el espectros de fluorescencia del  $I_2$  ( $B \leftarrow X$ ), en el panel superior el espectro a temperatura ambiente,

mientras que en el panel inferior el obtenido a partir de una expansión supersónica de una mezcla He-I<sub>2</sub>. Puede verse claramente la simplificación del espectro obtenido debido al enfriamiento logrado por la implementación de la expansión supersónica. Por otro lado la rápida disminución de la densidad a lo largo del eje de expansión lleva al sistema de interés a un régimen libre de colisiones, permitiendo minimizar los efectos de las interacciones intermoleculares que enmascaran la estructura fina en estudios espectroscópicos en fase condensada e incluso en fase gaseosa convencional. Además posibilita el estudio de sistemas inestables, tales como agregados moleculares que se mantienen unidos por interacciones no covalentes débiles, que prevalecen debido a la ausencia de colisiones y a la baja temperatura.[92]

## 2.4. Espectroscopía

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se estudiaron tanto sistemas neutros como iónicos, lo que implicó la utilización de diversas técnicas espectroscópicas. Para el estudio de sistemas neutros se utilizó la espectroscopía de ionización multifotónica resonante, mientras que para el estudio de sistemas iónicos, se emplearon tanto la espectroscopía de disociación multifotónica IR, como la espectroscopía de fragmentación UV. En la presente sección se describen los fundamentos fisicoquímicos que involucra cada una de ellas.

### 2.4.1. Espectroscopía de ionización multifotónica resonante

Durante el desarrollo de esta tesis, se utilizó la espectroscopía de ionización multifotónica resonante (REMPI, del inglés “*Resonant enhanced multiphoton ionization*”) para el estudio de sistemas neutros generados por vaporización láser acoplada a expansiones supersónicas. Esta técnica permite obtener información experimental acerca de los estados roto-vibracionales de un estado electrónico excitado y también brinda información de la dinámica del mismo. El fundamento de esta técnica puede explicarse brevemente como sigue:

Una molécula o átomo que se encuentra en el estado fundamental ( $S_0$ ) e interacciona con un campo electromagnético, puede ser ionizada si la energía de los fotones es igual o mayor que el potencial de ionización (PI) de dicha molécula o átomo. La probabilidad

asociada con el proceso de ionización  $P_i$  es proporcional al momento de transición entre los estados involucrados:[93]

$$P_i = \sigma\phi \quad (2.9)$$

Donde  $\phi$  es la fluencia de fotones y  $\sigma$  es la sección eficaz de absorción. En el caso de que la energía de los fotones involucrados sea menor al PI la ionización puede completarse mediante la absorción simultánea de dos o más fotones, proceso conocido como ionización multifotónica (MPI, del inglés “*multi photon ionization*”),[94] la cual sólo puede tener lugar mediante la utilización de fuentes de radiación electromagnéticas de alta potencia, como es el caso de los láseres pulsados. Sin embargo, la ionización a través de un mecanismo MPI es muy poco probable, debido a que la sección eficaz de absorción multifotónica no resonante disminuye enormemente a medida que aumenta el número de fotones involucrados,[95] así la sección eficaz de absorción monofotónica es de alrededor de  $10^{-18} \text{cm}^2$  y la correspondiente a una transición bifotónica es  $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$ . [96] Si en cambio el proceso de absorción multifotónica es resonante, es decir, la ionización se alcanza luego de poblar un estado electrónico intermedio el cual funciona como puerta para la absorción del segundo fotón, la probabilidad de ionización se amplifica varios órdenes de magnitud respecto a la ionización MPI. Así, la metodología basada en dicho incremento de la probabilidad de ionización se denomina “ionización multifotónica resonante” (REMPI). En la Figura 2.10a se esquematiza la diferencia entre los mecanismos de ionización MPI y REMPI.

El proceso REMPI procede a través de un mecanismo de dos etapas. En la primera se produce la absorción de un fotón cuya energía es  $h\nu_1$  es resonante con un estado roto-vibracional de un estado electrónico excitado del átomo o molécula. En una segunda etapa se absorbe un segundo fotón ( $h\nu_2$ ) desde el estado excitado poblado en la primera etapa, proceso que conduce a la ionización del sistema (Véase Figura 2.10a). Los fotones involucrados en la primera y la segunda etapa pueden o no ser de la misma energía.

En el panel b de la Figura 2.10 se esquematiza la forma en que el principio de absorción multifotónica resonante se aplica para la obtención de un espectro REMPI. Con una fuente láser sintonizable se varía la longitud de onda de excitación, cuando ésta es resonante con la transición a un estado roto-vibracional del estado electrónico

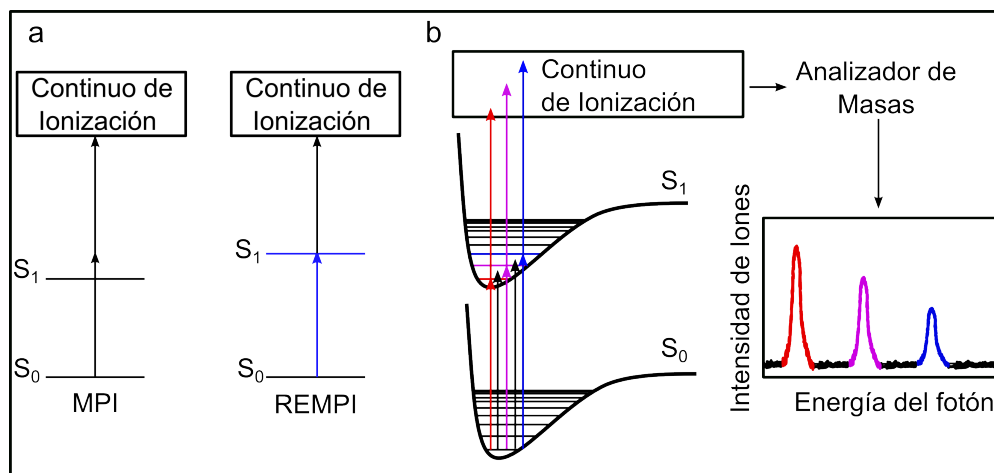


FIGURA 2.10: (a) Esquema de la diferencia entre el proceso de ionización multifotónica (MPI) e ionización multifotónica resonante (REMPI). En MPI la absorción simultánea de dos (o más) fotones produce la ionización, este proceso es menos probable que la ionización REMPI, pues en este último la absorción en etapas se ve favorecida por la población “efectiva” de un estado electrónico excitado. (b) Esquema de la obtención de un espectro REMPI a partir del acoplamiento de una fuente láser sintonizable y un espectrómetro de masas.

excitado éste se puebla efectivamente, aumentando la probabilidad de absorción de un segundo fotón, por tanto la cantidad de iones formados y la intensidad de la señal producida por los mismos. Puede verse entonces, que en esta técnica espectroscópica no se registra directamente la absorción del sistema de interés, sino que dicha absorción se manifiesta como un incremento en la señal de iones de una dada especie, detectada mediante espectrometría de masas. Está característica es de gran importancia porque hace a la técnica REMPI “selectiva en masas”. [95]

### 2.4.2. Espectroscopía de disociación multifotónica infrarroja

Antes de explicar los fundamentos fisicoquímicos de la espectroscopía de disociación multifotónica IR (DMIR), cabe recordar, como se mencionó al comienzo de la presente sección, que durante el desarrollo de esta tesis dicha técnica se utilizó para el estudio de sistemas iónicos, más específicamente, iones aislados mediante espectrometría de masas. Por lo que en la presente explicación nos referimos a especies iónicas, sin embargo esto no excluye la utilización de la espectroscopía de DMIR a sistemas neutros.

En la espectroscopía de disociación multifotónica infrarroja (DMIR), la absorción de múltiples fotones en el rango IR incrementa la energía almacenada en los modos

vibacionales de una especie hasta alcanzar el límite de disociación de ésta. La fragmentación observada generalmente no es “estado-específica”, es decir, independientemente del modo vibracional excitado, la redistribución intramolecular de energía vibracional (IVR, por sus siglas en inglés “*Intramolecular vibrational energy redistribution*”) hace que la fragmentación del ión siempre ocurra en el canal reactivo de menor energía de activación.[70]

Originalmente los primeros experimentos de DMIR se realizaban con láseres de CO<sub>2</sub>,[97] lo que restringía el intervalo del espectro IR a estudiar y por tanto, las especies susceptibles a ser estudiadas por esta técnica. El advenimiento de fuentes láser sintonizables en intervalos extendidos del espectro IR, como los láseres de electrones libres [98] y los osciladores paramétricos ópticos (OPO),[99] combinados con espectrómetros de masas de alta resolución acoplados a trampas iónicas, ha posicionado a la DMIR a la vanguardia de la determinación estructural de especies complejas en fase gaseosa. [70, 100]

En la década de los 80 se desarrolló un modelo de los eventos que tienen lugar durante la excitación multifotónica IR,[101] que eventualmente conduce a la disociación del ión (o molécula). Este modelo se encuentra esquematizado en la Figura 2.11 y en la presente sección se describe brevemente el fundamento de la DMIR a partir de éste. De acuerdo con dicho modelo, el ión, en el transcurso de la excitación vibracional, pasa a través de tres regiones diferentes definidas según la densidad de estados vibracionales. En la primera zona (I), de baja energía vibracional, los niveles son discretos. En esta zona, la absorción de más de un fotón se ve dificultada debido a que la anarmonicidad entre niveles vibracionales imposibilita que luego de la primera absorción se mantenga la resonancia entre, la energía de los fotones del láser y la diferencia de energía entre niveles vibracionales. La segunda zona (II), se denomina región del cuasicontinuo, ésta se caracteriza por una alta densidad de estados vibracionales tal que el ancho de banda del láser  $\Delta\omega$  sea mayor que  $\frac{1}{\rho(E)}$ , donde  $\rho(E)$  es la densidad de estados vibracionales a la energía  $E$ . Al cumplirse esta condición, y si la potencia del láser es lo suficientemente alta, una gran cantidad de fotones pueden ser absorbidos debido a que siempre se cumple la condición de resonancia entre la energía del fotón y la diferencia de energía entre dos niveles vibracionales. La tercera zona (III) es la del continuo real, y se encuentra por encima de la energía mínima de disociación a partir de la cual es posible la descomposición unimolecular de un ion excitada vibracionalmente.[101]

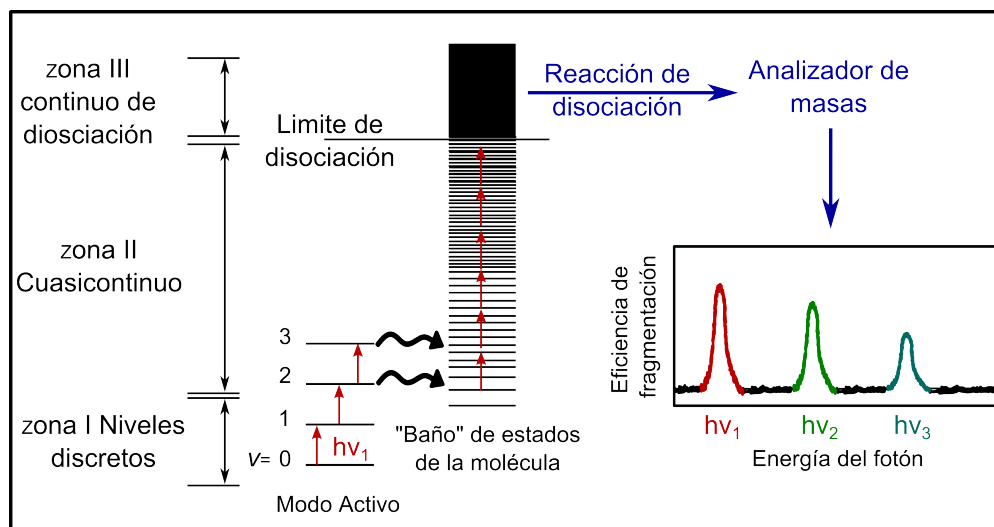


FIGURA 2.11: Se presenta un diagrama esquemático del modelo de absorción multifotónica que desencadena la fragmentación de un ión, y la obtención de un espectro de DMIR acoplando un láser IR sintonizable y un sistema de espectrometría de masas. Brevemente, sólo si la energía del fotón incidente es resonante con la energía de un modo normal de vibración (modo activo) ocurrirá la absorción del primer fotón, y se desencadenará el proceso de absorción multifotónico mediante los mecanismos descritos en la presente sección. De esta forma, la absorción de fotones de energía  $h\nu_1$  producirán la fragmentación del ión, dicho proceso es detectado mediante espectrometría de masas, por el aumento de la intensidad de los iones hijos producidos y la depleción del ión padre. Para la obtención de un espectro, se varía la energía del fotón incidente y se registra la intensidad del ión padre y los iones hijos como función de  $h\nu$ . Así, el espectro de DMIR se obtiene de graficar la eficiencia de fragmentación *vs.*  $h\nu$ .

En la zona (I) debido al efecto de la anarmonicidad, sólo la absorción del primer fotón es resonante con la diferencia de energía entre niveles vibracionales, por lo que para “*ascender en la escalera de energía vibracional*” otros mecanismos deben operar para promover la absorción de más de un fotón. Algunos de los mecanismos responsables de la compensación de la anarmonicidad son, (1) el ensanchamiento por potencia, (2) absorción multifotónica concertada y (3) la compensación rotacional. [102] Los dos primeros son importantes sólo cuando la potencia de la fuente láser es alta. El tercer mecanismo es fuertemente dependiente de la presión a la cual ocurre el experimento, es decir, el corrimiento de la resonancia debido a la anarmonicidad puede compensarse por la distribución de estados rotacionales poblados. Sin embargo la transición roto-vibracional lleva a despoblar los estados rotacionales responsables de la compensación de la anarmonicidad, esto conduce a la generación del conocido “*hueco rotacional*” en la distribución de Boltzman. Para que el proceso de compensación rotacional ocurra eficientemente el experimento debe realizarse a presiones suficientemente altas, para que la distribución poblacional se re establezca por medio de transferencia de energía colisional,



proceso conocido como “llenado del hueco rotacional”. En los experimentos realizados durante la tesis, y como se muestra en el Capítulo 3, la presión en el espectrómetro de masas donde se produce la DMIR es del orden de  $10^{-9}$  Torr, por lo que la contribución del mecanismo de compensación rotacional puede descartarse.

Los mecanismos de compensación de la anarmonicidad en la zona (I) son de fundamental importancia para que el proceso de disociación multifotónica tenga lugar, especialmente en sistemas pequeños y rígidos. Éstos, se caracterizan por poseer un bajo número de grados de libertad vibracionales con constantes de fuerza grandes asociadas a dichos modos, lo que conlleva a un “crecimiento lento” de la densidad de estados vibracionales como función de la energía. Por tanto se requiere de la absorción de múltiples fotones para llevar a estos sistemas a la zona II. Sin embargo, la importancia de los mecanismos de compensación de la anarmonicidad es mucho menor al aumentar los grados de libertad del sistema a estudiar, debido a que su densidad de estados será grande a bajas energías. Por ejemplo, uno de los sistemas más pequeños estudiados por DMIR en esta tesis fue el cluster  $[\text{CAg}]^+$ , para el cual, la densidad de estados  $\rho(E)$  calculada a la energía de absorción del primer fotón en la región del estiramiento C=O (aproximadamente  $1800\text{ cm}^{-1}$ ) es del orden de  $10^5$  estados/ $\text{cm}^{-1}$ ,  $(\frac{1}{\rho(1800\text{cm}^{-1})} = 10^{-5}\text{cm}^{-1}/\text{estados})$  y el ancho de banda del láser IR  $\Delta\omega$  utilizado es de  $5\text{cm}^{-1}$ . Por lo que claramente para este sistema, al igual que para el resto de los estudiados en esta tesis, se cumple la condición  $\Delta\omega \gg \frac{1}{\rho(1800\text{cm}^{-1})}$ , por lo que la absorción del primer fotón lleva al sistema directamente a la zona (II) de la Figura 2.11. Una vez que el sistema alcanza esta región de alta densidad de estados, el ascenso por “la escalera de energía vibracional” puede cumplimentarse principalmente por dos mecanismo. Por un lado, el modo activo (que absorbió la radiación) puede acoplarse con el “baño de estados” de la molécula, así la energía se distribuye en todos los modos por IVR, el modo activo se despuebla y se posibilita la subsiguiente absorción de fotones desde el mismo modo. Por otro lado y como ya se mencionó anteriormente, cuando se cumple que  $\Delta\omega \gg \frac{1}{\rho(E)}$  la absorción multifotónica también se ve favorecida, debido a que siempre se cumple la condición de resonancia con la energía de alguno de los fotones que forman el pulso láser. [70]

La implementación espectroscópica de la DMIR utilizada en esta tesis consiste en el acoplamiento de una fuente láser IR sintonizable de alta potencia, con un sistema de espectrometría de masas que permite la aislación de un ión de interés, la irradiación de este con la fuente IR, por tiempos que pueden variarse desde los 100 ms a 5 s, y

finalmente la detección de las especies producidas. En la Figura 2.11 se esquematizan los procesos que ocurren en la implementación de la espectroscopía de DMIR empleada. Un ión aislado en un espectrómetro de masas es irradiado mediante la fuente láser IR sintonizable. Sólo si la energía del fotón incidente es resonante con la energía de un modo normal de vibración (señalado en la Figura 2.11 como modo activo) ocurrirá la absorción del primer fotón, y se desencadenará el proceso de absorción multifotónico mediante los mecanismos anteriormente descritos. De esta forma, la absorción de fotones de energía  $h\nu_1$  producirán la fragmentación del ión, dicho proceso es detectado mediante espectrometría de masas por el aumento de la intensidad de los iones hijos producidos y la depleción del ión padre. Para la obtención de un espectro, se varía la energía del fotón incidente y se registra la intensidad del ión padre y los iones hijos como función de  $h\nu$ . Este proceso se repite en función de la longitud de onda dentro del intervalo de energía de interés. Dicho procedimiento da como resultado un espectro de masas para cada longitud de onda, mediante los cuales se calcula la eficiencia de fragmentación ( $Y(h\nu)$ ) como se indica en la Ecuación 2.10, donde  $I_{padre}(h\nu)$  y  $I_{fragmento}(h\nu)$  corresponden a la intensidad del ion padre y de los fragmentos respectivamente como función de la longitud de onda. Así, un gráfico de  $Y(h\nu)$  vs.  $h\nu$  da información análoga a la espectroscopía de absorción IR, es decir la energía de los modos normales de vibración. La identificación de los productos de fragmentación observados también es muy valiosa en la caracterización de sistemas complejos.

$$Y(h\nu) = -\ln\left(\frac{I_{padre}(h\nu)}{I_{padre}(h\nu) + \sum I_{fragmentos}(h\nu)}\right) \quad (2.10)$$

Cabe recalcar que, para llevar a cabo una asignación estructural, generalmente se compara el espectro de DMIR con la simulación del espectro de absorción IR obtenido mediante cálculos *ab-initio*. En este punto, no hay que perder de vista que los dos espectros comparados, el de absorción monofotónica IR y el de disociación multifotónica, son de naturaleza diferente. Por lo que las bandas pueden diferir ligeramente en su posición y ancho debido a la absorción desde estados cuánticos resultantes de combinación de modos. Además es común que las intensidades observadas experimentalmente difieran respecto a las simulaciones de los espectros de absorción IR monofotónicos, ésto puede ocurrir por varias razones. (1) La absorción del primer fotón es suficiente para activar un proceso reactivo (por ejemplo tautomerización), es de esperarse que la intensidad

de la banda de fragmentación correspondiente a la absorción por el grupo modificado químicamente se vea disminuida en comparación con la banda de absorción IR obtenida mediante simulaciones. (2) El proceso de IVR no es lo suficientemente eficiente, (3) la energía de disociación es demasiado grande y el límite de disociación no puede alcanzarse.

### 2.4.3. Espectroscopía de Fragmentación UV

Como se discutió al comienzo de esta sección y al igual que la espectroscopía de DMIR, la espectroscopía de fragmentación UV (FUV) se utilizó, durante el desarrollo de esta tesis, para el estudio de sistemas iónicos.

La espectroscopía REMPI es muy poderosa debido a que permite estudiar el proceso de absorción UV y proveer información, tanto de los estados vibracionales como de la dinámica del estado electrónico excitado, con la ventaja frente a otras técnicas de ser “selectiva en masas”. Sin embargo, el hecho de que ésta se base en la ionización de la especie de interés, plantea una limitación intrínseca de la técnica. Los potenciales para la segunda ionización de las especies iónicas son demasiado grandes para que el proceso de fotoionización ocurra mediante la absorción de radiación UV, por lo que el esquema REMPI no puede aplicarse para estudiar dichos sistemas. Es por esto que se utilizó la espectroscopía FUV, debido a que permite estudiar sistemas iónicos, brindando información “selectiva en masas” acerca de los estados vibracionales del estado electrónico excitado y de la dinámica de éste.

Antes de comenzar a describir brevemente el fundamento de la espectroscopía de FUV, cabe recalcar que la implementación experimental empleada durante el desarrollo de la tesis (descrita en el Capítulo 3), para el estudio de la espectroscopía de iones fríos seleccionados y detectados por espectrometría de masas, es relativamente nueva, siendo Thomas Rizzo [74] quien en el año 2006 presentó por primera vez la implementación de este esquema experimental para el estudio de aminoácidos protonados a temperaturas de alrededor de 10 K.

El esquema de los procesos involucrados en la espectroscopía FUV se resumen en la Figura 2.12. La FUV tiene aspectos similares a las dos primeras técnicas espectroscópicas descritas en este capítulo, de forma análoga a la DMIR, es una espectroscopía de

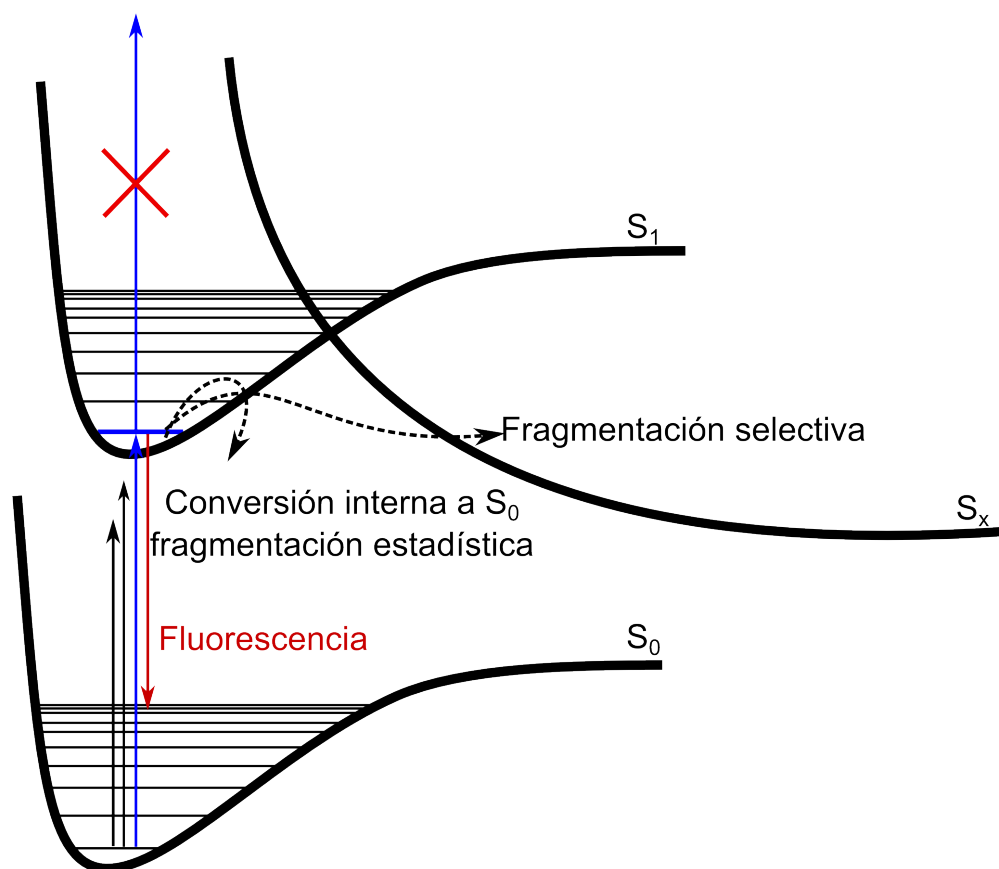


FIGURA 2.12: Diagrama esquemático del proceso de fragmentación por absorción UV. El proceso de excitación ocurre eficientemente cuando la energía de irradiación es resonante con una transición a un estado vibracional del estado electrónico excitado. Luego más de un mecanismo puede operar, pero es de esperar que una fracción de las moléculas excitadas se fragmenten. Los productos son registrados mediante espectrometría de masas y el espectro de FUV se obtiene de graficar la intensidad de los fotofragmentos *vs.* Energía del fotón.

acción en la cual se infiere la absorción de radiación UV a partir de la fotofragmentación sufrida por un ión aislado, que se manifiesta en la detección, mediante espectrometría de masas, de los fotofragmentos producidos. A diferencia de la DMIR, el proceso de fragmentación se inicia mediante la absorción de un fotón en el rango UV/VIS que produce la excitación electrónica de la molécula, al igual que en la espectroscopía REMPI. Una vez en el estado electrónico excitado, el ión puede disipar el exceso de energía por mecanismos radiativos y/o no radiativos, o absorber un segundo fotón como en el caso de REMPI. Como ya se discutió, es de esperarse que el potencial para la segunda ionización de un ión no pueda alcanzarse mediante absorción UV, por lo que puede descartarse el proceso de fotoionización. Por tanto, los dos mecanismos principales a considerarse son el decaimiento radiativo y el no radiativo. El decaimiento radiativo puede o no dar

lugar a fragmentación dependiendo si el proceso de disipación de energía lleva o no al sistema al estado electrónico fundamental, y del exceso de energía vibracional remanente en éste. El panorama de los mecanismos no radiativos que pueden ocurrir una vez que el sistema es promovido a un estado electrónico excitado puede ser muy complejo, y dependerá fuertemente de cada especie estudiada. Sin embargo, en líneas generales puede esperarse que de forma directa o indirecta (es decir, a través de otros estados electrónicos), el sistema decaiga al estado fundamental por conversión interna. Esto transforma la energía electrónica en un gran exceso de energía depositada en los modos vibracionales del ión, recordemos que un fotón de 310 nm tiene una energía de 4 eV o alrededor de 390 kJ/mol. Si duda este exceso de energía vibracional es suficiente para producir la fragmentación del ión.

Cuando la fragmentación ocurre en el estado electrónico fundamental, el exceso de energía vibracional es muy grande, lo que conduce a una rápida redistribución de la energía en los grados de libertad del sistema, por lo que el proceso de disociación es “estadístico”. Entonces es de esperarse que los canales de disociación y sus rendimientos cuánticos relativos sean comparables con los obtenidos a partir de la disociación inducida por colisiones “CID”. Por otro lado, si la fragmentación ocurre en el estado electrónico excitado, es posible observar selectividad en la fragmentación en función del modo vibracional y el estado electrónico excitado. De esta forma se puede inferir si la fragmentación ocurre en el estado electrónico fundamental, comparando los productos y los rendimientos cuánticos de fragmentación, con los obtenidos por CID.

Sea cual fuera el proceso que sufra el ión, una vez excitado, no hay que perder de vista que sólo se poblará el estado excitado cuando la longitud de onda de irradiación sea resonante con la energía de una transición vibro-electrónica. Por lo que, al registrar la intensidad de los fotofragmentos, mediante espectrometría de masas, en función de la longitud de onda del láser, se obtiene un espectro que da información de la energía de los estados vibracionales del estado electrónico excitado. Del cual además, se puede inferir el tiempo de vida de dicho estado, debido a que éste está relacionado con el ancho de las bandas (FWHM) mediante el principio de incertidumbre de Heisenberg a partir de la Ecuación 2.11.

$$FWHM(cm^{-1}) = (2c\pi\tau)^{-1} = \frac{5,3 \times 10^{-12}}{\tau(s)} \quad (2.11)$$

Con el ancho de banda a media altura (FWHM) de los picos vibracionales en ( $\text{cm}^{-1}$ ) y el tiempo de vida  $\tau$  en segundos. Esta aproximación es válida si puede asumirse que el ensanchamiento vibracional está dado únicamente por el tiempo de vida del estado electrónico excitado, y no por efectos de congestión espectral, como contorno rotacional y/o modos normales de baja frecuencia. A lo largo de este trabajo, para obtener ancho de banda lorentziano (FWHM) correspondiente al ensanchamiento homogéneo de la banda independientemente del perfil gaussiano del láser, las bandas se ajustaron a perfiles voigt de la forma:

$$V(x) = \int_{-\infty}^{\infty} G(x)L(x)dx \quad (2.12)$$

Donde la función voigt  $V(x)$  es la convolución del perfil gaussiano ( $G(x)$ ) y el lorentziano ( $L(x)$ ).

## Capítulo 3

# Sistemas Experimentales

---

En el presente capítulo se describen los sistemas experimentales empleados en el desarrollo de esta tesis. En la primer sección se describe el sistema utilizado para la realización de experimentos de espectroscopía REMPI y el estudio de la formación de agregados iónicos mediante vaporización láser. En la segunda sección, se describe el espectrómetro de masas y el sistema láser empleados para la realización de los experimentos de fragmentación UV. Por último en la tercer sección, se describe el espectrómetro de masas y los láseres empleados para la realización de los estudios de disociación multifotónica IR. Por información acerca del fundamento de estas técnicas espectroscópicas el lector puede referirse a la Sección 2.4 y a la bibliografía allí citada.

Cabe recalcar que, la cámara empleada para la aplicación de la técnica REMPI, ya existente en el *Instituto de Investigación en Fisicoquímica Córdoba- Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas-Centro Láser de Ciencias Moleculares de la Universidad Nacional de Córdoba* (CLCM), fue modificada sensiblemente durante el desarrollo de esta tesis, por lo que su construcción y puesta a punto se describen con cierto grado de detalle. Por otro lado, los espectrómetros empleados para la realización de los experimentos de fotofragmentación UV y de disociación multifotónica infrarroja, se encuentran instalados en los laboratorios de *Física de las Interacciones Iónicas y Moleculares* de la Universidad de Aix-Marseille y el *Centro Láser IR de Orsay* de la Universidad de Paris-Sud respectivamente. Ni la construcción ni la puesta a punto de dichos sistemas experimentales fue objeto de este trabajo de tesis, por lo que en las secciones correspondientes estos sistemas se describen de manera general, con el único objetivo de facilitar el entendimiento e interpretación de los experimentos realizados.

### **3.1. Espectroscopía REMPI y Estudio de la Formación de Agregados Iónicos Mediante Vaporización Láser: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser**

En la presente sección se describe el sistema experimental empleado para estudiar la espectroscopía REMPI de agregados neutros de metales con moléculas de interés biológico, y la generación de este tipo de clusters en estado iónico. En ambos casos mediante la utilización de una cámara de haces moleculares acoplada a vaporización láser. Para conducir estos estudios, fue necesario realizar modificaciones a la máquina



de haces moleculares ya existente en el CLCM, ya que ésta estaba optimizada para el estudio de cromóforos orgánicos de punto de fusión relativamente bajos. El sistema experimental originalmente estaba constituido por dos subunidades o sub-cámaras, una que llamaremos cámara principal, donde se genera el haz molecular acoplando una expansión supersónica y la ablación láser, y una segunda cámara acoplada en tándem, que contenía un analizador de masas por tiempo de vuelo. Esta última tuvo que ser modificada debido a que, según la experiencia del grupo de investigación, dicha disposición experimental poseía una baja sensibilidad para la detección de agregados generados por vaporización láser, por lo que se construyó un nuevo espectrómetro de masas que puede alojarse dentro de la cámara principal.

A continuación describimos la cámara principal con la que ya contaba el CLCM y posteriormente el diseño y construcción del nuevo analizador de masas. Finalmente, en el último apartado de esta sección se describe el sistema láser empleado para llevar a cabo los experimentos.

### 3.1.1. Cámara Principal

En la Figura 3.1 se muestran dos fotografías de la cámara principal acompañadas de un esquema de la vista superior de la misma. Esta cámara de vacío consta de un cuerpo cilíndrico de eje vertical rematado en su parte superior por un cono truncado. En el plano horizontal posee siete ventanas ((a), (b), (c), (f), (g), (h), (i) de la Figura 3.1c) que permiten un diseño flexible de diferentes experimentos, cuyos sellos de aislación con el exterior son *o-rings* de vitón o *gaskets* de cobre, según las bridas involucradas en cada caso. Posee además tres ventanas sobre el cono superior, dos de ellas ortogonales entre sí y a 45° con respecto al plano horizontal ((d) y (e) de la Figura 3.1c), mientras que la restante es plano paralela a este último ((j) de la Figura 3.1c).

El vacío en la cámara se logra mediante una bomba rotatoria de dos etapas (Edwards, modelo E2 M40) que posee una capacidad de bombeo de 50 m<sup>3</sup>/h en el intervalo de 760 a 1.10<sup>-4</sup> Torr, acoplada a una bomba difusora de aceite (Edwards, modelo Diffstake 250/2000M) de 2000 L/s con la cual se alcanzan presiones del orden de 1.10<sup>-9</sup> Torr. La conexión entre la bomba difusora de aceite y la cámara está mediada por un cierre “mariposa” que permite acceder al interior de la cámara evitando apagar la bomba difusora.

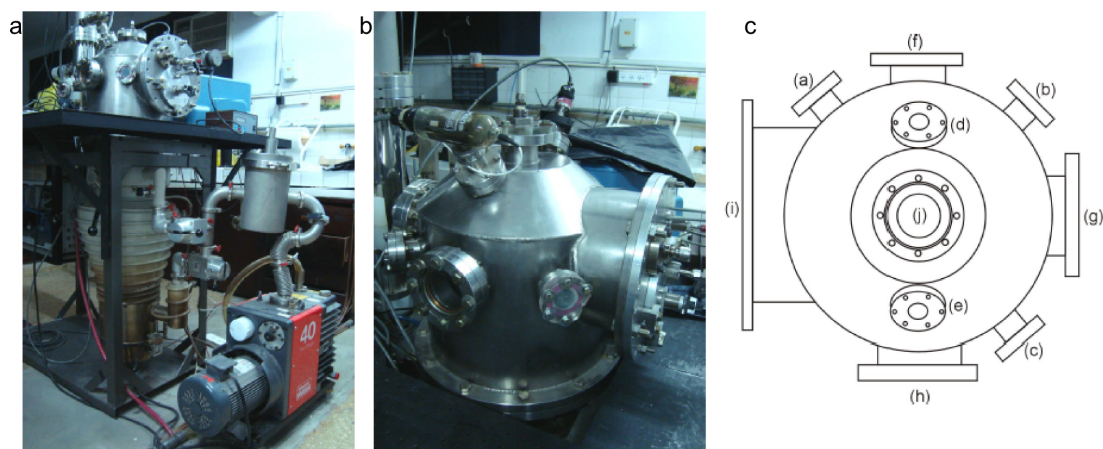


FIGURA 3.1: Cámara principal de haces moleculares montada en el CLCM antes de las modificaciones realizadas en la tesis (a) fotografía del conjunto cámara - sistema de vacío, (b) cámara principal y (c) diagrama esquemático de la cámara principal

La presión de la cámara principal puede monitorearse en todo momento mediante dos manómetros acoplados a las ventanas (d) y (e) indicadas en la Figura 3.1c. El primero de ellos es de tipo *Pirani* (Varian, modelo 531), que permite medir presiones que van desde los 760 a  $1.10^{-3}$  Torr, y el segundo consiste en un tubo de ionización de tipo *Bayard-Alpert* (Varian, modelo 564), que permite registrar la presión en el intervalo de  $1.10^{-3}$  a  $1.10^{-9}$  Torr. La lectura de ambos manómetros se realiza mediante una unidad de control (Varian, modelo Multi-Gauge).

### 3.1.2. Analizador de Masas TOF

La espectrometría por tiempo de vuelo (TOF) presenta ciertas ventajas respecto a otros espectrómetros de masas[71] (véase Sección 2.1) entre las que pueden mencionarse, la obtención del espectro de masas completo en un único evento y la alta velocidad de adquisición, que permite evaluar el efecto de cambios en los parámetros experimentales simultáneamente a la obtención del espectro de masas. Pero las dos virtudes más importantes que nos llevan a utilización de este tipo de espectrómetro son que, por un lado, pueden acoplarse a sistemas de haces moleculares para la aplicación de métodos espectroscópicos, como REMPI, y por otro, que su construcción es relativamente sencilla (en comparación con otros descritos en la Sección 2.1) al punto de que su eficiencia como analizador de masas depende más de la electrónica involucrada, que de la alineación y uniformidad de su construcción.

El desarrollo del equipo TOF se basó en el diseño propuesto originalmente por Wiley y McLaren [71] quienes en 1955 idearon un espectrómetro TOF de alta resolución cuyo funcionamiento fue descrito en la Sección 2.1. Su propuesta de una doble etapa de aceleración para lograr la focalización espacial de los iones introdujo un marcado aumento de la resolución de este tipo de espectrómetros, y su utilización tomó gran impulso para aplicaciones espectroscópicas.

A continuación se detallan a grandes rasgos el diseño y ensamble del espectrómetro TOF, su construcción y puesta a punto para desarrollar experimentos de vaporización láser acoplada a expansiones supersónicas. Por último, se describe la sincronización de los eventos involucrados en la adquisición de un espectro de masas, tanto en el caso en el que los iones fueran generados por fotoionización o el caso en el que se estudiaran los iones provenientes de la vaporización láser.

### **3.1.2.1. Diseño del TOF**

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del equipo disponible, se decidió aumentar el número de agregados (neutros o iónicos) que ingresan al TOF. Para esto fue necesario acercar la fuente de generación de agregados a la entrada del espectrómetro. Por lo que se propuso construir un nuevo TOF para acoplarse dentro de la cámara principal por medio de la ventana (j) (Figura 3.1c) tal que la zona de extracción y aceleración de iones se encuentre alineada con el centro de las ventanas (a), (b), (c), (f), (g), (h), (i) (Figura 3.1c), y que la distancia entre la fuente de los agregados y la entrada del TOF se reduzca de 30 cm (distancia original) a aproximadamente 3 cm (distancia actual).

Teniendo en cuenta los requerimientos del experimento propuesto, se realizaron planos detallados de los componentes y el ensamblado del espectrómetro a construir, en la Figura 3.2 se muestra un diagrama simplificado del sistema experimental desarrollado. La construcción y maquinado del equipo se realizó en acero inoxidable AISI 304, en un taller privado siguiendo las indicaciones del diseño elaborado.

El sistema construido consta de dos partes, el espectrómetro TOF en sí, y por otro lado un cámara en forma de tubo, denominada tubo de vuelo, que se ensamblan por encima de la ventana (j) para completar la zona de vuelo libre y detección de los iones. El espectrómetro está constituido por una serie de lentes electroestáticas, la placa

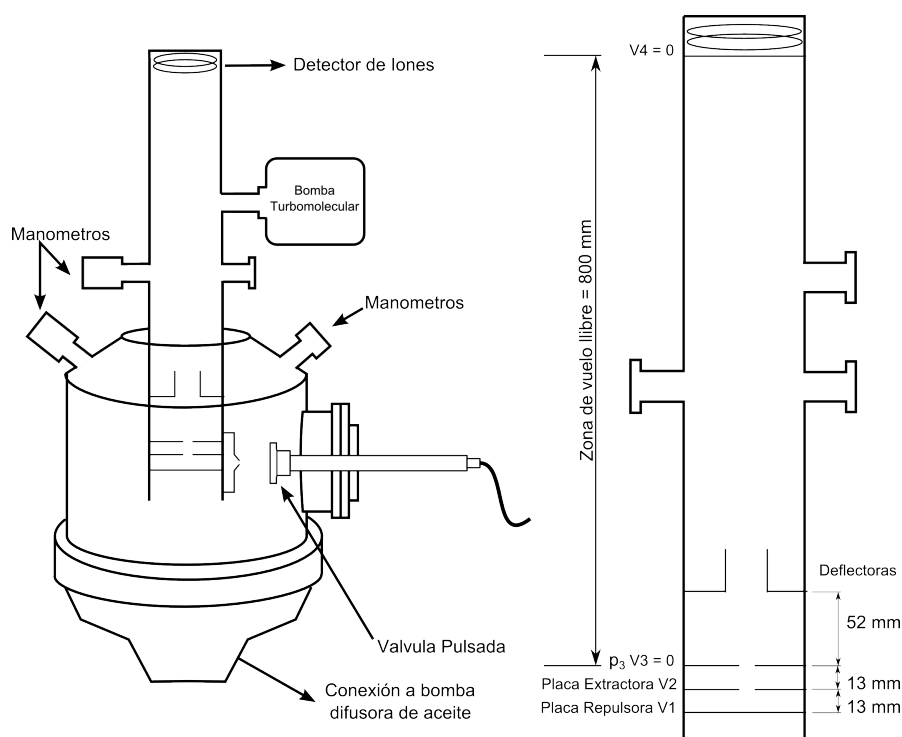


FIGURA 3.2: Ensamble esquemático y simplificado (no a escala) del equipo desarrollado en el CLCM. A la izquierda de la figura puede observarse una diagrama general del sistema experimental, mientras que en el panel de la derecha se muestra una ampliación del TOF y alguna de sus longitudes características

repulsora, extractor y  $p_3$  conforman las zonas de extracción y aceleración como se vio en la Sección 2.1. Además, a 52 mm de comenzada la zona de vuelo libre se instalaron dos placas deflectoras que, conectadas a una fuente de potencial regulable, permiten corregir la trayectoria de los iones para optimizar la intensidad de la señal obtenida. La zona de vuelo libre queda constituida desde la placa  $p_3$  conectada a tierra, el resto de la cámara principal y el tubo de vuelo que se ensambla en tándem a la ventana (j) por medio de las bridas y reductores correspondientes. Éste último tienen en diámetro interior de alrededor de 100 mm y 500 mm de largo, por lo que la distancia de vuelo libre total es de alrededor de 800 mm. El tubo de vuelo posee 5 ventanas, cuatro de ellas en un plano normal al eje principal, dispuestas con un ángulo de  $90^\circ$  entre sí. En una de estas ventanas se encuentra instalado un manómetro tipo *penning* (Blazers, modelo PKR 261) que permite registrar la presión en el TOF. Cabe recalcar que las otras tres ventanas serán utilizadas en el futuro para la implementación de una nueva etapa de aceleración de iones, para realizar estudios de espectroscopía de fragmentación UV. El tubo de vuelo se evacua mediante una bomba turbomolecular (Pfeiffer, model TMU 261P) de 60000 L/min, conectada a éste mediante su quinta ventana, ésta se controla

mediante una unidad (Blazers, modelo TCP015) que además permite visualizar la lectura del manómetro.

### 3.1.2.2. Sincronización de Eventos

La sincronización de los eventos pulsados a 10 Hz se llevó a cabo mediante dos generadores de pulsos TTL (Berkeley Nucleonics Corp, modelo 575 y 500), de cuatro canales cada uno. Éstos permiten disparar los distintos equipos en forma sincronizada, variando el retraso entre los eventos que ocurren en el experimento. Tanto para este sistema experimental, así como para los demás descritos en este capítulo, la sincronización de los eventos es de vital importancia para el funcionamiento del experimento. Convirtiendo al generador de pulsos en el “corazón” del experimento y a la optimización de los retardos en una operación fundamental.

El sistema experimental descrito en la presente sección se operó en dos modalidades diferentes: para la obtención de espectros REMPI (detección por fotoionización) y para la caracterización de especies iónicas provenientes de la vaporización láser. Cada una de estas modalidades requiere de sincronizaciones experimentales diferentes, que aquí describimos brevemente y que se encuentran esquematizadas en la Figura 3.3.

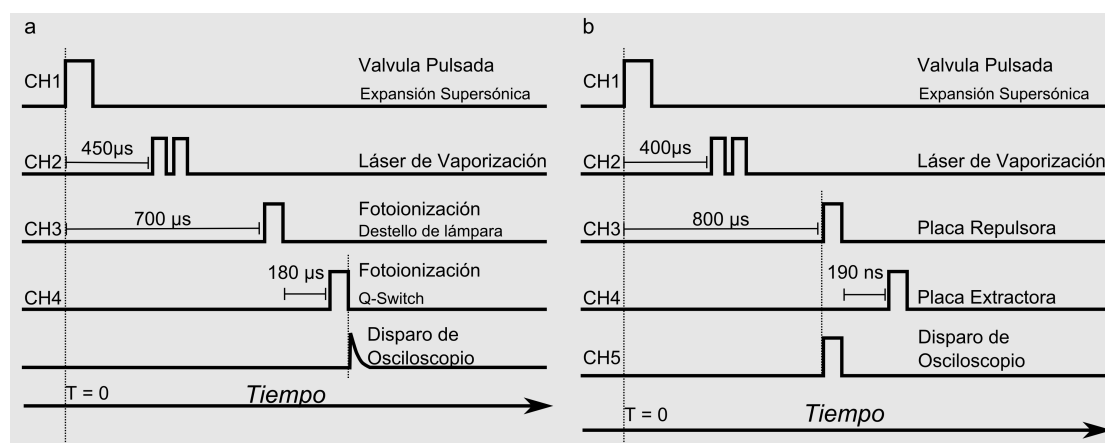


FIGURA 3.3: Descripción de la sincronización de eventos para la utilización del sistema experimental. a) Sincronización del sistema experimental para estudiar procesos de fotoionización. b) Sincronización del sistema experimental para la detección de iones generados por la vaporización láser. En ambos casos la secuencia de eventos comienza por al apertura de la válvula pulsada, seguida por el disparo del láser de vaporización. Posteriormente se sincronizará el sistema de fotoionización o de encendido de las placas electrostáticas según el experimento lo requiera.

Para la detección por fotoionización, el inicio de la secuencia de eventos está dada por la apertura de la válvula pulsada, primera orden que se emite desde el generador de pulsos a través del canal 1 (CH1) y que constituye el tiempo cero del experimento. El segundo evento que se dispara mediante el canal 2 (CH2), es el destello de la lámpara del láser de Nd:YAG empleado para la vaporización de las muestras, que ocurre  $\sim 450 \mu\text{s}$  luego del inicio del experimento. Para este láser, no se requiere un segundo canal para el pulsado del Q-switch, ya que está sincronizado internamente a  $96 \mu\text{s}$  de retraso luego del pulsado de la lámpara. Por último la fotoionización se produce en el espectrómetro mediante los fotones provenientes del láser de colorantes bombeado por un segundo láser de Nd:YAG, (por detalles de los láseres empleados véase la siguiente sección). Este último requiere que la lámpara de destello y el Q-switch se disparen independientemente. Los retardos involucrados en el disparo de estos últimos dos eventos están relacionados con el tiempo que los iones tardan en llegar hasta el centro de la zona de extracción, por lo que son muy sensibles a las condiciones experimentales empleadas. En la Figura 3.3a, a modo de ejemplo los retardos del canal de destello de la lámpara (CH3) y del Q-switch (CH4) se fijan a  $\sim 700 \mu\text{s}$  y a  $\text{CH3}+180 \mu\text{s}$  respectivamente. Finalmente es necesario disparar el osciloscopio al tiempo cero de la “carrera” de iones en la zona de vuelo libre. Para esto se utiliza un tubo fotomultiplicador PMT (Hamamatsu, 1P28) que registra un reflejo del haz de ionización al arribar a la cámara.

La utilización del espectrómetro para estudiar las especies generadas en estado iónico por vaporización láser involucra una sincronización de eventos ligeramente diferente. Al igual que en el caso de la fotoionización, la primera orden que desencadena el experimento al tiempo cero es la apertura de la válvula pulsada (CH1), seguida del destello de la lámpara del láser de Nd:YAG utilizado para generar la vaporización (CH2). Si bien los eventos son los mismos, el retardo entre CH1 y CH2 varía entre los dos experimentos descritos, debido a que la velocidad de las especies iónicas y neutras generadas por vaporización láser suelen ser diferentes. A diferencia de lo que ocurre en el experimento de fotoionización, los potenciales de las placas de repulsión y extracción deben permanecer apagadas durante la mayor parte del experimento, ya que lo que se pretende es detectar los iones generados en la vaporización láser. De no ser así, dichos iones no podrían entrar en la zona de extracción del espectrómetro puesto que, serían repelidos por el campo eléctrico generado en el ingreso del TOF. Entonces los canales CH3 y CH4 son empleados para disparar el encendido de los potenciales de dichas placas, que se mantienen

cargadas durante  $5 \mu\text{s}$ . En su conjunto, el retardo de CH3 y CH4 con respecto a C1, deben optimizarse para que el encendido de éstos potenciales ocurran en el momento en que los iones llegan a la zona de extracción del TOF (alrededor de  $800 \mu\text{s}$ ), a su vez, debe establecerse una pequeña diferencia temporal, del orden de los 120 ns, entre el encendido de ambos potenciales, para incrementar tanto la señal como la resolución del espectrómetro. Por último, un quinto canal (CH5) se utiliza para disparar el osciloscopio al tiempo cero de la “carrera” de iones en la zona de vuelo libre. Este tiempo está dado por el encendido de la placa repulsora y extractora, por lo que CH5 siempre tiene el mismo retardo que CH3.

### 3.1.3. Sistema Láser

Para realizar los experimentos en la sistema de haces moleculares montado en el CLCM, se utilizaron dos láseres. Uno de vaporización, y en el caso de estudiar especies neutras, otro para generar la fotoionización de las especies presentes en el haz molecular.

**Láser de Vaporización.** Para generar las especies en fase gaseosa, ya sea metálicas y/o orgánicas, se empleó un láser de estado sólido de Nd:YAG (Big Sky láser, modelo CFR 200), Figura 3.4, cuya emisión característica ( $\lambda = 1064 \text{ nm}$ ) proviene de las transiciones de los iones de neodimio presentes en un cristal ( $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$  : *yttrium aluminium garnet*) excitados transversalmente por una lámpara de destello. Dicho láser emplea un Q-switch para producir pulsos láser de 5,5 ns de duración y energía máxima nominal de 235 mJ, a una frecuencia de 10 Hz. La energía del pulso láser puede ser ajustada de modo interno, modificando el voltaje de la lámpara de destello, o de modo externo, cambiando el retraso entre el Q-switch y la lámpara. Sin embargo, ninguna de estas dos opciones es conveniente debido a que, por un lado la lámpara posee un voltaje óptimo de operación, y por otro la modificación del retraso temporal del Q-switch produce una sensible inestabilidad en la operación del láser. Por lo que para regular la energía del mismo, comúnmente se utilizaron atenuadores situados en el camino óptico.

**Láser de Excitación/Ionización.** En los experimentos REMPI, se utilizó radiación UV sintonizable resultante del doblado de frecuencia de la radiación emitida por un láser de colorantes (Sirah, modelo Cobra-Strech), el cual a su vez es bombeado por el segundo armónico (532nm) de un láser de Nd:YAG (Quantel, modelo Brillant B, pulso de 5 ns, operación a 10 Hz), ambos láseres se muestran en la Figura 3.5. El doblado



FIGURA 3.4: Láser de estado sólido de Nd:YAG, Big Sky láser, modelo CFR 200, utilizado para ablación láser de muestras sólidas, con el fin de vaporizar metales y/o moléculas orgánicas

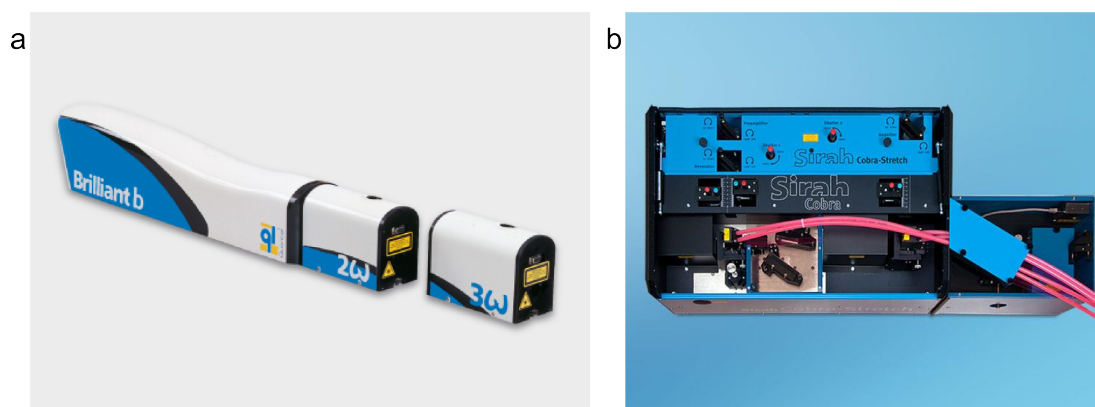


FIGURA 3.5: Sistema láser empleado para la fotoionización. a) Láser de estado sólido de Nd:YAG, Quantel, modelo Brilliant B, b) Láser de colorantes Sirah, modelo Cobra-Strech.

de frecuencias se obtuvo utilizando un cristal BBO Tipo II dispuesto sobre una plataforma de sintonización automática. El colorante más utilizado en este sistema láser fue Rhodamina 590 (intervalo de emisión 552-580 nm). Las soluciones de colorantes fueron preparadas en etanol (J. T. Baker) de 99,9% de pureza.



### 3.2. Espectroscopía de Fragmentación UV de iones fríos: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser

En la presente sección se explicará brevemente el funcionamiento del espectrómetro instalado en el laboratorio de *Física de las Interacciones Iónicas y Moleculares* (PIIM) de la Universidad Aix-Marseille, el cual fue utilizado para realizar experimentos de espectroscopía de fragmentación UV de iones fríos, ya sean agregados protonados o argéntados de bases del ADN. Este equipo fue construido de forma casera, y su desarrollo

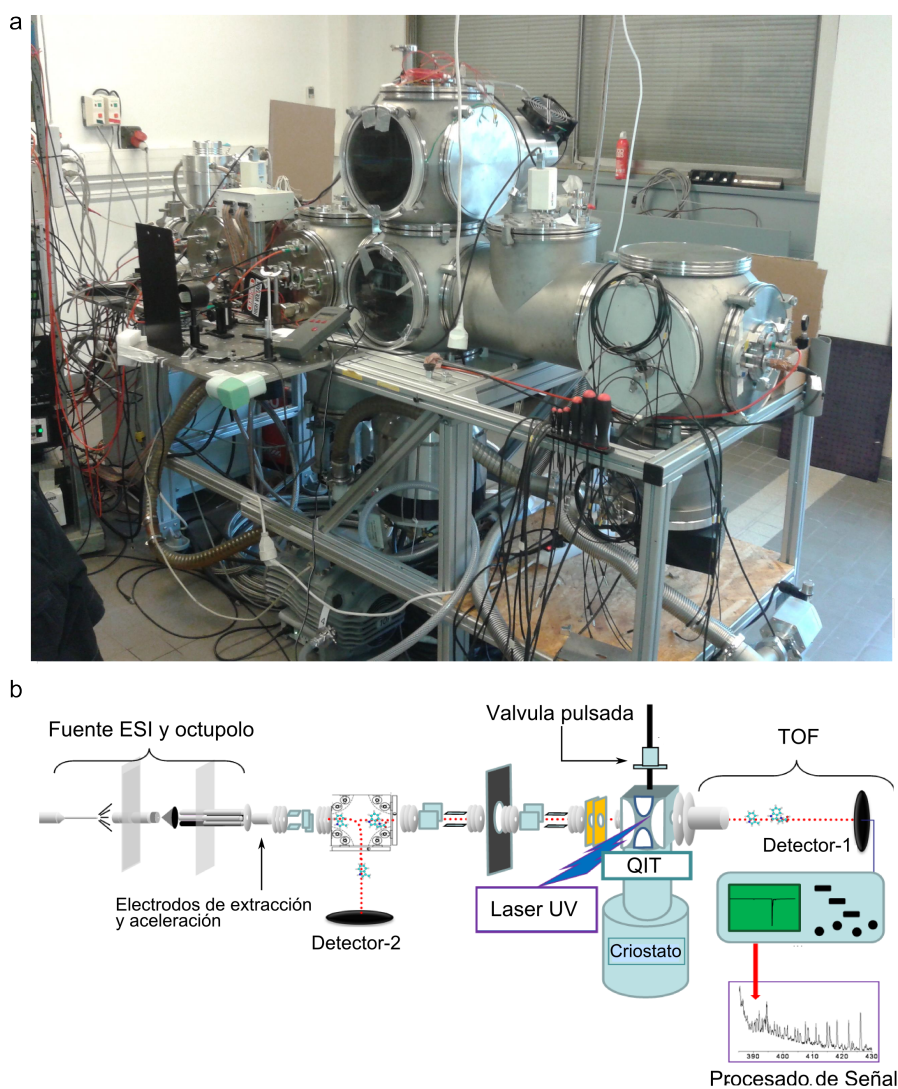


FIGURA 3.6: Sistema experimental instalado en el laboratorio PIIM. a) fotografía del sistema experimental, b) diagrama esquemático de las partes constituyentes y del funcionamiento del espectrómetro.

fue inspirado en el trabajo original de Wang y Wang,[103] en el cual, se describe un

sistema similar con cierto grado de detalle. En la Figura 3.6a se muestra una fotografía del sistema instalado en el PIIM.

El ensamblado del equipo consta de una serie de cámaras de vacío acopladas en tándem. Las partes constituyentes de éste se encuentran esquematizadas en la Figura 3.6b. De forma general se puede dividir el espectrómetro en tres secciones, una fuente de vaporización e ionización por *electrospray* (ESI), una trampa cuadrupolar tridimensional (QIT) y un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo (TOF). Para más detalles del funcionamiento de cada parte del equipo, el lector puede referirse al Capítulo 2 y a la bibliografía allí citada. La secuencia de eventos involucrada en la operación del sistema está esquematizada de forma simplificada en la Figura 3.7 (no a escala) y puede describirse brevemente como sigue:

Los agregados iónicos son producidos en una fuente de ESI construida en la Universidad de Aarhus, Dinamarca, que opera a alrededor de -3 kV. A la salida del capilar del ESI los iones son almacenados en un octupolo durante 90  $\mu$ s, éste se encuentra en una primer cámara de vacío que es bombeada por un sistema de bombas rotatoria/turbomolecular que mantiene ésta sección a una presión de  $1.10^{-3}$  Torr. En este punto, el potencial RF de la trampa octupolar puede modificarse para producir disociación colisional de las especies. Luego del período de acumulación, los iones son extraídos de la trampa con un pulso de potencial de -50 V y posteriormente acelerados por un segundo electrodo con un potencial pulsado de 190 V. Esta secuencia de almacenamiento y extracción opera a 10 Hz y produce paquetes de iones con una ancho temporal de alrededor de 500 ns. Posteriormente el paquete de iones es conducido mediante una serie de lentes electroestáticas a la segunda sección del experimento, en este trayecto, tres sistemas de vacío rotatoria/turbomolecular producen una caída de la presión hasta los  $1.10^{-7}$  Torr. A la entrada de la QIT, un sistema de electrodos conectados a una fuente de potencial de 190 V disminuyen la energía cinética de los iones para evitar la fragmentación colisional de éstos. Además, situada entre la fuente de ESI y la entrada de la QIT se encuentra instalada una puerta de iones. El retraso temporal entre la “apertura” de ésta y la eyección de los iones desde el octupolo, permite seleccionar la masa del ión padre que ingresará a la QIT. Para producir el enfriamiento de los iones, la QIT está instalada en la cabeza de un criostato (Coolpak Oerlikon) y se utiliza He como gas buffer, éste es inyectado mediante una válvula pulsada (General Valve) 1 ms antes de que los iones entren a la trampa para garantizar la termalización del gas. De esta forma los iones

se mantienen dentro de la QIT por algunos ms con el objetivo de que éstos se enfríen colisionalmente con el gas buffer, este proceso genera iones a temperaturas entre 20 y 50 K. Una vez finalizado el periodo de enfriamiento, la fragmentación de las especies atrapadas en la trampa ocurre por el disparo de un láser UV sintonizable (para más detalles del sistema láser ver la siguiente sección), los fragmentos producidos son extraídos de la QIT y analizados en la tercera etapa del experimento que consiste en un TOF de 1,5 m de largo. La detección de los iones se realiza mediante un MCP conectado a un osciloscopio digital y un programa de procesado de señal desarrollado en el laboratorio. El espectro de FUV se obtiene de la normalización de la intensidad obtenida de cada ión hijo, con la correspondiente intensidad del ión padre y la potencia del láser, en función de la longitud de onda de excitación.

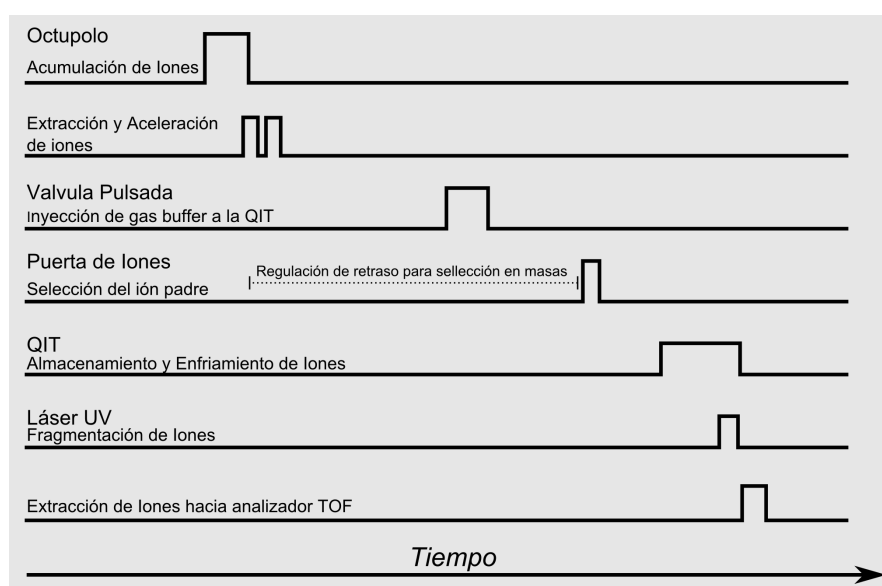


FIGURA 3.7: Esquema de eventos que tienen lugar en la obtención de un espectro FUV, brevemente: conformación de un paquete de iones en un octupolo, extracción y aceleración del paquete de iones, llenado de la QIT de gas buffer, selección en masas del ion padre mediante la regulación del retraso temporal de la “apertura” de una puerta iónica, enfriamiento colisional y fragmentación del ión padre dentro de la QIT y finalmente, análisis de los productos de la fragmentación por medio de un espectrómetro TOF.

### 3.2.1. Sistema Láser

Para la realización de experimentos de espectroscopía electrónica, el laboratorio PIIM cuenta con 2 láseres sintonizable OPO (del inglés, *Optical Parametric Oscillator*) EKSPLA modelo NT340. Este tipo de láser permite barrer tanto la zona ultravioleta

como la visible del espectro electromagnético de forma continua. El modulo OPO es bombeado por el segundo armónico de un láser de Nd:YAG que se encuentra integrado en el mismo sistema (véase Figura 3.8). El láser opera a 10 Hz con un ancho temporal de pulso de 10 ns, el ancho de banda del pulso en la zona UV es de alrededor de  $10\text{ cm}^{-1}$ , y la máxima potencia entregada en dicha región espectral es de 2 mJ/pulso.



FIGURA 3.8: Láser OPO EKSPLA modelo NT340 instalado en el laboratorio de estudio de *Física de las Interacciones Iónicas y Moleculares* de la Universidad de Aix-Marseille, utilizado para realizar estudios de fotofragmentación UV.

### 3.3. Espectroscopía de Disociación Multifotónica IR: Espectrómetro de Masas y Sistema Láser

En la presente sección explicaremos brevemente el funcionamiento del espectrómetro instalado en el *Centro Láser IR de Orsay* (CLIO) de la Universidad Paris-sud, el cual fue utilizado para realizar experimentos de espectroscopía de disociación multifotónica IR de iones, ya sean agregados protonados o argentados de bases del ADN. El espectrómetro utilizado es un equipo Burker Daltonics modelo Apex Qe, modificado con una interface cuadrupolar. En la Figura 3.9a se muestra una fotografía del sistema instalado en el CLIO.

El funcionamiento del sistema experimental instalado en CLIO es, en líneas generales, similar al descrito para el espectrómetro instalado en PIIM (Sección 3.2). Éste consiste en un espectrómetro de MS/MS en tándem y sus partes constituyentes se encuentran esquematizadas en la Figura 3.9b. De forma general se puede dividir el espectrómetro en tres secciones, una fuente de vaporización e ionización por *electrospray*

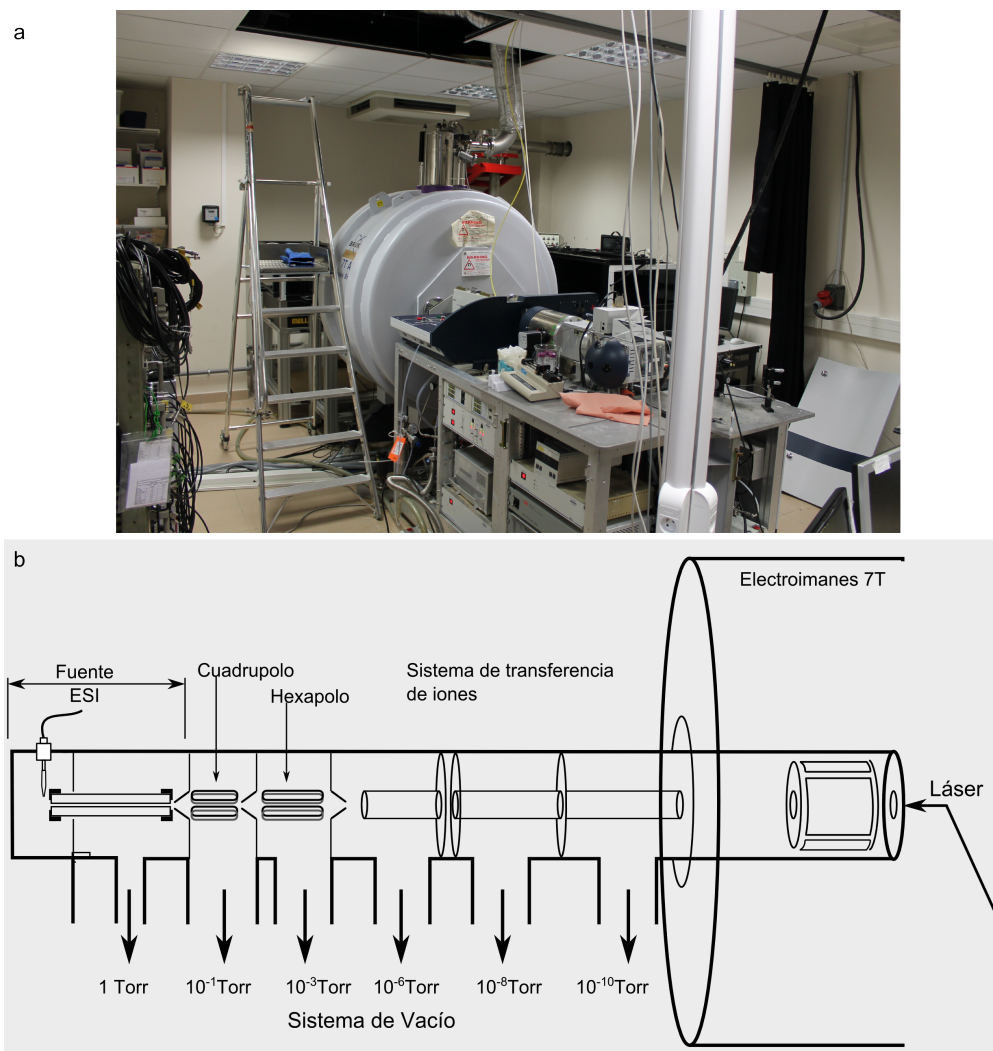


FIGURA 3.9: a) espectrómetro instalado en el *Centro Láser IR de Orsay (CLIO)* empleado para la realización de los estudios de DMIR, b) esquema de las partes constituyentes del espectrómetro instalado en CLIO

(ESI), un cuadrupolo lineal y un espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FTICR). Para más detalles del funcionamiento de cada parte del equipo, el lector puede referirse al Capítulo 2 y a la bibliografía allí citada. Brevemente el funcionamiento de este sistema puede describirse de la siguiente manera: Los iones son producidos en la fuente ESI integrada en el equipo que opera a alrededor de -4 kV. La fuente originalmente consta del capilar del ESI y una trampa hexapolar para la generación de los “paquetes” de iones. En CLIO esta fuente se modificó, agregándose un espectrómetro de masas cuadrupolar como interfase entre el capilar del ESI y el hexapolo. Esta modificación permite realizar una primera selección en masas

del ión padre que ingresará a la trampa hexapolar, mejorando la sensibilidad del experimento y disminuyendo el tiempo de operación. Una vez en el hexapolo, los iones seleccionados por masas en el cuadrupolo son almacenados y extraídos generándose los “paquetes” de iones de forma análoga a la descrita en Sección 3.2, en ésta etapa del experimento puede producirse la fragmentación colisional de los iones, modificando el potencial aplicado tanto a la trampa hexapolar, como a los “skimmers” que conectan cada etapa del experimento. Luego de ser extraídos, los iones son conducidos mediante un sistema de lentes electroestáticas hacia la entrada de la última sección del equipo que consiste una FTICR. Con el objetivo de realizar los experimentos de DMIR, la trampa del ICR ha sido modificada para permitir el ingreso del haz láser dentro de la cavidad mediante una ventana de ZnSe y una serie de orificios cónicos, tanto en la carcasa del equipo como en la celda de ICR. Una vez dentro de dicha celda, los iones son irradiados mediante radiación IR proveniente de alguno de los láseres disponibles en el laboratorio (véase la siguiente sección). El tiempo de irradiación puede modificarse para optimizar el proceso de fragmentación, según el sistema de estudio. Una vez finalizada la irradiación, los productos de la fragmentación son analizado en la misma celda. Este proceso se repite en función de la longitud de onda dentro del intervalo de energía de interés. Dicho procedimiento da como resultado un espectro de masas para cada longitud de onda, mediante los cuales se calcula la eficiencia de fragmentación ( $Y(\lambda)$ ) como se indica en la Ecuación 2.10

### 3.3.1. Sistemas Láser

En el *Centro Láser IR de Orsay* se encuentran instaladas una serie de facilidades para la realización de experimentos de DMIR. Este centro cuenta con un láser de electrones libres (FEL, del inglés *Free Electron Laser*) que permite estudiar la región del infrarrojo medio, el cañón de electrones del FEL se encuentra optimizado para que el láser emita en la región comprendida entre los 900 y 2000  $\text{cm}^{-1}$ . Además este laboratorio cuenta con otros *láseres de mesada* que se describen al final de esta sección.

**FEL..** Los FEL no son equipos convencionales que se obtengan comercialmente, a diferencia de los demás láseres empleados en esta tesis, sino que existen solo en algunas universidades y centros de investigación que los han desarrollado específicamente y funcionan como facilidades mundiales. Por ésto creemos que vale la pena describir

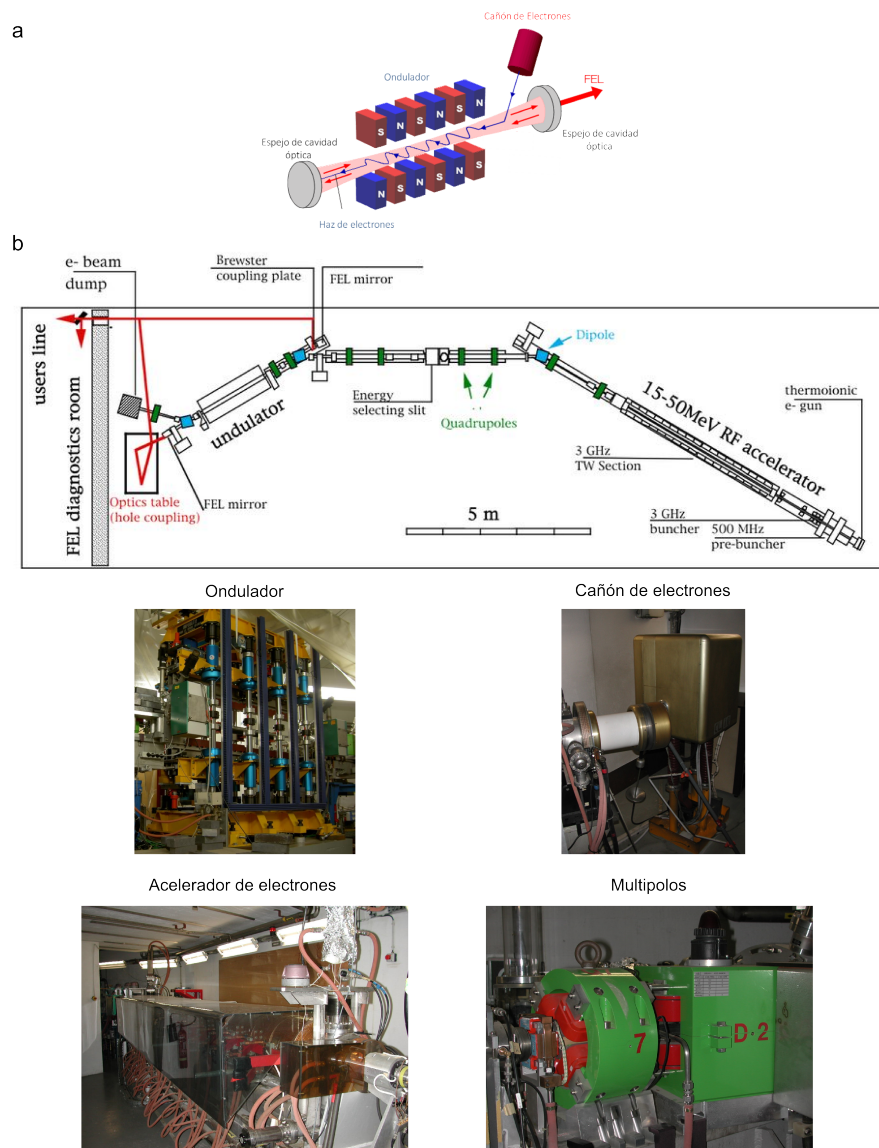


FIGURA 3.10: a) Esquema básico del funcionamiento de un láser de electrones libres, b) plano esquemático de FEL instalado en CLIO y fotografías de las partes más importantes de este, entre las que se pueden observar el cañón de electrones, el acelerador lineal, parte del sistema de multipolos para la colimación del haz de electrones y el ondulator montado sobre soportes neumáticos.

brevemente el principio de funcionamiento de esta clase de láseres. También destacaremos alguna de las características de la construcción y la radiación emitida por el FEL instalado en CLIO.

Los láseres convencionales utilizan átomos, iones o moléculas, en estado sólido, líquido o gaseoso, como medio activo para la emisión y la amplificación de la radiación. A diferencia de éstos, los FEL utilizan electrones con energía cinéticas del orden de los MeV como medio activo. Los electrones generados a partir de un electrodo metálico, una vez atravesada la región de aceleración, emiten radiación al oscilar en un campo magnético periódico generado por una serie de electroimanes dispuestos linealmente, sección del equipo que se denominada ondulator. La radiación emitida por los electrones en el ondulator es almacenada en una cavidad óptica tal que ésta puede interactuar nuevamente con los electrones. Esta interacción conlleva a una modulación de la densidad electrónica en el ondulator y produce un aumento de la intensidad y coherencia de la radiación producida. La longitud de onda emitida depende de parámetros experimentales como la energía de los electrones, el campo magnético aplicado y el período del ondulator. En el ondulator instalado en CLIO, los electroimanes están montados sobre soportes neumáticos que permiten modificar la distancia entre ellos, variando de esta forma la frecuencia del ondulator y por tanto la longitud de onda de la radiación emitida.

La Figura 3.10a muestra esquemáticamente el funcionamiento de un FEL, mientras que en la Figura 3.10b se muestra un plano esquemático de la construcción del FEL instalado en CLIO y fotografías de las partes más importantes de éste. Como ya se menciono, la radiación de este láser es sintonizable de manera continua entre 900 y 2000  $\text{cm}^{-1}$  y la energía promedio en esta región espectral es de 36,8 mJ/pulso. El perfil temporal del pulso láser está constituido por un “macro-pulso” de 8  $\mu\text{s}$  y una frecuencia de 25 Hz. Cada “macro-pulso” está a su vez constituido por 500 pulsos de alrededor de 5 ps de duración, separados cada 16 ns uno de otro. El ancho de banda del láser es dependiente de la longitud de onda de trabajo, pero en esta región espectral es cercana a 10  $\text{cm}^{-1}$ .

**Láseres de Mesada** El laboratorio también cuenta con un OPO infrarrojo (Laser-vision) bombado por un láser Nd:YAG. Este sistema láser permite sintonizar de forma continua la región espectral comprendida entre 2000 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Por último también



---

está disponible un láser continuo de CO<sub>2</sub> ( $\lambda = 943 \text{ cm}^{-1}$ ) de alta potencia que puede acoplarse tanto al FEL como al OPO para optimizar el proceso de fragmentación.



## Capítulo 4

# Interacción de Átomos y Cationes Metálicos con Moléculas Orgánicas

---

## 4.1. Introducción

En el presente capítulo se presenta la primera aproximación realizada durante el desarrollo de la tesis al estudio de la espectroscopía de agregados de átomos metálicos con moléculas orgánicas. Como se describió en el Capítulo 1, el interés en el estudio, en fase condensada, de estos clusters pequeños radica en sus fascinantes propiedades químicas y fotofísicas, en particular, su rendimiento cuántico de fluorescencia, el cual es comparable al de los quantum-dots semiconductoras (nanopartículas pequeñas de CdSe, calcogenuros, etc.), con las ventajas frente a éstos, de tener baja toxicidad y ser biocompatibles.[38] Además, poseen la propiedad de que sus espectros de absorción y emisión son sintonizable desde el IR hasta el UV-vis, cambiando el número de átomos que componen el agregado y la naturaleza de las interacciones intermoleculares de las matrices orgánicas en las cuales se generan. Así por ejemplo, Dickson *et al.* han mostrado que puede obtenerse un gran incremento en las señales de fluorescencia, encapsulando pequeños clusters de  $\text{Ag}_{2-8}$  en dendrímeros,[44] estructuras peptídicas[45] y cadenas de ADN.[46] La utilización de ADN como matriz para la síntesis de éstos agregados reviste particular interés debido a que, se ha encontrado que los agregados de  $\text{Ag}_n$  sintetizados en dichas matrices exhiben espectros de fluorescencia que dependen fuertemente de la secuencia de bases que constituyen las cadenas empleadas para la síntesis, lo que permite sintonizar el espectro de absorción/emisión que éstos presentan.[47–51]

Recientemente, Schatz y colaboradores han estudiado mediante cálculos realizados con la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT), la dependencia con el tamaño del cluster, de las propiedades de absorción, fluorescencia y del scattering Raman de piridina, interaccionando con pequeños clusters de  $\text{Ag}_n$  ( $n=2-8, 20$ ). Sorprendentemente, los incrementos más importantes fueron encontrado para el más pequeño de los clusters estudiados [ $\text{Ag}_2$ -piridina]. Éstos incrementos, pudieron ser correlacionados con la distancia entre la molécula y el cluster metálico, y con la polarizabilidad de la resonancia como en el caso de los incrementos electromagnéticos observados para nanopartículas.[104] Sin embargo, los clusters de  $\text{Ag}_2$  producidos en fase gaseosa y enfriados en una expansión supersónica muestran espectros de excitación discretos, con transiciones vibro-rotacionales bien definidas y equivalentes a las de una molécula diatómica, por lo tanto no poseen una banda de conducción que pueda ser excitada colectivamente.[105]

El estudio de agregados metálicos con pequeñas moléculas orgánicas en fase gaseosa proveen un modelo reduccionista para entender como la interacción entre los átomos metálicos con diferentes ligandos, modifica las propiedades químicas y fotofísicas de éstos en fase condensada.[106] En éste sentido, la vaporización láser acoplada a expansiones supersónicas provee una poderosa herramienta para producir dichos agregado. Además, las técnicas de espectroscopía láser empeladas en haces moleculares han demostrado ser útiles para estudiar a nivel molecular problemas de este tipo, donde la “matriz” o el “ambiente químico” modifican la respuesta espectroscópica de sistemas de interés.[106] A continuación, se describen brevemente algunos de los antecedentes más relevantes sobre la utilización de técnicas de espectroscopía láser acoplada a haces moleculares para el estudio de agregados metálicos:

- La espectroscopía del dímero  $\text{Ag}_2$  generado por vaporización láser ha sido estudiada mediante técnicas de fotoionización acoplada a haces moleculares, Demtroder y colaboradores encontraron que dicha especie presenta cuatro bandas de absorción, cuyos orígenes se encuentran a  $22988 \text{ cm}^{-1}$  (2,85 eV),  $35808 \text{ cm}^{-1}$  (4,44 eV),  $37593 \text{ cm}^{-1}$  (4,66 eV) y  $40160 \text{ cm}^{-1}$  (4,98 eV).[105]
- Posteriormente Duncan y colaboradores estudiaron el efecto de la interacción con gases nobles, en agregados del tipo del tipo  $[\text{Ag}_2\text{-Rg}]$  ( $\text{Rg} = \text{Ar}, \text{Kr}, \text{Xe}$ ), sobre la respuesta espectroscópica de la banda de absorción  $B \leftarrow X$  del dímero. Los resultados muestran un claro corrimiento del origen de la absorción a menores energías, siendo dicho corrimiento de  $480 \text{ cm}^{-1}$ ,  $810 \text{ cm}^{-1}$  y  $1527 \text{ cm}^{-1}$ , para Ar, Kr y Xe respectivamente, lo cual indica la importancia de las interacciones intermoleculares en la sintonización del espectro de excitación del dímero  $\text{Ag}_2$ .[107]
- La transición electrónica fundamental del átomo de Ag aislado  $4d^{10}5p^1 \ ^2P_{1/2} \leftarrow 4d^{10}5s^1 \ ^2S_{1/2}$  ocurre a una energía de  $29585 \text{ cm}^{-1}$  (3,67 eV).[108, 109] Contemporáneamente con los estudios sobre la espectroscopía del dímero  $\text{Ag}_2$  y sus agregados con gases nobles, Solgadi y colaboradores estudiaron el efecto de la interacción de Ag con  $\text{NH}_3$  sobre la excitación del átomo.[106] En este trabajo, los autores encontraron que la excitación  $A \leftarrow X$  del agregado  $\text{Ag-NH}_3$  se encuentra a  $21413 \text{ cm}^{-1}$ , corrida alrededor de  $8172 \text{ cm}^{-1}$  ( $\sim 1,01$  eV) respecto a la transición fundamental del átomo de Ag aislado,[106] lo que constituye otra clara evidencia de la gran importancia de las interacciones intermoleculares con el ambiente químico en la sintonización del espectro de excitación, en este caso del átomo de Ag.

En función de los antecedentes mencionados, el objetivo de éste capítulo fue estudiar la generación y espectroscopía de agregados del tipo  $[Ag_nMO_m]$  donde MO corresponde a una molécula orgánica.

En una primera instancia, se probó el funcionamiento del sistema experimental desarrollado en el CLCM descrito en los Capítulos 2 y 3, mediante el estudio de la generación de agregados moleculares del tipo tolueno  $(Tol)_n$  y  $[Ba_n(Tol)_m]$ . Los primeros son particularmente útiles para evaluar la capacidad de generar y detectar agregados por fotoionización, debido a que la energía de excitación de éstos es prácticamente invariable con  $n$ . Por otro lado, los agregados del tipo  $[Ba_n(Tol)_m]$  resultan útiles para el diagnóstico del funcionamiento del sistema de vaporización láser acoplado a expansiones supersónicas, debido a la experiencia del grupo en la vaporización láser de este metal.[110] Posteriormente se estudió la generación de agregados del tipo  $[Ag_nMO_m]$ , con MO = Tolueno (Tol), Piridina (Pyr) y Tirosina (Tyr). La razón por la cual se eligieron éstas MO no es caprichosa, el Tol se empleó debido a que, como se ya se mencionó, es la molécula empelada para los experimentos de diagnóstico del sistema experimental. La Pyr constituye una molécula de interés, no sólo debido a los antecedentes ya mencionados y por su conocida afinidad con la Ag, sino que además constituye un sistema modelo ampliamente utilizado de las bases pirimidínicas del ADN. La Tyr, es una molécula de particular importancia debido a que, es uno de los cromóforos de los polipéptidos y como se mencionó en párrafos anteriores, dichas biomoléculas también son empleadas en la síntesis de agregados de  $Ag_n$ .

## 4.2. Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con el equipamiento desarrollado en esta tesis, descrito en los Capítulos 2 y 3, respecto del estudio de las interacciones entre átomos y cationes metálicos con moléculas orgánicas. Cabe recalcar en este punto que, para simplificar la lectura, se eligió mostrar sólo aquellos resultados necesarios para sustentar la discusión del capítulo, lo que constituyen un breve resumen de los sistemas y condiciones experimentales explorados durante la tesis.

En la primer sección se presentan los resultados obtenidos por fotoionización de agregados neutros presentes en el haz molecular, mientras que en una segunda sección

se muestran los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas de sistemas generados en estado iónico por vaporización láser.

#### 4.2.1. Agregados Neutros

##### 4.2.1.1. Generación de agregados de moléculas orgánicas

En una primera instancia se probó la capacidad del sistema experimental para la generación de agregados moleculares. En la Figura 4.1 se muestran dos espectros de masas los cuales fueron obtenidos mediante la expansión supersónica de 5 bar de Ar, sembrado con tolueno (Tol) por arrastre del vapor de éste. Los agregados generados fueron ionizados en la zona de extracción del espectrómetro de masas con el cuarto armónico de un láser de Nd:YAG (4,66 eV).

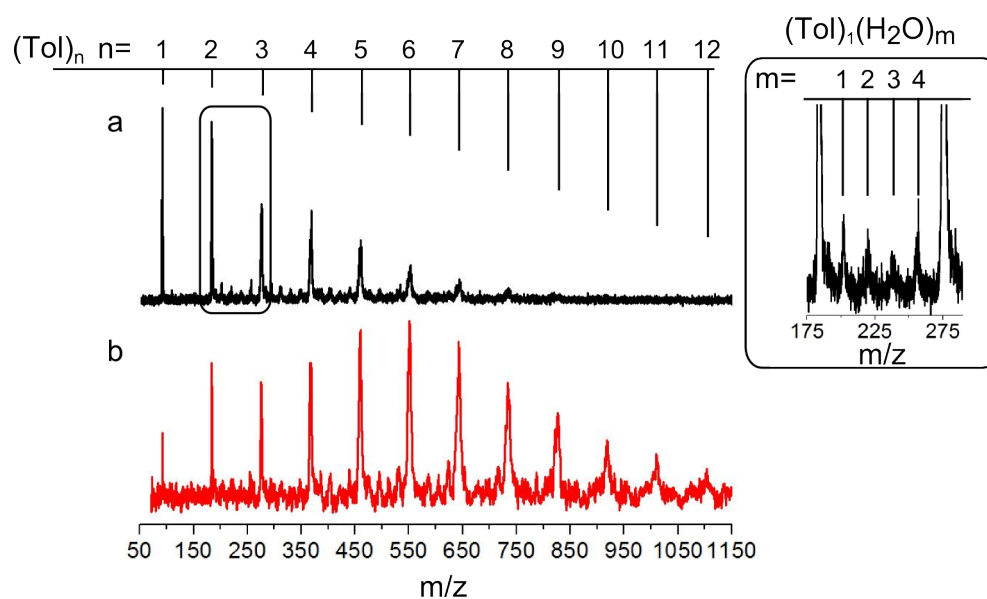


FIGURA 4.1: Generación de agregados moleculares de tolueno. Espectros de masas obtenidos mediante la expansión supersónica de 5 bar de Ar sembrado con vapor de Tol. Los agregados generados fueron ionizados en la zona de extracción del espectrómetro de masas mediante el cuarto armónico de un láser de Nd:YAG (4,66 eV). a) Potencial de deflexión de 70 V, b) potencial de deflexión 90 V. El recuadro del espectro (a) muestra la formación de aductos de solvatación.

En los espectros de masas mostrados en Figura 4.1(a y b) puede observarse la presencia de una amplia distribución de tamaños de agregados del tipo  $(Tol)_n$  y  $(Tol)_n(H_2O)_m$ . La distribución de tamaños observada puede modificarse variando el potencial de deflexión aplicado. En la Figura 4.1a el potencial de deflexión es de 70 V, en ésta condición

el tamaño máximo del agregado del tipo  $(\text{Tol})_n$  observado corresponde a  $n = 7$ , y el más abundante corresponde a la molécula de tolueno asilada. Por otro lado, en la Figura 4.1b el potencial de deflexión es de 90 V, en esta condición el tamaño máximo del agregado del tipo  $(\text{Tol})_n$  observado corresponde a  $n = 12$ , mientras que el agregado más abundante corresponde a  $n = 6$ . Por último, también se muestra una ampliación de la zona recuadrada del espectro de masas de la Figura 4.1a. En dicha ampliación, puede observarse que para cada  $n$  de los agregados del tipo  $(\text{Tol})_n$ , se forman aductos de solvatación con hasta cuatro moléculas de agua.

La generación y detección de agregados de diversos números de moléculas es un indicio de que, el enfriamiento vibracional logrado a partir de la expansión supersónica es efectivo, y que el espectrómetro de masas construido funciona correctamente en cuanto a la detección de iones en un rango amplio de  $m/z$ .

#### 4.2.1.2. Generación de agregados de átomos metálicos con moléculas orgánicas

El sistema  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$  se utilizó para probar la capacidad de formación y detección de agregados generados por la expansión supersónica de una molécula de interés, acoplada a vaporización láser.

En la Figura 4.2 se muestra un espectro de masas obtenido cuando una muestra de Ba metálico es vaporizada mediante el primer armónico de un láser de Nd:YAG (1,16 eV). Con el objetivo de formar agregados del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$ , la pluma de ablación es enfriada por una expansión supersónica de 3 bar de Ar, sembrado con vapor de Tol. Los agregados generados de esta forma fueron ionizados en la zona de extracción del espectrómetro de masas por irradiación mediante el cuarto armónico de un láser de Nd:YAG (4,66 eV). El potencial de deflexión aplicado fue de 90 V. El espectro de masas de la Figura 4.2 muestra que bajo las condiciones descritas, se obtiene una gran diversidad de agregados con diferentes estequiometrías ( $n : m$ ). En la misma figura puede observarse la presencia de dos progresiones de agregados que corresponde a la “solvatación” de uno y dos átomos de Ba con la molécula orgánica, éstas progresiones se demarcan con círculos azules y rojos respectivamente. En la progresión de agregados del tipo  $1 : m$ , el número máximo de moléculas de Tol encontradas es de 8, mientras que el agregado más abundante de la distribución corresponde al de estequiometría  $1 : 2$ .



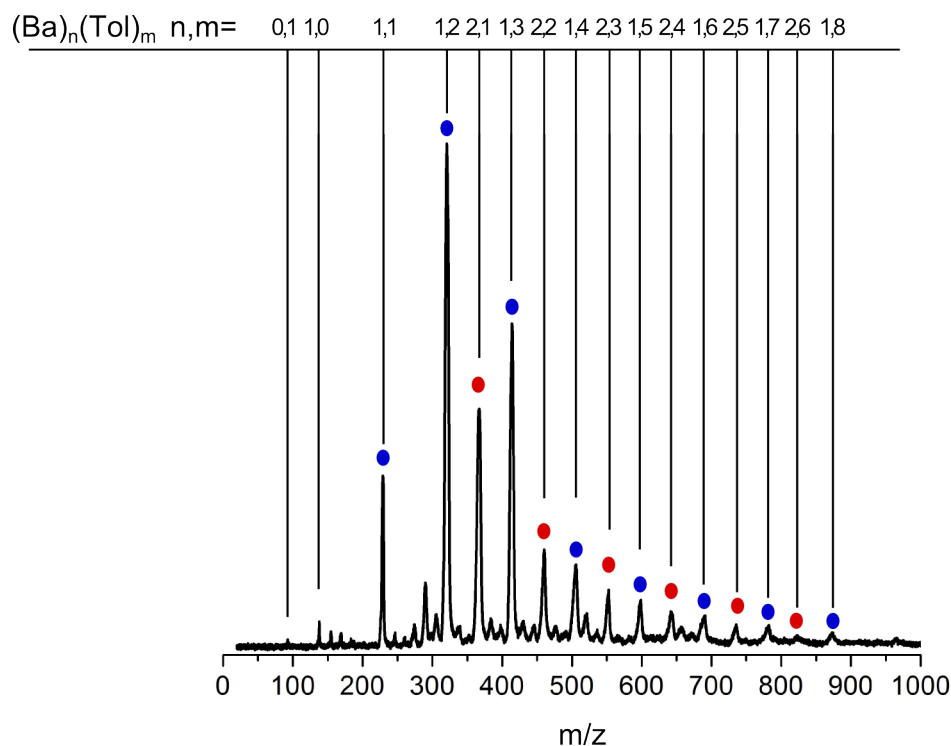


FIGURA 4.2: Generación de agregados moleculares del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$ . Espectro de masas obtenido acoplando la vaporización láser de una muestra de Ba sólido, con la expansión supersónica de 3 bar de Ar sembrado con vapor de Tol. La vaporización láser y la ionización se realizaron con el primer (1,16 eV) y cuarto (4,66 eV) armónico de láseres de Nd:YAG, respectivamente. En el espectro de masas se distinguen dos progresiones de agregados. Con círculos azules se destaca la progresión de los agregados del tipo 1 :  $m$ , mientras que con círculos rojos los agregados de estequiometría 2 :  $m$ .

Para la distribución del tipo 2 :  $m$ , el tamaño máximo del agregado corresponde a la solvatación con 6 moléculas de Tol, mientras que el agregado más abundante encontrado en éstas condiciones corresponde al de estequiometría 2 : 1.

Este resultado muestra que, el sistema experimental desarrollado en la tesis permite formar y detectar agregados de moléculas orgánicas con átomos metálicos producidos por vaporización láser, de forma eficiente.

En una tercer etapa se procedió a generar agregados del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{MOv})_m]$  (donde MOv corresponde a una molécula orgánica volátil), realizando los experimentos en condiciones similares a las descritas en el párrafo anterior para el caso de Ba. El espectro de masas mostrado en la Figura 4.3a se obtuvo mediante la vaporización láser de una muestra de Ag metálica, mientras que los espectros de masas mostrados en las Figuras 4.3(b y c) se obtuvieron por la vaporización láser de una pastilla de  $\text{AgNO}_3$  dispersado

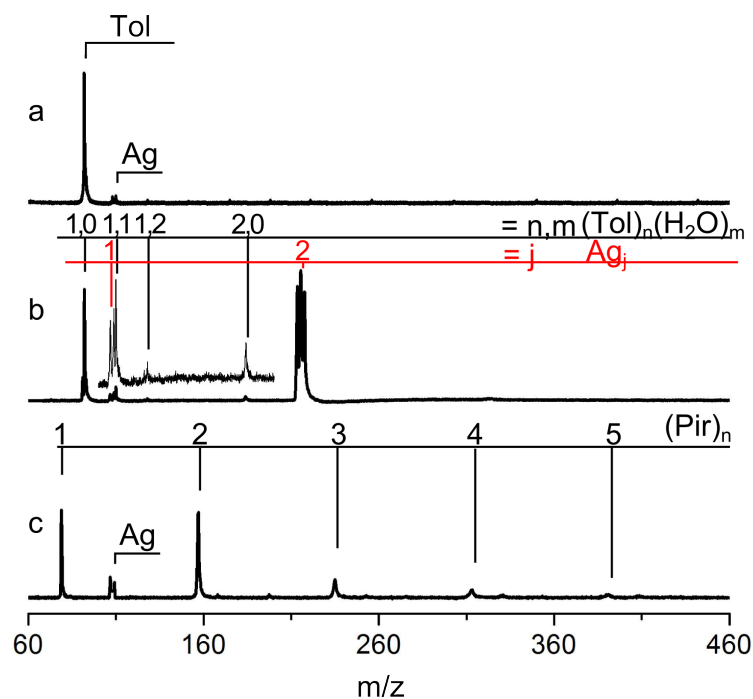


FIGURA 4.3: Generación de agregados moleculares del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{MOv})_m]$ , a) vaporización láser de una muestra metálica de Ag, acoplada a la expansión supersónica de 3 bar de Ar sembrada con vapor de Tol, b) vaporización láser de una pastilla de  $\text{AgNO}_3$  dispersado en carbono grafito y prensado a 5 bar, acoplada a la expansión supersónica 3 bar de Ar sembrada con vapor de Tol, c) vaporización láser de una pastilla de  $\text{AgNO}_3$  dispersado en carbono grafito y prensado a 5 bar, acoplada a la expansión supersónica de 3 bar de Ar sembrada con vapor de Pyr. En todos los caso para la vaporización e ionización se emplearon respectivamente el primer (1,16 eV) y cuarto (4,66 eV) armónico de láseres de Nd:YAG, y potencial de deflexión de 90 V.

en carbono grafito y prensado a 5 bar. La expansión supersónica empleada en la adquisición de los espectros de las Figuras 4.3(a y b), se realizó en idénticas condiciones a la utilizada para generar los agregados del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$ . Por otro lado, en el espectro de masas mostrado en la Figura 4.3c la expansión supersónica se sembró con piridina (Pyr), para probar el efecto del cambio de la molécula orgánica. En los tres casos, para la vaporización e ionización se emplearon respectivamente el primer y cuarto armónico de láseres de Nd:YAG, y potenciales de deflexión de 90 V. Cabe recalcar en éste punto que, los espectros de masas mostrados en la Figura 4.3 corresponden a un breve resumen, representativo de los resultados obtenidos modificando diversas variables experimentales. Además se realizaron experimentos a diferentes longitudes de onda de vaporización (3,49 eV, 2,33 eV), y en todos los casos se evaluó el efecto de la variación de la sincronización de los distintos eventos del experimento. El retardo del disparo del láser de vaporización se varió en el intervalo comprendido entre 300  $\mu\text{s}$  y 450  $\mu\text{s}$ , y el del láser de ionización en el intervalo comprendido entre 450  $\mu\text{s}$  y 600  $\mu\text{s}$ , en ambos casos respecto al disparo de

la válvula pulsada. Ninguna modificación en las variables experimentales mencionadas produjo cambios significativos en los resultados respecto a los expuestos en la Figura 4.3.

El espectro de masas de la Figura 4.3a indica que a partir de la vaporización láser de la muestra metálica, se observa la presencia del monómero de Tol y del átomo de plata, pero no agregados del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{Tol})_m]$ . En el caso del espectro de masas de la Figura 4.3b, se observa la presencia del monómero de Tol, sus agregados de solvatación y el dímero  $(\text{Tol})_2$ . Por otro lado, también se observa la presencia del átomo y el dímero de plata, pero no se encuentra señal de iones a las relaciones  $m/z$  correspondientes a agregados formados entre el metal y la molécula orgánica como  $[\text{Ag}_1(\text{Tol})_1]$ ,  $[\text{Ag}_2(\text{Tol})_1]$  o  $[\text{Ag}_1(\text{Tol})_2]$ . Finalmente en la Figura 4.3c, se observa la presencia del átomo de plata y la generación de agregados de hasta 5 moléculas de Pyr, pero no se observa la presencia de ningún agregados del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{Pyr})_m]$ .

Debido a que los intentos por obtener agregados del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{MOv})_m]$  resultaron infructuosos, se intentó obtener agregados de plata con moléculas orgánicas no volátiles, que se desorben con la Ag a partir de la vaporización láser de una muestra sólida. Para ello se utilizó tirosina (Tyr) como molécula orgánica, y se prepararon pastillas de  $\text{AgNO}_3:\text{Tyr}$  en relación 1:1, dispersados en matriz de carbono grafito ó polvo de cinc, el cual también ha sido propuesto como una buena matriz para la desorción láser. En la Figura 4.4 se resume de manera representativa los resultados obtenidos mediante la modificación de diversas variables experimentales, entre las que se encuentran, la presión y naturaleza del gas “carrier” (o gas transportador), la matriz utilizada para la fabricación de las pastillas y la longitud de onda de ionización. Por simplicidad, las condiciones bajo las que se obtuvieron cada espectro de masas se encuentran resumidas en la Tabla 4.1.

TABLA 4.1: Condiciones experimentales empleadas para la obtención de los espectros de masas mostrados en la Figura 4.4. La excitación a  $35651\text{ cm}^{-1}$  (4,42 eV) es resonante con la transición electrónica fundamental de uno de los rotameros de la Tyr,[111] mientras que la excitación a  $35808\text{ cm}^{-1}$  (4,44 eV) es resonante con la transición electrónica fundamental  $B \leftarrow X$  del dímero  $\text{Ag}_2$ . [105] Las matrices empleadas para la fabricación de las pastillas fueron carbono grafito ( $\text{C}_{(\text{gr})}$ ) y Zinc en polvo (Zn)

Espectro	Pastilla	Gas "carrier"	P	$\lambda$ Ionización
a	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) $\text{C}_{(\text{gr})}$	Ar	1 bar	$35663\text{ cm}^{-1}$ (4,42 eV)
b	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) $\text{C}_{(\text{gr})}$	Ar	3 bar	$35663\text{ cm}^{-1}$ (4,42 eV)
c	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) $\text{C}_{(\text{gr})}$	Ar	6 bar	$35663\text{ cm}^{-1}$ (4,42 eV)
d	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) $\text{C}_{(\text{gr})}$	He	6 bar	$35663\text{ cm}^{-1}$ (4,42 eV)
e	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) Zn	Ar	6 bar	$35663\text{ cm}^{-1}$ (4,42 eV)
f	$\text{AgNO}_3 + \text{Tyr}$ (1:1) $\text{C}_{(\text{gr})}$	Ar	6 bar	$35808\text{ cm}^{-1}$ (4,44 eV)

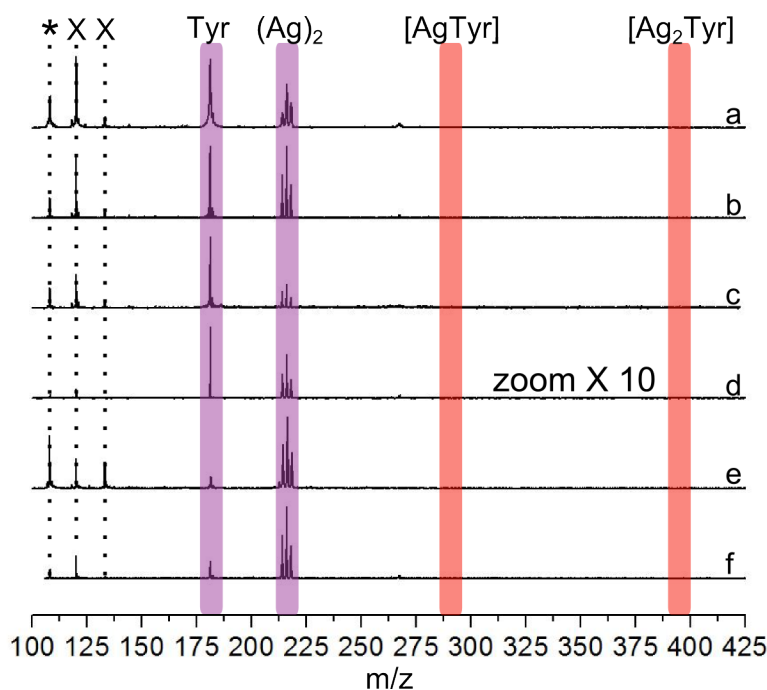


FIGURA 4.4: Espectros de masas resultantes de la ablación a 1.16 eV de una mezcla de  $\text{AgNO}_3:\text{Tyr}$  (1:1) en distintas matrices y acoplada a una expansión supersónica, bajo distintas condiciones, las cuales se detallan en la Tabla 4.1

En todos los casos, para la vaporización láser se empleó el primer armónico de un láser de Nd:YAG (1,16 eV), mientras que la ionización se llevó a cabo con el segundo armónico de la radiación emitida por un láser de colorantes que funciona con Rodamina

590, y es bombeado por el segundo armónico de un láser de Nd:YAG (2,33 eV). Además de los resultados obtenidos en las condiciones aquí mostradas, se realizaron experimentos a diferentes longitudes de onda de vaporización (3,49 eV, 2,33 eV) y variando la composición relativa entre  $\text{AgNO}_3$  y Tyr. En todos los casos se evaluó el efecto de la modificación de la sincronización de los distintos eventos del experimento. El retardo del disparo del láser de vaporización se varió en el intervalo comprendido entre 300  $\mu\text{s}$  y 450  $\mu\text{s}$ , y el de ionización en el intervalo comprendido entre 450  $\mu\text{s}$  y 600  $\mu\text{s}$ , en ambos casos respecto al disparo de la válvula pulsada. Ninguna de las modificaciones en las variables experimentales mencionadas produjo cambios significativos en los resultados respecto a los expuestos en la Figura 4.4.

En la Figura 4.4 se muestra que para todas las condiciones experimentales exploradas se observa la presencia de la molécula de Tyr y del dímero  $\text{Ag}_2$  en el haz molecular, ambos se remarcan en violeta. Demarcado con (X) se distingue la presencia de los iones con  $m/z = 120$  y  $133$  que se producen por la fragmentación de Tyr en el proceso de vaporización.[111] Con (\*) se indica la presencia de la  $m/z = 108$ , correspondiente al cresol que es un contaminante presente en la cámara de vacío y que absorbe fuertemente en la región espectral cercana a los  $35714 \text{ cm}^{-1}$  (4.42 eV). Finalmente, en rojo se destacan las relaciones  $m/z$  a las que se espera encontrar agregados del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{Tyr})_m]$  con estequiometrías  $1 : 1$  y  $2 : 1$ . Puede observarse que bajo ninguna condición experimental se logró detectar dicho tipo de agregados. El aumento de la presión de Ar de 1 bar (a) a 3 bar (b) y 6 bar (c) disminuye el contenido de fragmentos provenientes de la Tyr (X), debido a que, al aumentar la presión del gas “carrier” aumenta el grado de enfriamiento adiabático y previene la fragmentación térmica de la molécula. El uso de He (d) como gas transportador también fue explorado y mostró un buen grado de enfriamiento a 6 bar, pero la eficiencia del arrastre de las especies obtenido con este gas fue mucho menor. Claramente el uso de Zn (e) como matriz no es apropiado para este tipo de sistemas ya que el alto coeficiente de transmisión térmica de este material produce un gran calentamiento de la muestra durante el proceso de vaporización e induce la fragmentación casi completa de la Tyr. Finalmente la comparación de los espectros (c) y (f) permite observar el efecto de la ionización resonante de la Tyr y  $\text{Ag}_2$  respectivamente

Además de los espectros de masas, durante la exploración de las variables experimentales anteriormente mencionadas, también se registraron los espectros REMPI del dímero  $\text{Ag}_2$  y de la Tyr. En la Figura 4.5a se muestra en línea negra una ampliación del

espectro el espectro de masas de la Figura 4.4c donde la longitud de onda de ionización es resonante con la transición fundamental de uno de los rotámeros de la Tyr  $35651\text{ cm}^{-1}$  ( $4,42\text{ eV}$ ),[111] mientras que en línea roja se muestra una ampliación del espectro de masas de la Figura 4.4f obtenido cuando la longitud de onda de ionización es resonante con la transición fundamental del dímero de plata ( $\text{Ag}^{107}\text{-Ag}^{109}$ )  $35808\text{ cm}^{-1}$  ( $4,44\text{ eV}$ ).[105] En esta figura puede observarse claramente que la intensidad relativa de ambos iones se

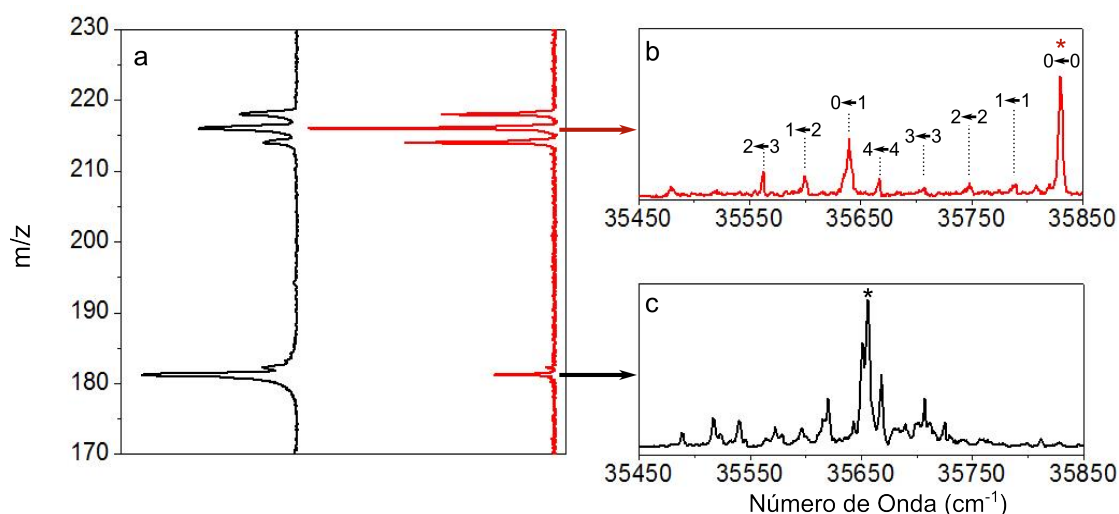


FIGURA 4.5: a) Espectros de masas obtenidos cuando la ionización es resonante con uno de los rotámeros de la Tyr  $35651\text{ cm}^{-1}$  ( $4,42\text{ eV}$ ) (negro) y el dímero  $\text{Ag}_2$   $35808\text{ cm}^{-1}$  ( $4,44\text{ eV}$ ) (rojo). b) espectro REMPI del dímero  $\text{Ag}_2$  ( $\text{Ag}^{107}\text{-Ag}^{109}$ ), en el que se observa la transición fundamental  $B \leftarrow X$  y una serie de bandas que aparecen a menores energías, las cuales corresponden a excitaciones desde estados vibracionales excitados del estado electrónico fundamental. c) Espectro REMPI de la Tyr en la región del espectro donde se espera que absorban los diferentes rotámeros presentes en el haz molecular. En las figuras b) y c), además se marca con \* la energía de excitación empleada para obtener los espectros de masas.

modifica, siendo mayor la del ión formado por la excitación resonante. Este resultado es un indicio de que el haz molecular se encuentra frío vibracionalmente. En la Figura 4.5(b) y c) se muestran los espectros REMPI obtenidos integrando las masas correspondientes al dímero de plata  $\text{Ag}_2$  ( $\text{Ag}^{107}\text{-Ag}^{109}$ ) y a la Tyr, en la región comprendida entre los  $35450\text{ cm}^{-1}$  ( $4,39\text{ eV}$ ) y  $35850\text{ cm}^{-1}$  ( $4,44\text{ eV}$ ). Para la Tyr, se observan una serie de transiciones que corresponden a las excitaciones fundamentales de los distintos rotámeros de la molécula, las cuales han sido asignadas por deVries y colaboradores.[111] Para el caso del dímero de plata, se observa la transición fundamental al segundo estado electrónico excitado, junto con una serie de bandas que aparecen a menores energías, las cuales corresponden a excitaciones desde estados vibracionales excitados del estado electrónico

fundamental. Dichas transiciones se encuentran asignadas en el espectro. Ambos espectros REMPI mostrados en la Figura 4.5 presentan una buena relación señal ruido y las bandas de absorción observadas tiene anchos espectrales estrechos de alrededor de  $\sim 4$   $\text{cm}^{-1}$ , lo que corresponde a una temperatura rotacional comprendida entre 4 K y 10 K en el haz molecular.

### 4.2.2. Agregados iónicos

La descripción detallada del esquema experimental empleado para la detección de especies iónicas generadas por vaporización láser se encuentra en el Capítulo 3. Brevemente, a diferencia de la detección de agregados neutros, en los experimentos aquí descritos, se detectaron los agregados iónicos generados mediante el acoplamiento de la expansión supersónica con la vaporización láser. Por lo que no es necesario una etapa de ionización en la zona de extracción del espectrómetro.

#### 4.2.2.1. Generación de agregados de cationes metálicos con moléculas orgánicas

De igual manera que en los experimentos descritos en la sección anterior, se realizó la vaporización de una pastilla de  $\text{AgNO}_3$  dispersado en carbono grafito y prensado a 5 bar, con el primer armónico (1,16 eV) de un láser de Nd:YAG. La pluma de ablación fue acoplada a una expansión supersónica de 3 bar de Ar sembrada con vapor de Tol o Pyr. En la Figura 4.6(a y b) se muestran los espectros de masas de las especies iónicas generadas durante el proceso de ablación y expansión.

En la Figura 4.6a se observa que cuando la expansión es sembrada con Tol, se producen agregados del tipo  $[\text{Ag}_1(\text{Tol})_j]^+$  con  $j = 1$  y  $2$ . Además de dichos agregados, en el espectro de masas se detecta la presencia de aductos de solvatación del catión  $\text{Ag}^+$  con hasta tres moléculas de agua, y la solvatación con una molécula de agua del agregado  $[\text{Ag}_1(\text{MOv})_1]^+$ . Por otro lado, en la Figura 4.6b se muestra un espectro de masas obtenido cuando la expansión supersónica es sembrada con Pyr, en el cual se observa la presencia del catión  $\text{Ag}^+$ , y agregados del tipo  $[\text{Ag}_1(\text{Pyr})_m]^+$  con hasta tres moléculas de Pyr, siendo el agregado con estequiometría 1 : 1 el más abundante en el haz molecular.

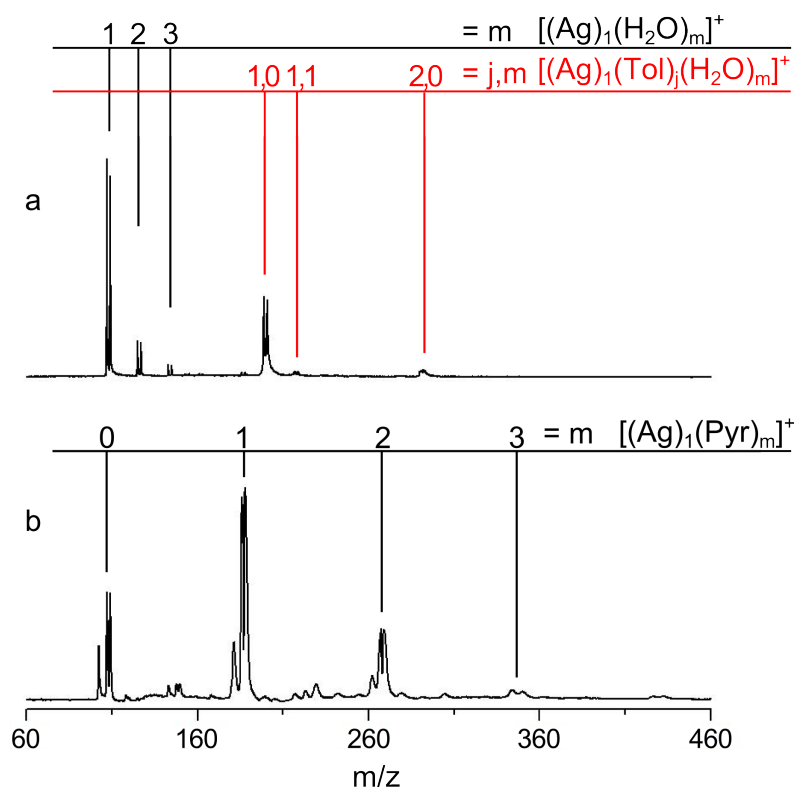


FIGURA 4.6: Generación de agregados moleculares del tipo  $[Ag_n(MO)_m]^+$ . a) Expansión supersónica sembrada con Tol, b) expansión supersónica sembrada con Pyr. En ambos casos la vaporización láser se realizó mediante la irradiación con el primer armónico de un láser de Nd:YAG, sobre una muestra sólida de  $AgNO_3$  dispersado en carbono grafito y prensada a 5 bar.

Los resultados expuestos en esta sección son marcadamente diferentes a los obtenidos por fotoionización de agregados neutros. Como se mostró en la Sección 4.2.1.2, no se logró observar ningún tipo de agregado neutro del átomo de Ag con moléculas orgánicas. Mientras que por otro lado, como se observa en la Figura 4.6, la generación y detección de agregados iónicos del catión  $Ag^+$  con moléculas orgánicas se llevó a cabo con éxito.

### 4.3. Análisis y Discusión

De los resultados presentados en la Sección 4.2 surgen dos puntos a analizar. Por un lado, en cuanto a los resultados obtenidos por fotoionización de agregados neutros,



Sección 4.2.1.2, el hecho más importante a destacar es la marcada diferencia observada al intentar obtener agregados neutros con Ba o Ag. Para el caso del Ba, la generación y detección de agregados moleculares del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$  no reviste mayor dificultad. En contraposición, en el caso del átomo de Ag, más allá de haber explorado una gran diversidad de variables experimentales, en ningún momento se logró detectar agregados entre éste y las moléculas orgánicas empleadas para tal fin. El segundo punto a destacar surge de la comparación de los resultados mostrados en las Secciones 4.2.1.2 y 4.2.2.1. Esta comparación establece que, si bien no se logró detectar agregado neutros de Ag con moléculas orgánicas, fue posible obtener agregados en estado iónico del tipo  $[\text{Ag}_n(\text{Tol})_m]^+$  y  $[(\text{Ag})_n(\text{Pyr})_m]^+$ . Las causas que originan éstas diferencias no resultan evidentes, algunas hipótesis que se podrían plantear para racionalizar los resultados obtenidos son:

- La existencia de problemas en el sistema de generación, detección de agregados, o enfriamiento poco eficiente.
- Baja afinidad entre el átomo de Ag en el estado neutro con las moléculas empleadas para generar los agregados.
- Los agregados de Ag con moléculas aromáticas si se producen, pero sus propiedades espectroscópicas imposibilitan su detección mediante fotoionización.

Los resultados mostrados en la Sección 4.2.1 permiten descartar la primera hipótesis. En la Figura 4.1, se observa que bajo las condiciones experimentales descritas es posible generar agregados moleculares del tipo  $(\text{Tol})_n$  con hasta 12 moléculas de Tol, lo que constituye una fuerte evidencia de que el sistema diseñado y construido durante el desarrollo de ésta tesis, funciona exitosamente en lo que respecta a la generación de agregados moleculares mediante expansiones supersónicas y detección por fotoionización acoplada a espectrometría de masas.

Más aún, los resultados mostrados en la Figura 4.2 muestran que el acoplamiento entre la expansión supersónica y la vaporización láser funciona, en el sentido de que el enfriamiento producido por la expansión es suficiente para generar agregados entre moléculas orgánicas sembradas en la expansión supersónica y átomos metálicos producidos por la vaporización. Podría sugerirse que, el hecho de que el sistema de enfriamiento a través de la expansión supersónica sea eficiente para la generación de agregados del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$ , no es una evidencia directa de que también lo sea cuando se lleva a cabo

la vaporización láser de muestras de Ag o  $\text{AgNO}_3$ . Sin embargo, los espectros REMPI mostrados en la Figura 4.5(b y c) apuntan en la dirección opuesta. Ambos espectros presentan una buena relación señal/ruido y transiciones estrechas de alrededor de  $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$ , lo que indica que tanto el dímero de  $\text{Ag}_2$  como la Tyr se obtienen fríos. En la Figura 4.7 se muestra a modo de comparación, en negro, el espectro REMPI de la Tyr ya mostrado en la Figura 4.5c, y en rojo el obtenido por deVries y colaboradores para la misma molécula.[111] En ésta puede observarse un excelente acuerdo entre ambos

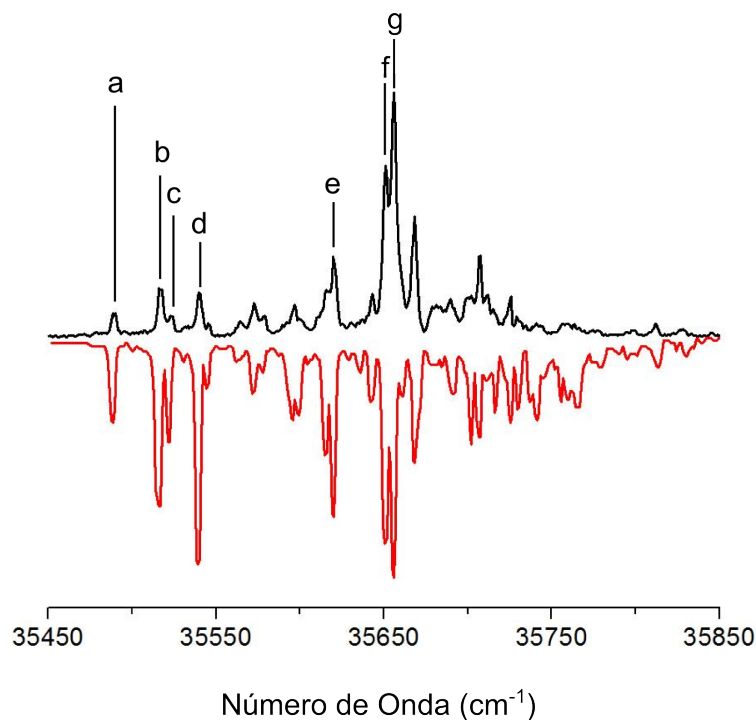


FIGURA 4.7: En negro espectro REMPI de la Tyr mostrado en la Figura 4.5c, en rojo el espectro de la misma molécula publicado en la cita [111]. Las letras (a-g) indican el origen de la transición electrónica de los diferentes rotámeros asignados en la misma publicación.

espectros. Cabe recalcar que las transiciones observadas en la zona espectral explorada, corresponde al origen de las transiciones electrónicas de diferentes rotámeros de la molécula, distinguidos por los autores con las letras (a-g),[111] por lo que la diferencia de las intensidades relativas de las bandas indica que la distribución poblacional de dichos rotámeros es diferente. Sin embargo, la excelente resolución espectral obtenida, permite descartar la posibilidad de que la temperatura del haz molecular sea elevada.

En cuanto a la segunda hipótesis planteada, se realizaron cálculos computacionales a nivel DFT/b3lyp con el programa Gaussian 09 [112] para evaluar la posibilidad de que las diferencias encontradas en el comportamiento del Ba, Ag y el catión  $\text{Ag}^+$  se deba a la

energía de interacción entre dichas especies y la molécula orgánica utilizada para generar los agregados. En la Figura 4.8 se resumen de forma esquemática los resultados obtenidos para las energías de la interacción de Ba, Ag, Ba<sup>+</sup> y Ag<sup>+</sup> con el Tol. En esta Figura se detallan los potenciales de ionización verticales (Ip<sub>vert</sub>) y adiabáticos (Ip<sub>ad</sub>) para las especies con Ba y Ag, y la energía de disociación de los agregados neutros e iónicos (d<sub>0</sub>). Puede observarse que para ambas especies metálicas, la energía de interacción con el Tol en el estado neutro es considerablemente más baja que en el estado iónico, siendo 0,25 eV y 1,87 eV para Ag y Ag<sup>+</sup> y 0,19 eV y 1,56 para Ba y Ba<sup>+</sup>, respectivamente. A la luz de éstos resultados podría esperarse que, el hecho de observar los agregados iónicos de Ag<sup>+</sup> y no los agregados neutros de Ag, se deba a la gran diferencia en sus energías de enlace. Sin embargo, es posible observar los agregados de Tol con Ba neutro, cuya energía de interacción es similar a la correspondiente energía de interacción de Ag con Tol. Si bien estos resultados no permiten descartar por completo la segunda hipótesis, es de esperar que los agregados neutros de Ag se formen de igual manera que los correspondientes agregados de Ba y que la diferencia observada se deba a diferentes mecanismos involucrados en el proceso de fotoionización-detección, como se planteó en la tercera hipótesis.

De la Figura 4.8 se observa una gran diferencia entre las energías de ionización, tanto verticales como adiabáticas, de los agregados [(Ba)<sub>1</sub>(Tol)<sub>1</sub>] y [(Ag)<sub>1</sub>(Tol)<sub>1</sub>]. En el caso del primero, tanto el Ip<sub>vert</sub> como el Ip<sub>ad</sub>, se encuentran por debajo de la energía del fotón de ionización de 4,66 eV (37594 cm<sup>-1</sup>), por lo cual es posible ionizar el complejo mediante la absorción de un único fotón, sin la necesidad de acceder a estados electrónicos excitado intermedios. Por el contrario, tanto el Ip<sub>vert</sub> como el Ip<sub>ad</sub> del agregado [(Ag)<sub>1</sub>(Tol)<sub>1</sub>] se encuentran por encima de la energía del fotón de ionización, lo cual requiere la absorción de al menos dos fotones de 4,66 eV para alcanzar el estado iónico. Esto implica que la absorción del primer fotón promueva al agregado a un estado electrónico excitado intermedio, cuyo tiempo de vida debe ser lo suficientemente largo como para permitir la absorción del segundo fotón. Este tiempo de vida largo está asociado al ancho temporal del pulso del láser utilizado. En el caso de láseres con pulsos de ns, como los utilizados en este trabajo, este tiempo de vida no debe ser inferior a 0,5 ns, lo que requiere que la desactivación no-radiativa del estado excitado sea despreciable.

En tal sentido, se calcularon las energías de excitación verticales de los cuatro primeros estados electrónicos excitados singletes, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub>, a nivel de teoría RI-ADC(2)

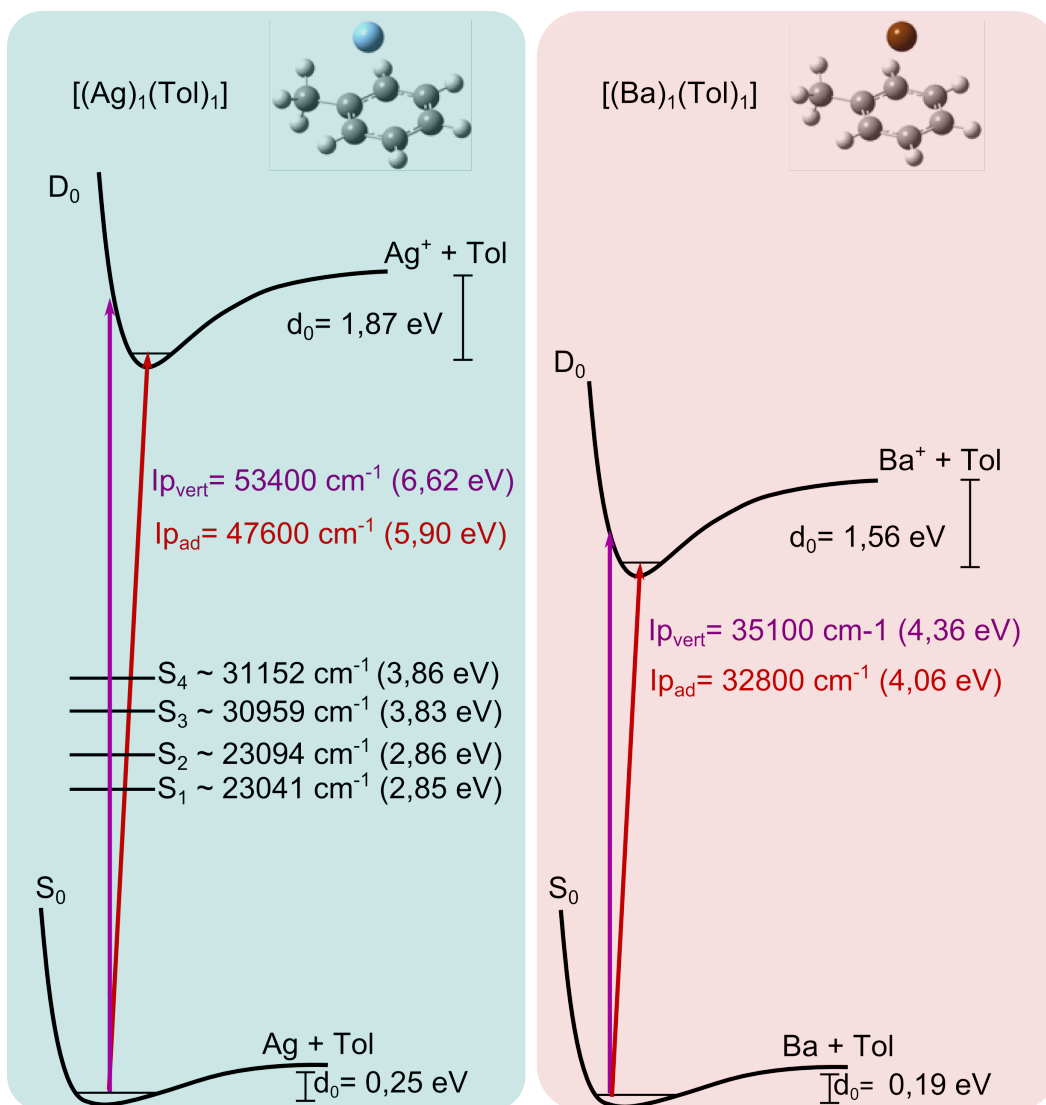


FIGURA 4.8: Interacción  $Ag \cdots Tol$  y  $Ba \cdots Tol$ .  $S_0$  y  $D_0$  corresponden a los estados electrónicos fundamentales neutros e iónicos.  $d_0$  corresponden a las energías de disociación de cada agregado en el estado neutro e iónico. Además se muestran las potenciales de ionización ( $I_p$ ) vertical  $I_{p_{vert}}$  y adiabático  $I_{p_{ad}}$ . Los estado  $S_{1-4}$  son los primeros 4 estados electrónicos siglete del agregado  $[(Ag)_1(Tol)_1]$ . Las simulaciones de los estado electrónicos fundamentales neutros e iónicos se realizaron al nivel de teoría DFT/b3lyp utilizando para los átomos C y H las bases 6-311G++(d,p) y para los metales Ag,  $Ag^+$ , Ba y  $Ba^+$  el pseudopotencial SDD más su base correspondiente incorporados en el paquete de cálculo GAUSSIAN 09; y [112] posteriormente re-evaluados al nivel MP2/cc-VDZ con el paquete de cálculo Turbomole.[113] Las simulaciones de los estados electrónicos excitados se realizaron al nivel de teoría RI-ADC(2)/cc-VDZ con el paquete de cálculo Turbomole.[113].

con el programa Turbomole,[113] lo cuales también se muestran en la Figura 4.8 de manera esquemática.

Claramente se observa que las energías de las transiciones a los estados  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  son menores en energía que la correspondientes transiciones fundamentales del átomo de plata  $4d^{10}5p^1 \ ^2P_{1/2} \leftarrow 4d^{10}5s^1 \ ^2S_{1/2}$  ( $29585 \text{ cm}^{-1}$ ,  $3,66 \text{ eV}$ ) y al primer estado electrónico de Tol,  $37594 \text{ cm}^{-1}$  ( $4,66 \text{ eV}$ ). Esto es debido a la presencia de la molécula aromática que posee orbitales moleculares cercanos en energía a los del átomo de Ag, que conducen a la existencia de estados de transferencia de carga a bajas energías de excitación. Por lo cual, a las energías de excitación del fotón de  $4,66 \text{ eV}$  ( $37594 \text{ cm}^{-1}$ ) se espera una gran congestión de estados excitados, los cuales pueden interactuar entre ellos para conducir a procesos de desactivación no-radiativa ultra-rápidos, dando lugar a un tiempo de vida del estado excitado intermedio muy corto como para permitir la absorción del segundo fotón de manera eficiente. Como consecuencia, independientemente de que el agregado neutro se haya formado, no es posible detectarlo con este esquema experimental.

El experimento óptimo sería usar el estado  $S_1$  como intermediario, sin embargo en el laboratorio no se encuentra disponible la emisión láser en torno a los  $25000 \text{ cm}^{-1}$ .

Estos resultados son una muestra de la importancia de las interacciones intermoleculares en la sintonización de los espectros de excitación de los agregados metálicos con moléculas orgánicas aromáticas.

#### 4.4. Conclusiones

Durante el desarrollo de este capítulo se estudió la interacción de moléculas orgánicas con átomos y cationes metálicos. En una primera instancia, se probó el funcionamiento del sistema experimental desarrollado durante esta tesis, en cuanto a su capacidad de generar agregados moleculares, de moléculas aromáticas volátiles (MOv) a partir de expansiones supersónicas, o expansiones supersónicas acopladas a vaporización láser de metales y MOv.

Los resultados obtenidos en cuanto a la generación de agregados por la expansión supersónica de MOv muestran que es posible generar agregados del tipo  $(\text{Tol})_n$  con

$n=1-12$ , lo que constituye una fuerte evidencia de que el sistema diseñado y construido funciona exitosamente en lo que respecta a la generación de agregados moleculares mediante expansiones supersónicas y detección por fotoionización acoplada a espectrometría de masas. Posteriormente, los experimentos realizados acoplando la expansión supersónica sembrada con Tol junto con la vaporización láser de Ba metálico, muestran que dicho acoplamiento funciona existosamente, en el sentido de que el enfriamiento producido por la expansión es suficiente para enfriar colisionalmente el producto de la vaporización y generar agregados entre moléculas orgánicas sembradas en la expansión y átomos metálicos producidos por la vaporización.

Más allá de que el sistema experimental parece funcionar correctamente para la generación de agregados del tipo  $[\text{Ba}_n(\text{Tol})_m]$ , no se logró obtener agregados del átomo de Ag o  $\text{Ag}_n$  con moléculas orgánicas, a pesar de haber explorado una gran variedad de variables experimentales como el sustrato empleado para la vaporización, la molécula orgánica empleada para generar los agregados, la naturaleza y presión del gas “carrier”, la longitud de onda de la radiación empleada para la vaporización e ionización, y la sincronización del experimento. De manera notable, la generación y detección de agregados del catión  $\text{Ag}^+$  con Tol y Pyr generados en estado iónico a partir de la vaporización láser no revistió mayor dificultad.

La discusión llevada a cabo acerca de la naturaleza de la interacción de Ba,  $\text{Ba}^+$ , Ag y  $\text{Ag}^+$  con el Tol parecen indicar que las diferencias observadas en el comportamiento de estas especies no se debe a la energía de interacción o a la estabilidad de los agregados en el estado neutro, sino a la eficiencia de detección de los agregados neutros por medio del esquema de fotoionización utilizado.

En el caso de los agregados de MOv con Ba, la energía de ionización de los mismos se encuentra por debajo de la energía del fotón de ionización de 4,66 eV ( $I_{\text{p}_{\text{vert}}}= 4,36$  eV,  $I_{\text{p}_{\text{ad}}}=4,06$  eV), lo cual posibilita su ionización por absorción de un solo fotón. Por el contrario, los agregados con Ag poseen un potencial de ionización de mayor energía que la del fotón, lo cual hace necesaria la absorción de dos fotones de 4,66 eV, utilizando un estado electrónico excitado intermediario para la absorción del segundo fotón. Los cálculos teóricos muestran que a la energía de excitación del primer fotón debe existir una gran congestión de estados electrónicos excitados que pueden inducir procesos de desactivación no-radiativa del estado electrónico intermediario, conduciendo a un tiempo

de vida muy corto para dicho estado, lo que imposibilita la absorción eficiente del segundo fotón, cuando se utilizan láseres con pulsos de nanosegundos. Por lo tanto, el proceso de ionización necesario para la detección de los agregados neutros, no se lleva a cabo independientemente de que los mismos hayan sido generados.

Éstos resultados son una muestra de la importancia de las interacciones intermoleculares en la sintonización de los espectros de excitación de los agregados metálicos con moléculas orgánicas, debido a que la interacción  $\text{Ag} \cdots \text{Tol}$  modifica en gran medida la energía de excitación del agregado en comparación del átomo de Ag y Tol por separados.

La imposibilidad de detectar agregados de Ag neutros por fotoionización marcó un punto de inflexión en el desarrollo de este trabajo de tesis, y significó un vuelco hacia el estudio de agregados catiónicos, los cuales se detallan los Capítulos 5 y 6.





## Capítulo 5

# Interacción de Bases del ADN/ARN con Protón

---

## 5.1. Introducción

En una primera instancia se estudió la espectroscopía de sistemas protonados, por dos razones principales. Por un lado, y desde un punto de vista experimental, la gran versatilidad de las fuentes de electrospray para la generación de agregados protonados era un punto de partida alentador para el estudio de la interacción de las bases del ADN/ARN con cationes. Si bien, como se verá a continuación, los antecedentes bibliográficos respecto al estudio de la espectroscopía electrónica de dichos sistemas al momento de realizar esta tesis era casi nula, se contaba con cierta información bibliográfica de espectroscopía de DMIR que daba cuenta de los tautómeros de las bases pirimidínicas protonadas que se generan en fase gaseosa mediante electrospray. Por otro lado, estudiar la espectroscopía de los sistemas protonados, sentaría una base para establecer por comparación el efecto de la sustitución del protón por un catión metálico.

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos acerca de la espectroscopía de bases de ADN/ARN protonados y homodímeros protonados de las tres bases pirimidínicas, obtenidos mediante espectroscopía de fragmentación UV de iones fríos y cálculos de estructura electrónica.

### 5.1.1. Nota sobre la nomenclatura empleada para los sistemas protonados

Las bases del ADN/ARN son moléculas complejas desde el punto de vista estructural, debido a que pueden existir en diversos estados tautoméricos, sumado al hecho de que poseen varios grupos funcionales. Por estos motivos, los cationes pueden interactuar con las nucleobases en más de un sitio. Es por ésto que, es necesario definir una nomenclatura sistemática lo suficientemente explícita, que facilite la interpretación de la estructura molecular a partir del nombre asignado sin ambigüedades.

En el caso de los monómeros protonados de las bases pirimidínicas, las diferentes estructuras obtenidas son nombradas según la tautomería de la molécula luego de la protonación. Se utilizan las letras A, E, K, I, para dar cuenta de los grupos funcionales amino, enol, ceto e imino, respectivamente. Por ejemplo, el nombre EA<sup>+</sup> de la citosina, indica que la protonación conlleva a una estructura con funcionalidad enol-amino. El

caso de las bases púricas portonadas es ligeramente más complejo, por lo que, al sistema anteriormente descrito, se le agrega (nH) para dar cuenta de cuales nitrógenos heterocíclicos se encuentran protonados.

En el caso de los dímeros protonados de las bases pirimidínicas, se utiliza la misma convención establecida para los monómeros. En este caso, se utilizan dos letras para la entidad protonada y dos letras para la entidad neutra, los nombres siempre empiezan con la base protonada. De esta forma,  $KE^+ \cdots EK$  indica que tanto en la base protonada como la neutra, los grupos funcionales se encuentran uno en estado ceto y otro en estado enol. El orden en el nombre se elige para indicar los grupos funcionales que interaccionan por puente hidrógeno, de forma tal que el primer grupo de la entidad protonada interaccione con el primer grupo nombrado de la entidad neutra, y lo mismo con el segundo grupo. En el ejemplo dado, el grupo ceto de la entidad protonada interacciona por puente hidrógeno con el grupo enólico de la molécula neutra, y el grupo enol de la entidad protonada interacciona con el grupo ceto de la molécula neutra. Además, pueden anteponerse los prefijos *cis* y *trans* en el caso de existir ambigüedades surgidas de la asimetría del dímero respecto a los grupos funcionales de las bases.

### 5.1.2. Motivación y antecedentes

Estudiar y entender la respuesta de las bases del ADN/ARN a la radiación UV es de fundamental importancia, debido a que su fotoquímica juega un papel preponderante en los mecanismos de daño fotoquímico. Así mismo, se cree desde hace tiempo, que dichos mecanismos de respuesta fotoquímica han sido de gran importancia en la etapa de la química pre-biótica, en la evolución de las macromoléculas auto-replicantes piezas fundamentales de la vida que hoy conocemos.[58] En los últimos años, un gran número de estudios tanto teóricos como experimentales se han abocado a investigar estos sistemas en fase gaseosa, “el estado del arte” de la espectroscopía de estos ladrillos fundamentales para la vida se encuentra condensado en tres revisiones recientes del tema. [58–60]

Las bases del ADN y ARN son estructuralmente complejas, debido a que pueden existir en diversas formas tautoméricas. Sin embargo, en la formación de la doble hélice del ADN sólo se encuentran involucrados los tautómeros canónicos de las bases (véase Figura 5.1), lo que posibilita un preciso “reconocimiento” molecular entre citosina (C) y guanina (G) mediante tres puentes hidrógeno, y entre adenina (A) y timina (T) mediante

dos puentes hidrógeno. Este reconocimiento molecular es esencial en la conservación de la información genética codificada en el ADN. El tiempo de vida del estado excitado de las bases del ADN/ARN depende fuertemente del estado tautomérico de éstas. Es sabido que el tiempo de vida en el estado excitado de los tautómeros canónicos es órdenes de magnitud menor que el del resto de los posibles tautómeros de las bases, hecho que se considera asociado a un mecanismo de foto-protección del ADN. [58–60]

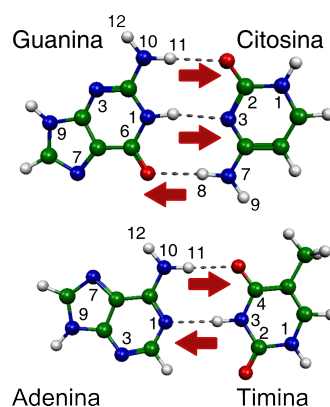


FIGURA 5.1: Estructuras de Watson-Crick (WC) de los pares de bases del ADN. Las flechas rojas indican los posibles sitios de protonación a través de una reacción de transferencia de protón “interna”, entre las bases que forman los pares de WC.

En bibliografía se pueden encontrar un gran número de publicaciones respecto al estudio de la espectroscopía de las bases del ADN neutras.[58–60] Sin embargo, existe cierta dispersión en la interpretación de los resultados experimentales, sobre todo en cuanto a la asignación de los tautómeros responsables de la respuesta espectroscópica observada, y la relación entre dicha asignación y los tiempos de vida medidos mediante técnicas “bombeo y prueba” con láseres de femtosegundos. A continuación se realiza un breve resumen de lo que se considera el estado del arte de la espectroscopía de las bases del AND/ARN neutras: [58–60]

- En el caso de la C neutra en fase gaseosa, el espectro REMPI muestra dos bandas de absorción con orígenes en  $32000\text{ cm}^{-1}$  y  $36000\text{ cm}^{-1}$ , que fueron asignadas a los tautómeros, KA, presente en el ADN, y EA, respectivamente.[114] Además, por espectroscopía de microondas con transformada de Fourier, se detectaron todos los tautómeros posibles de la citosina neutra KA, EA-cis, EA-trans, KI-cis y KI-trans, donde *cis* y *trans* hace referencia a la posición del protón (del grupo A o I) respecto al N3 de la molécula.[115]
- Para T y U neutros, tanto las mediciones de espectroscopía electrónica como de microondas apuntan al hecho de que en fase gaseosa el tautómero más abundante es el di-ceto

(KK) presente en el ADN y ARN, con orígenes de la transición electrónica a  $36400\text{ cm}^{-1}$  y  $35288\text{ cm}^{-1}$  respectivamente.[58]

- En el caso de A, el espectro electrónico obtenido por espectroscopía REMPI, consiste en una serie de picos poco intensos y bien definidos entre de  $36062\text{ cm}^{-1}$  y  $36240\text{ cm}^{-1}$ , y a partir de  $36248\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda ancha de absorción. Se ha establecido que esta respuesta espectroscópica se debe a la excitación a dos estados electrónicos, uno de carácter  $\pi\pi^*$  y otro de carácter  $n\pi^*$  del tautómero canónico de la nucleobase.[58]
- El caso de G neutra es particularmente complejo, ya que los cálculos *ab-initio* indican que los tautómeros KA 9H y 7H son los más estables, seguidos por los correspondientes tautómeros enólicos (EA 9H y 7H).[58] Mediante espectroscopía REMPI se identificaron cuatro bandas de absorción con orígenes a  $32864\text{ cm}^{-1}$ ,  $33269\text{ cm}^{-1}$ ,  $33928\text{ cm}^{-1}$  y  $34773\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, mediante técnicas de doble resonancia (IR+UV), se encontró que ninguna de las bandas observadas corresponde a la excitación del tautómero canónico KA 9H, sino que se asignaron a los tautómeros EA 7H, KI 7H, KI 9H y EA 9H respectivamente.[58, 70, 116] Este resultado podría llevar a la errada conclusión de que el tautómero canónico no existe en fase gaseosa, sin embargo dicho tautómero sí fue detectado por técnicas que no involucran la población “efectiva” del estado electrónico excitado, como espectroscopía de microondas con transformada de Fourier [117] y espectroscopía de efecto Stark en nanogotas de helio.[70] El hecho de que el tautómero canónico de la guanina no pueda detectarse por espectroscopía electrónica se atribuyó entonces a que el mismo tiene un tiempo de vida extremadamente corto en el estado electrónico excitado, lo que hace imposible su detección mediante técnicas que requieren la población de este estado para su detección. Los tiempos de vida de todos los tautómeros no canónicos están en el orden de las decenas de nanosegundos,[59] mientras que mediciones de “bombeo y prueba” con láseres de femtosegundos mostraron que el tiempo de vida del tautómero canónico es de apenas 0,8 ps. [58] Éste es un ejemplo contundente del efecto del tautomerismo en el tiempo de vida del estado electrónico excitado.
- Para los tautómeros canónicos de las bases, el tiempo de vida del estado electrónico excitado estimado con láseres de femtosegundos en fase gaseosa es de 0,8; 1,0; 2,4; 3,2; y 6,4 ps para guanina, adenina, uracilo, citosina y timina, respectivamente. Los tiempos de vida de los estados excitados de los tautómeros no canónicos de las bases del ADN/ARN son del orden de los nanosegundos.[58–60]

Las bases del ADN/ARN son susceptibles a ser protonadas, ya sea en reacciones de transferencia de protón o por otros mecanismos de reacción.[118, 119] Los procesos de protonación de las bases del ADN/ARN son de gran importancia debido a que generan como producto, tautómeros alternativos a los canónicos. La existencia de estos tautómeros no canónicos puede producir un incremento del tiempo de vida del estado electrónico excitado, [58–60] o mutaciones ya sea en el proceso de replicación del ADN o transcripción a ARN, debido a fallas en el reconocimiento molecular de las bases.[119–124]

Sobolewski y Domcke[125] propusieron que el mecanismo principal de desactivación de la excitación electrónica en el par CG de Watson Crick (WC) en fase gaseosa, consiste en una reacción de transferencia de Hidrógeno/Protón, de la base púrica a la pirimidínica, en el estado electrónico excitado del par. Por esto, dentro de un esquema “bottom-up” para construir un modelo completo de la fotoquímica y fotofísica del ADN, es de primordial importancia conocer la estructura de las bases del ADN protonadas, sus formas tautoméricas y estabilidad relativa, el efecto de la protonación en el tiempo de vida del estado electrónico excitado y en los espectros de absorción. Sin embargo, en comparación con la vasta bibliografía existente acerca de la fotoquímica y fotofísica de las bases neutras de ADN, [58–60] se han realizado muy pocos estudios detallados de la espectroscopía de dichas moléculas protonadas.[119–121, 126–128]

A continuación resumimos los pocos antecedentes existentes al momento de la realización de esta tesis, respecto a la espectroscopía de las bases del ADN/ARN protonadas en fase gaseosa:

Mediante espectroscopía de DMIR Maitre y colaboradores dilucidaron la estructura de las bases pirimidínicas protonadas del ADN/ARN, generadas por electrospray.[119] En el caso de la  $[\text{CH}]^+$  encontraron que el espectro de DMIR está dominado por la presencia de los modos vibracionales del tautómero protonado más estable,  $\text{EA}^+$ . Sin embargo, también se encontró una pequeña banda de a  $1800 \text{ cm}^{-1}$  (estiramiento  $\text{C}=\text{O}$ ) que indica que el tautómero  $\text{KA}^+$ , segundo en estabilidad, también se encuentra en fase gaseosa. La espectroscopía de DMIR arroja resultados similares para el caso del  $[\text{UH}]^+$  y la  $[\text{TH}]^+$ . Para ambas especies, el espectro se encuentra dominado por las señas espectrales del tautómero protonado más estable,  $\text{EE}^+$ , aunque a  $1800 \text{ cm}^{-1}$  se observa una banda poco intensa, que indica la presencia del segundo tautómero más estable de  $[\text{TH}]^+$  y  $[\text{UH}]^+$  con estructura  $\text{KE}^+$ .

De las bases puricas, sólo se encuentra en bibliografía estudios respecto a la espectroscopía electrónica de la  $[AH]^+$ . [126–128] Dichos estudios fueron realizados mediante FUV, e indican que, la energía de la excitación al primer estado electrónico excitado de  $[AH]^+$  es similar a la correspondiente energía de excitación del tautómero canónico neturo A 9H. En el espectro de fragmentación se observó un continuo de absorción, acompañado de bandas anchas que aparecen a  $1000\text{ cm}^{-1}$  luego del origen de la absorción continua. Los autores señalan que el ensanchamiento de las bandas se debe a un tiempo de vida corto en el estado excitado, y que si bien el tautómero protonado más estable es el A 1H-9H, no pueden descartar la presencia del tautómero A 3H-7H en el haz molecular.

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos acerca de la espectroscopía electrónica de las bases protonadas del ADN/ARN, y los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas. Los experimentos de espectrometría de masas en trampas iónicas de baja temperatura acopladas a espectroscopía láser de FUV, permitieron obtener por primera vez los espectros de electrónicos de dichos sistemas, y con estos resultados, sus energías de excitación y una estimación de los tiempos de vida de los estados electrónicos excitados.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Monómeros protonados

Los espectros de FUV de las cuatro bases protonadas del ADN ( $[CH]^+$ ,  $[TH]^+$ ,  $[GH]^+$ ,  $[AH]^+$ ), más el espectro del uracilo protonado ( $[UH]^+$ ) se muestra en la Figura 5.2, las estructuras de los tautómeros se agregaron en la misma figura para ayudar a la lectura de la discusión de la Sección 5.3. Cabe recalcar que, el proceso de obtención de estos espectros se continuó hasta energías por debajo de  $24390\text{ cm}^{-1}$  (3 eV), pero no se observaron más bandas de absorción que las que aquí se muestran. Ésto indica que el origen de las bandas de absorción mostradas, corresponden al origen de la transición electrónica al primer estado electrónico excitado de cada base protonada.

Para las bases protonadas, se encontró que los canales de fragmentación corresponden a la pérdida de alguno de los siguientes grupos  $NH_3$ ,  $H_2O$ ,  $HNCO$  o  $H_2NCN$ . Éstos son los mismos fragmentos observados mediante experimentos de disociación inducida

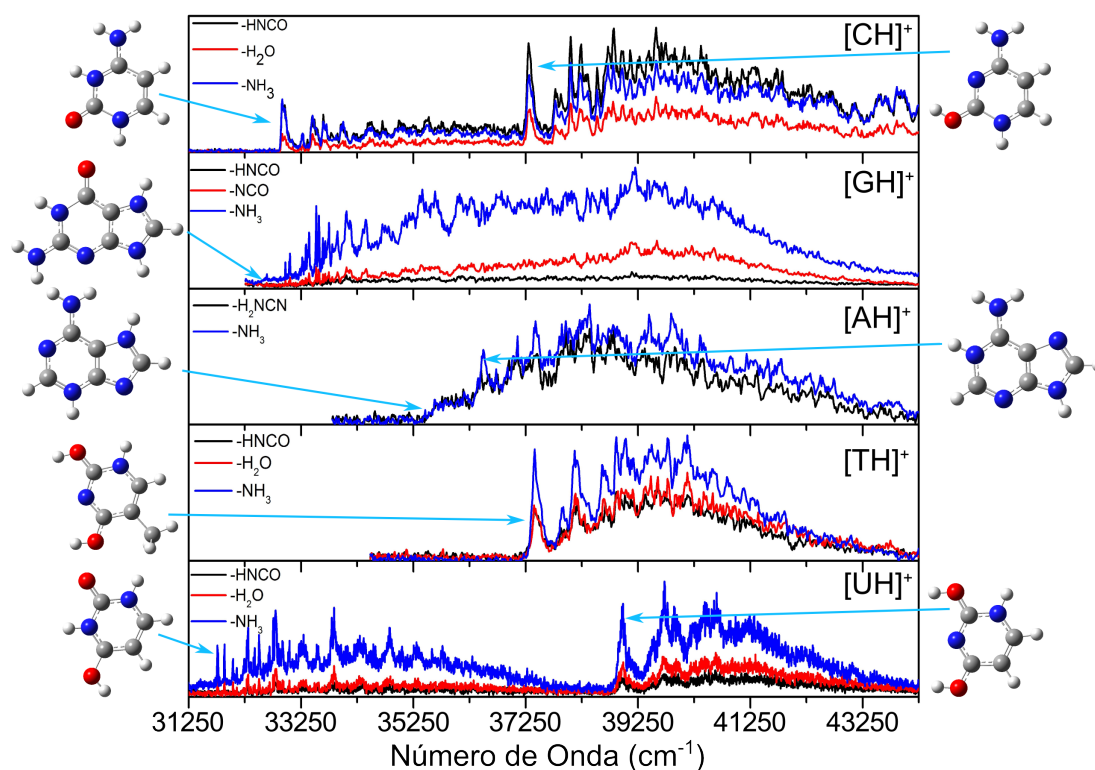


FIGURA 5.2: Espectros de FUV de las bases del ADN/ARN protonadas. Los espectros fueron colectados siguiendo diferentes canales de fragmentación. En negro se muestra la pérdida de H<sub>2</sub>O o H<sub>2</sub>NCN, en rojo la pérdida de H<sub>2</sub>O o NCO y en azul la pérdida de NH<sub>3</sub>. Tanto [CH]<sup>+</sup>, [UH]<sup>+</sup> y [AH]<sup>+</sup> presentan dos bandas de absorción, mientras que el resto de las bases protonadas presentan sólo una.

por colisiones (CID) o espectroscopía de disociación multifotónica infrarroja (DMIR), lo que da indicios de que la fragmentación ocurre en el estado fundamental ( $S_0$ ) luego de la conversión interna (CI) desde el estado excitado al mismo. Vale la pena recordar en este punto que, como se mencionó en la Sección 2.4.3, la absorción de un fotón UV (por ejemplo, 310 nm) seguida de la CI al estado  $S_0$ , produce iones en el estado electrónico fundamental con un exceso de energía vibracional de alrededor de 4 eV. Esta excitación vibracional, está por encima del límite de disociación de cualquiera de las especies aquí estudiadas, por lo que se puede descartar la posibilidad de no observar una banda de absorción debido a bajos rendimientos de fragmentación.

En la Figura 5.2 puede observarse que todos de los sistemas estudiados presentan estructuras vibracionales en sus espectros y en la mayoría de ellos dichas bandas vibracionales son anchas, exceptuando las regiones de baja energía de los espectros de [GH]<sup>+</sup> y [UH]<sup>+</sup>.



Las dos bandas de absorción observadas para  $[\text{CH}]^+$  y  $[\text{UH}]^+$ , en la Figura 5.2, pueden atribuirse a la excitación a dos estados electrónicos distintos, o a la presencia de dos tautómeros de la misma especie. A dichas bandas las llamaremos “roja y azul” en función a la energía de excitación a la cual aparecen en el espectro experimental, (roja hace referencia a la banda de menor energía y azul a la de mayor energía). Por otra parte, para la tercer base pirimidínica  $[\text{TH}]^+$ , sólo se observó una banda de absorción en la región comprendida entre  $34250 \text{ cm}^{-1}$  y  $44250 \text{ cm}^{-1}$ . En la Figura 5.3, se muestra una ampliación de los espectros FUV, en la región del origen de cada banda de absorción

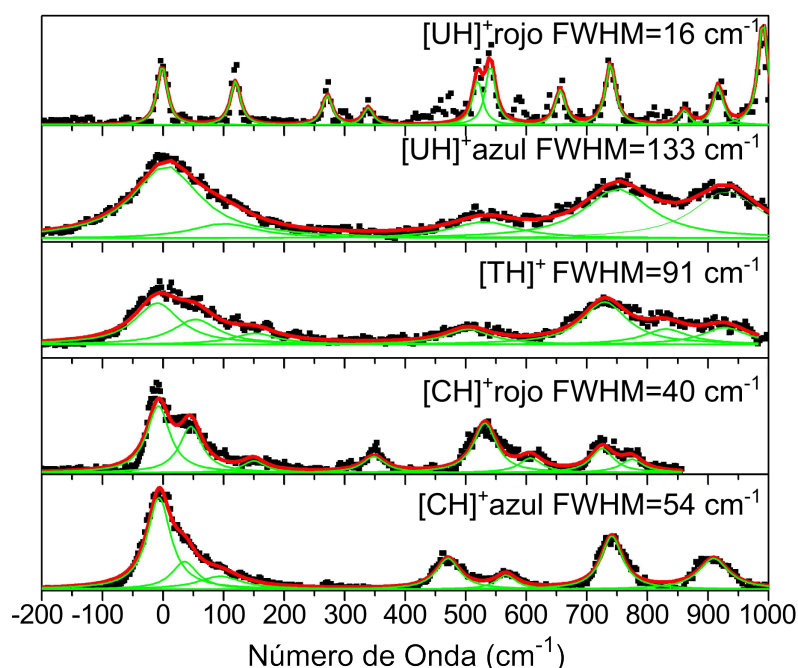


FIGURA 5.3: Ampliación del origen de la transición electrónica de las bases pirimidínicas protonadas. Las bandas vibracionales fueron ajustadas con funciones Voigt. Puede observarse que en general dichas bandas son anchas, exceptuando la progresión vibracional de la transición electrónica de menor energía del uracilo protonado ( $[\text{UH}]^+$  rojo). El ancho gaussiano se fijó a  $12 \text{ cm}^{-1}$  para dar cuenta del ancho de banda del láser utilizado y del contorno rotacional. FWHM es el ancho de media altura de la contribución Lorentziana al perfil Voigt.

observada para las distintas bases pirimidínicas. En esta figura puede observarse claramente que las transiciones vibracionales son anchas, exceptuando el caso de la banda roja de  $[\text{UH}]^+$ . Además en la misma figura se muestran los ajustes realizados con funciones Voigt de cada banda (verde) y el ajuste total (rojo). El ancho a mitad de altura FWHM de la contribución Lorentziana al perfil Voigt, se encuentra indicado en la parte superior derecha de cada panel. En estos ajustes, se fijó el ancho de la función gaussiana a  $12 \text{ cm}^{-1}$  para dar cuenta del ancho de banda del láser y del contorno rotacional. El

ancho Lorentziano obtenido, permite estimar el tiempo de vida del estado electrónico excitado debido a que están relacionados por el principio de incertidumbre según:

$$FWHM(cm^{-1}) = (2c\pi\tau)^{-1} = \frac{5,3 \times 10^{-12}}{\tau(s)} \quad (5.1)$$

Donde FWHM de los picos vibracionales se expresa en  $cm^{-1}$ , y  $\tau$  es el tiempo de vida del estado electrónico excitado en segundos. Esta aproximación es válida suponiendo que el ensanchamiento está dado únicamente por el tiempo de vida del estado electrónico excitado, y no por efectos de congestión espectral, como contorno rotacional y/o modos normales de baja frecuencia. Cabe recalcar que los tiempos de vidas calculados de ésta forma son estimaciones, y la validez de esta aproximación se discutirá más adelante en la Sección 5.3.1.

En la Figura 5.4 se muestra una ampliación del origen de la transición electrónica de las bases púricas protonadas. En el caso de  $[GH]^+$  se puede observar un espectro con buena resolución y bandas bien definidas, cuyo ancho Voight es de  $(12 \pm 2) cm^{-1}$  el cual está limitado por la resolución del láser y el contorno rotacional, por lo que el FWHM Lorentziano se estima menor a  $1 cm^{-1}$ . Por el contrario, la  $[AH]^+$  presenta dos sistemas de bandas anchas, compuesta de una absorción sin estructura al rojo del espectro y otro grupo de bandas de absorción que comienzan  $1000 cm^{-1}$  al azul del origen de la transición de menor energía. En este punto es importante notar que, en la zona de menor energía, la intensidad de los dos fragmentos (pérdida de  $NH_3$  y  $H_2NCN$ ) es igual. Por el contrario al azul del espectro, la intensidad del fragmento originado por la pérdida de  $NH_3$  es mayor al originado por la pérdida del grupo  $H_2NCN$ . Esta diferencia en las eficiencias de fragmentación entre las bandas al rojo y azul del espectro, pueden deberse a que dichas bandas son originadas por la excitación a diferentes estados electrónicos, o por la excitación de diferentes tautómeros.

En la Tabla 5.1 se muestran los tiempos de vida estimados a partir de la Ecuación 5.1. En ésta puede verse que, para la mayoría de las bases protonadas, los tiempos de vida del estado electrónico excitado se encuentran entre 30 fs y 100 fs ( $\pm 20$  fs), exceptuando a el sistema rojo del  $[UH]^+$  y la  $[GH]^+$ , para los cuales los tiempos de vida son uno y dos órdenes de magnitud mayores respectivamente.

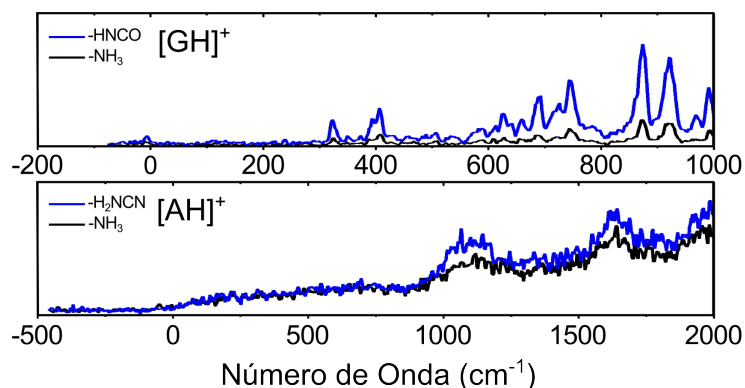


FIGURA 5.4: Ensanchamiento vibracional de las bandas de FUV de las bases púricas protonadas

TABLA 5.1: Estimación del tiempo de vida del estado electrónico excitado para las bases del ADN/ARN protonadas y los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas. En el caso de las bases en las que se observó más de una banda de absorción, se distingue entre “rojo” y “azul” el tiempo de vida obtenido para cada sistema, dependiendo la posición relativa entre ambas bandas en el espectro. Los anchos de banda informados corresponden a la contribución Lorentziana al perfil Voigt utilizado para ajustar las transiciones. En todos los casos, el ancho de banda Gaussiano se fijó en  $12 \text{ cm}^{-1}$  para dar cuenta del contorno rotacional y el ancho de banda del láser.

Base Protonada/ Dímero Protonado	FWHM Medido ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tiempo de Vida estimado (fs)
[UH] <sup>+</sup> rojo	$16 \pm 5$	$\geq 330$
[UH] <sup>+</sup> azul	$133 \pm 15$	$40 \pm 20$
[U <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> Dímero	$33 \pm 10$	$160 \pm 20$
[TH] <sup>+</sup>	$91 \pm 20$	$58 \pm 20$
[T <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> Dímero	$< 1$	$> 5000$
[CH] <sup>+</sup> rojo	$40 \pm 10$	$133 \pm 20$
[CH] <sup>+</sup> azul	$54 \pm 10$	$98 \pm 20$
[C <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> Dímero	$62 \pm 10$	$85 \pm 20$
[AH] <sup>+</sup> azul	$177 \pm 20$	$30 \pm 20$
[GH] <sup>+</sup>	$< 1$	$> 5000$

### 5.2.2. Dímeros protonados de bases pirimidínicas

Los espectros FUV de los tres homodímeros de las bases pirimidínicas ([C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, [T<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> y [U<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>) se muestran en la Figura 5.5. Al igual que en el caso de los monómeros protonados, la adquisición de los espectros se continuó hasta energías por debajo de  $24390 \text{ cm}^{-1}$  (3 eV), pero no se observaron más bandas de absorción que las que se muestran en la Figura 5.5, por lo que las bandas encontradas, corresponden al origen

de la transición electrónica al primer estado electrónico excitado. En la misma figura, a los fines de facilitar la comparación se señalan los orígenes de las transiciones de los correspondientes monómeros protonados, mostrados en la Figura 5.2

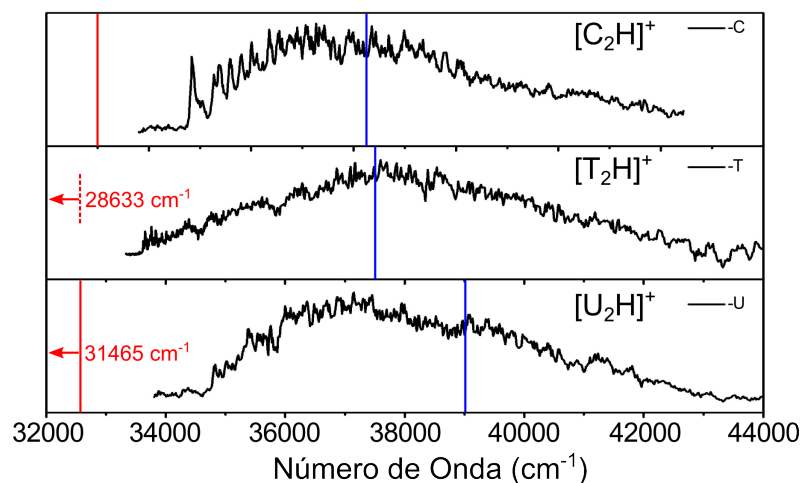


FIGURA 5.5: Espectros FUV de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas. En todos los casos los espectros fueron colectados siguiendo el único canal de fragmentación observado, que consiste en la pérdida de una base neutra. A los fines de facilitar la comparación, se señala en azul y rojo el origen de la transición electrónica de cada monómero protonado. Para la  $[TH]^+$  se señala en línea de trazos el origen de la transición electrónica del tautómero  $KE^+$ , que se encuentra fuera de escala, según la predicción teórica.

Los espectros de todos los homodímeros estudiados presentan bandas anchas de absorción en la región UV, y a diferencia de lo que ocurre con  $[CH]^+$  y  $[UH]^+$ , para los dímeros  $[C_2H]^+$  y  $[U_2H]^+$  se observó una única banda de absorción. Como puede observarse en la Figura 5.5 los espectros de los tres sistemas estudiados comienzan entre los  $33500\text{ cm}^{-1}$  -  $35000\text{ cm}^{-1}$  ( $4,15\text{ eV}$  -  $4,34\text{ eV}$ ) y se extienden por al menos  $9000\text{ cm}^{-1}$ . En todos los casos, el único canal de fotofragmentación observado fue la pérdida de una base neutra, lo que es esperable dado que corresponde a la ruptura del enlace más débil en el dímero.

En la Figura 5.6, se muestra una ampliación de los espectros FUV, en la región del origen de cada banda de absorción para los tres homodímeros de las bases pirimidínicas. éstos se encuentran graficados en la misma escala para que la diferencia en el ensanchamiento vibarcional sea fácilmente apreciable. En esta figura puede observarse claramente que las transiciones vibracionales son anchas, exceptuando el caso de  $[T_2H]^+$ . Además, al igual que para los monómeros, en la misma figura se muestran los ajustes realizados con funciones Voigt de cada banda (verde) y el ajuste total (rojo). El ancho a mitad

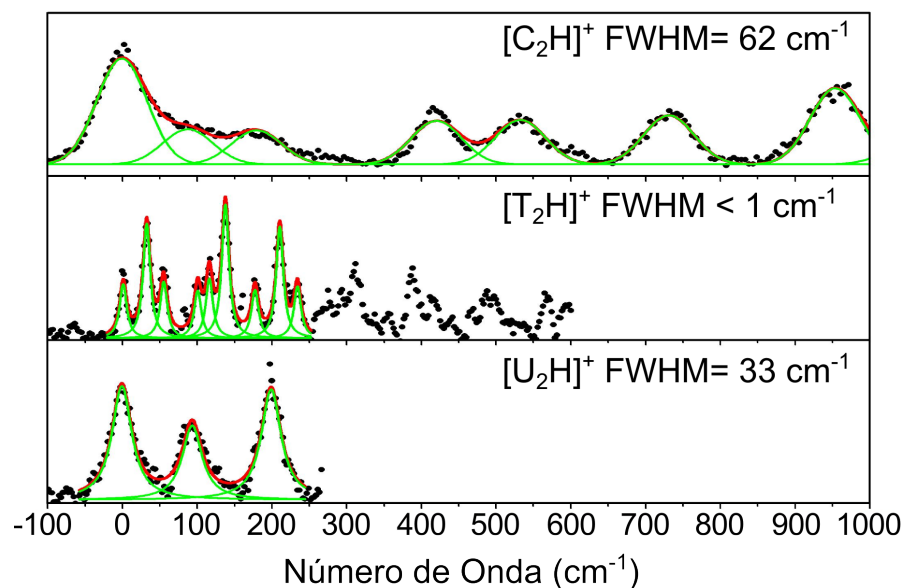


FIGURA 5.6: Ampliación de la zona del origen de la transición electrónica de los dímeros protonados de las bases pirimidínicas del ADN/ARN. Las bandas vibracionales fueron ajustadas con funciones Voigt. El ancho gaussiano se fijó a  $12 \text{ cm}^{-1}$  para dar cuenta del ancho de banda del láser utilizado y del contorno rotacional. FWHM es el ancho de media altura de la contribución Lorentziana al perfil Voigt.

de altura FWHM de la contribución Lorentziana al perfil Voigt, se encuentra indicado en la parte superior derecha de cada panel. En estos ajustes, al igual que en el caso de los monómeros protonados, se fijó el ancho de la función gaussiana a  $12 \text{ cm}^{-1}$  para dar cuenta del ancho de banda del láser y del contorno rotacional. Mediante el ancho Lorentziano obtenido, se estimó el tiempo de vida del estado electrónico excitado a partir de la Ecuación 5.1. Los tiempo de vida así obtenidos se encuentran tabulados en la Tabla 5.1. En la misma se observa que los tiempos de vida de los dímeros  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  y  $[\text{U}_2\text{H}]^+$  son cortos, alrededor de 85 fs y 160 fs ( $\pm 20$  fs), respectivamente, mientras que el comportamiento del  $[\text{T}_2\text{H}]^+$  es notablemente distinto, pues el tiempo de vida estimado para éste es al menos dos ordenes de magnitud mayor.

## 5.3. Análisis y Discusión

### 5.3.1. Validez de la estimación de los tiempos de vida a partir del ancho de banda

Como se mencionó en la sección anterior, los tiempos de vida del estado electrónico excitado se estimaron a partir de las contribuciones Lorentzianas a los perfiles Voigt, utilizadas para ajustar las transiciones vibro-electrónicas de los espectros experimentales, ya que dicha componente da cuenta del ensanchamiento homogéneo de las bandas. Esta aproximación es válida únicamente en el caso de que el ensanchamiento esté dado sólo por el tiempo de vida del estado electrónico excitado, y no por efectos de congestión espectral, como contorno rotacional y/o modos normales de baja frecuencia.

En el caso de los monómeros protonados, en los espectros en los que se observa una buena resolución espectral, el sistema rojo del  $[\text{UH}]^+$  (Figura 5.3) y la  $[\text{GH}]^+$  (Figura 5.4), no se identificaron progresiones vibracionales de baja frecuencia (menores que  $100 \text{ cm}^{-1}$ ). Incluso en el caso del dímero  $[\text{T}_2\text{H}]^+$  donde se observaron progresiones de  $\sim 25 \text{ cm}^{-1}$ , es posible resolver espectralmente las bandas (Figura 5.6). Por lo que, debido a la similitud estructural entre las bases del ADN/ARN, no se espera que el ensanchamiento del resto de los sistemas estudiados se deba a progresiones de modos normales de más baja frecuencia. Esto también se confirmó mediante la simulación del espectro de  $[\text{CH}]^+$  como se verá en la Sección 5.3.2.1.

Además, es necesario recalcar que debido a la baja temperatura a la cual se lleva a cabo el experimento ( $\sim 30 \text{ K}$ ), los estados vibracionales excitados del estado electrónico fundamental no se encuentran poblados. Por lo que, se puede descartar la posibilidad de que el ancho de las bandas se deba a congestión por “transiciones calientes”. Es decir, excitaciones desde estados roto-vibracionales excitados en el estado  $S_0$ .

Con estos hechos en mente, se puede suponer que el ensanchamiento de las bandas vibracionales está dado únicamente por el efecto del tiempo de vida del estado electrónico excitado.

Una característica importante a destacar de los resultados obtenidos, es que no se observa un ensanchamiento progresivo de las bandas a medida que aumenta el exceso de energía vibracional. Al contrario de lo que ocurre con algunos de los sistemas neutros,

como la adenina, para la cual sólo se observan algunas bandas vibracionales bien resueltas a bajas energías de excitación, dentro de los  $200\text{ cm}^{-1}$  por encima del origen de la transición, pero al aumentar el exceso de energía vibracional aparece una banda de absorción continua sin estructura, debido a la disminución del tiempo de vida del estado electrónico excitado.[129, 130] Para los sistemas protonados se observó que el mecanismo de desactivación rápido no radiativo se mantiene operativo incluso cuando se excita la transición fundamental, y no se observan cambios drásticos en el ensanchamiento vibracional al menos en los primeros  $1000\text{ cm}^{-1}$  desde el origen de la transición. A energías de excitación más altas, los espectros pierden su estructura, pero esto probablemente se deba a la congestión espectral producida por el solapamiento de una gran cantidad de transiciones relacionadas con el aumento de la densidad de estados.

Cabe recalcar que el tiempo de vida aquí estimado a través de la Ecuación 5.1 corresponde al del estado  $S_1$ . Este tiempo de vida no da información sobre la cinética del proceso de disociación que da como producto los fotofragmentos observados, el cual ocurre en el estado fundamental.

### 5.3.2. Monómeros protonados

#### 5.3.2.1. Asignación de las estructuras

Para realizar la asignación espectral de los tautómeros se optimizaron las posibles estructuras protonadas en el estado fundamental, y se calcularon las transiciones verticales y/o adiabáticas al primer estado electrónico excitado. Posteriormente, los resultados *ab initio* se compararon con los datos experimentales de la forma que se detalla a continuación:

Se ha observado que, para moléculas aromáticas neutras y protonadas, hay una buena correlación entre el valor de la energía de transición 0-0 y la transición adiabática  $E_{ad}$  obtenida a partir de la optimización del estado electrónico excitado al nivel de teoría RI-ADC(2), siendo el error promedio de  $\pm 0,2\text{ eV}$ . [131–136] Para los sistemas aquí estudiados, sólo se logró optimizar el estado electrónico excitado del tautómero más estable de  $[\text{CH}]^+$ , de estructura enol-amino ( $\text{EA}^+$ ). Para este tautómero la  $E_{ad}$  calculada es de  $4,62\text{ eV}$ , en muy buen acuerdo con el origen de la banda azul registrada experimentalmente de  $[\text{CH}]^+$ , que se encuentra a  $37343\text{ cm}^{-1}$  ( $4,63\text{ eV}$ ).

Si bien, la  $E_{ad}$  calculada tiene una correlación directa con los valores experimentales de excitación, no fue posible optimizar las estructuras de todos los potenciales tautómeros responsables de la absorción observada experimentalmente, en sus correspondientes estados electrónicos excitados. Ésto es debido a que, en dicho estado las bases protonadas sufren deformaciones fuera del plano del anillo aromático, lo que rompe la simetría del sistema, produciendo un mezclado de los estados electrónicos excitados que imposibilita su diferenciación. Por esto, se utilizó una regla empírica, que indica que en moléculas aromáticas (neutras y protonadas) la diferencia entre la energía de excitación vertical ( $E_{vert}$ ) y  $E_{ad}$  es de alrededor de 0,5 eV. [131–136] Por ejemplo, para el caso del tautómero EA<sup>+</sup> de la [CH]<sup>+</sup>, la energía de excitación vertical es  $E_{vert}=5,15$  eV, por lo que la regla empírica predice que la energía de excitación adiabática sea  $E_{ad} = E_{vert} - 0,5eV = 4,65eV$ , que se corresponde muy bien tanto con el valor experimental de excitación (4,63 eV) como con la energía de la transición adiabática calculada para este tautómero (4,62 eV). Se puede resumir esta regla como:

$$E_{exp} = E_{vert} - (0,5 \pm 0,3)eV \quad (5.2)$$

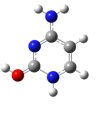
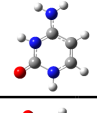
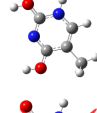
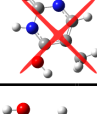

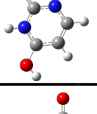
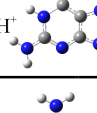
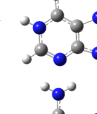
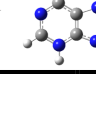
En ella se relacionan la energía de excitación experimental ( $E_{exp}$ ) con la  $E_{vert}$  calculada. La Ecuación 5.2 se utilizó para asignar los espectros FUV obtenidos experimentalmente, y se encontró que en todos los casos los espectros obtenidos corresponden al tautómero protonado más estable de cada base en el estado fundamental. Además, para todos los sistemas se optimizó la estructura de los estado excitados con restricción de simetría  $C_s$ , lo que permite estimar la energía de la transición adiabática, bajo la suposición de que en el estado electrónico excitado las bases protonadas mantienen una simetría planar. Los valores obtenidos bajo esta aproximación permiten apoyar la asignación realizada mediante la Ecuación 5.2.

En la Tabla 5.2 se resumen las energías de excitación experimentales, junto con las correspondientes  $E_{vert}$  calculadas y la diferencia  $\delta = (E_{vert} - 0,5eV) - E_{exp}$ . En la última columna, se tabulan las energías de excitación adiabática calculadas con restricción de simetría  $C_s$ .

[CH]<sup>+</sup> En el caso de la citosina protonada, el espectro de FUV muestra claramente dos bandas de absorción (véase la Figura 5.2). Los cálculos teóricos permiten descartar que ambas bandas sean originadas por la excitación de un mismo tautómero a dos



TABLA 5.2: Asignación de las transiciones electrónicas de los diferentes tautómeros de las bases protonadas del ADN/ARN. Para el estado fundamental ( $S_0$ ), se muestran las energías relativas respecto al tautómero más estable de cada base calculada al nivel MP2/cc-pVDZ (eV). ( $E_{exp}$ ) es la energía de la transición experimental obtenida en eV. ( $E_{vert}$ ) La energía de la primer transición vertical  $\pi\pi^*$  calculada al nivel de teoría ADC(2)/cc-pVDZ (eV). Las columnas  $E_{vert} - 0,5eV$  y  $\delta = (E_{vert} - 0,5eV) - E_{exp}$  permiten realizar la asignación espectral a través de la Ecuación 5.1. En la última columna se tabula la energía de transición  $\pi\pi^*$  adiabática calculada con restricción de simetría  $C_s$  (Opt  $C_s$ ) calculada al nivel ADC(2)/cc-pVDZ (eV). El tautómero  $KE^+$  de la timina protonada que aparece tachado no se observa experimentalmente, sin embargo, debido a la proximidad en energía con el tautómero  $EE^+$ , no puede descartarse su presencia bajo las condiciones experimentales.

Base Protonada	Tautómero	$E_{(exp)}$	$E_{(vert)} \pi\pi^*$	$E_{(vert)} - 0,5$	$\delta$	$S_0$	Opt $C_s$
[CH] <sup>+</sup>	EA <sup>+</sup> 	4,63	5,15	4,65	0,02	0,00	4,75
	KA <sup>+</sup> 	4,08	4,38	3,88	-0,20	0,07	4,17
[TH] <sup>+</sup>	EE <sup>+</sup> 	4,64	5,07	4,57	-0,07	0,00	4,83
	<del>KE<sup>+</sup> </del>	No Observado	4,05	3,55	x	0,17	x
[UH] <sup>+</sup>	EE <sup>-</sup> 	4,83	5,44	4,94	0,11	0,00	5,00
	KE <sup>-</sup> 	3,90	4,39	3,89	-0,01	0,08	3,85
[GH] <sup>+</sup>	KA 7H-9H <sup>+</sup> 	4,05	4,41	3,91	-0,14	0,00	4,19
[AH] <sup>+</sup>	A 1H-9H <sup>+</sup> 	4,54	4,83 <sup>b</sup>	4,33	-0,21	0,00	4,68
	A 3H-7H <sup>+</sup> 	4,40	4,80 <sup>b</sup>	4,30	-0,10	0,02	4,62

estados electrónicos excitados diferentes, debido a que, para cualquiera de los tautómeros posibles, la estimación de la diferencia de energía entre el primer estado electrónico excitado ( $\pi\pi^*$ ) y el segundo ( $n\pi^*$ ) es de alrededor de 0,84 eV (6775  $cm^{-1}$ ), mucho mayor que la separación entre las bandas observada de 0,55 eV (4436  $cm^{-1}$ ). Entonces para este sistema, claramente las dos bandas son originadas por la presencia de dos estructuras

tautoméricas. Según las estimaciones realizadas mediante la aproximación dada por la Ecuación 5.2 y la transición adiabática calculada con restricción de simetría, asignamos las dos bandas de absorción a los dos tautómeros de menor energía. El tautómero más estable es el  $EA^+$  y el segundo en energía tiene estructura  $KA^+$ , cabe recalcar que estos han sido observados experimentalmente en fase gaseosa por espectroscopía DMIR.[119, 121] Las estructuras de los tautómeros pueden verse en la Tabla 5.2.

Además como ya se mencionó al comienzo de esta sección, fue posible optimizar la estructura del tautómero más estable en el estado electrónico excitado, obteniéndose una energía de excitación adiabática de 4,62 eV, que se corresponde muy bien con el origen de la transición azul (4,63 eV) obtenida experimentalmente del espectro de  $[CH]^+$ . Para dicho tautómero además, se calcularon las frecuencias de los modos normales de vibración en los estados electrónicos fundamental y excitado, lo que permitió simular el espectro de excitación que se muestra en la Figura 5.7 utilizando el programa PGOPHER [137] y los valores de frecuencias y geometrías calculadas. En esta figura, puede observarse que

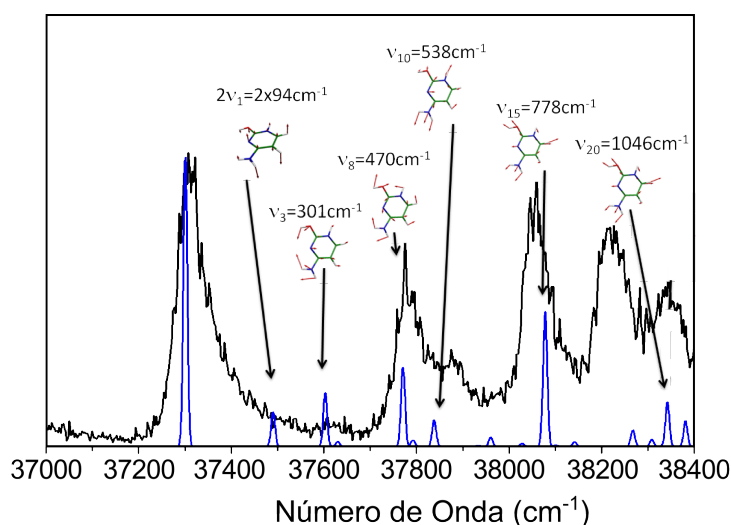


FIGURA 5.7: Simulación del espectro de excitación del tautómero  $EA^+$  de  $[CH]^+$ . Este tautómero es el único que se logró optimizar en el estado electrónico excitado, sin ninguna restricción de simetría.

la concordancia entre el espectro experimental y el simulado es muy buena, el espectro muestra mayormente modos de vibración en el plano del anillo aromático. El modo de vibración fuera del plano de menor frecuencia está alrededor de  $95\text{ cm}^{-1}$  por encima del origen de la transición, éste es un modo poco intenso y no se puede apreciar en la Figura 5.7, sin embargo en el espectro simulado puede observarse el mismo modo con dos cuantos de energía ( $2\nu_1$ ). La diferencia más notable entre ambos espectros está dada por

el ancho de las bandas, al mismo tiempo, la comparación entre ambos también permite confirmar que dicho ensanchamiento no se debe a un efecto de congestión espectral, por lo que se confirma que el ancho de las bandas vibracionales está directamente asociado al ensanchamiento homogéneo dado por el tiempo de vida del estado electrónico excitado.

Para el segundo tautómero de menor energía,  $KA^+$ , la optimización en el estado  $\pi\pi^*$  lleva a un cruce de sistemas con el estado  $\pi\sigma^*$  a través de la rotación del grupo  $NH_2$ . Por lo que el estado  $\pi\pi^*$  no pudo ser optimizado sin restricciones de simetría, y por tanto, la transición adiabática “real” a dicho estado no pudo ser calculada. Sin embargo teniendo en cuenta la energía de excitación vertical calculada y la aproximación dada por Ecuación 5.2, y la energía de la transición adiabática calculada con restricción  $C_s$ , podemos asignar con un buen grado de confianza la banda roja del espectro de la  $[CH]^+$  al segundo tautómero más estable, Tabla 5.2.

$[TH]^+$  Para la timina protonada, el tautómero de menor energía tiene estructura  $EE^+$ . Tanto la energía de excitación calculada a partir de la Ecuación 5.2, como la energía de la transición adiabática calculada con restricción de simetría, están de acuerdo con la energía de excitación observada experimentalmente (véase Tabla 5.2). A nivel MP2, se obtuvo que el estado fundamental del segundo tautómero más estable está sólo 0,17 eV por encima en energía del  $EE^+$ , mientras que dicha diferencia de energía a nivel DFT/B3LYP fue calculada por Salpin y colaboradores [119] dando un valor de 0,1 eV. Teniendo en cuenta que la diferencia en energía entre ambos tautómeros es pequeña, podría esperarse que ambos estén presentes bajo las condiciones experimentales. Sin embargo, los cálculos de energía de los estados electrónicos excitados muestran que para el tautómero  $KE^+$ , la energía de excitación es de alrededor de 3,55 eV, pero a estas energías no se observa ninguna banda de absorción en el espectro experimental. Por lo que, para la  $[TH]^+$  podemos aseverar que la banda de absorción observada experimentalmente se debe a la presencia del tautómero más estable.

$[UH]^+$  El espectro FUV del uracilo protonado muestra claramente dos bandas de absorción, que pueden ser asignadas a la presencia de los dos tautómeros más estables. Los cálculos *ab-initio* y los trabajos de DMIR muestran que el tautómero más estable tiene una estructura  $EE^+$ . [119, 120] Para éste, la estimación dada por la Ecuación 5.2 indica que el origen de la transición electrónica está alrededor de 4,94 eV, en buen acuerdo con el origen de la banda azul observada experimentalmente a  $38957\text{ cm}^{-1}$  (4,83

eV), por lo que se asignó dicha banda a la excitación electrónica del tautómero más estable de  $[\text{UH}]^+$ . Cabe recalcar que la estimación dada por el cálculo de la transición adiabática con restricción de simetría, también está en buen acuerdo con la energía de la transición experimental. El segundo tautómero más estable tiene una estructura  $\text{KE}^+$ . Al nivel de teoría MP2 éste es 0,08 eV menos estable que el correspondiente tautómero  $\text{EE}^+$ , mientras que al nivel DFT/B3LYP la diferencia de energía es ligeramente menor (0,05 eV [119]). Este tautómero también fue caracterizado por espectroscopía de DMIR, [119, 120] y según los cálculos de los estados electrónicos excitados y la estimación dada por la Ecuación 5.2, el origen de la absorción del tautómero  $\text{KE}^+$  debería estar a menor energía que el origen de la absorción del  $\text{EE}^+$ , a alrededor de  $31375 \text{ cm}^{-1}$  (3,89 eV). En la Figura 5.2 puede verse que el origen del sistema rojo se encuentra a  $31456 \text{ cm}^{-1}$  (3,90 eV). Es por esto que la banda roja se asignó a la excitación electrónica del segundo tautómero más estable de  $[\text{UH}]^+$ . En éste caso, al contrario de lo observado para los dos tautómeros de la  $[\text{CH}]^+$ , el tautómero  $\text{KE}^+$  y el  $\text{EE}^+$  de  $[\text{UH}]^+$  tienen muy diferentes tiempos de vida en sus correspondientes estados excitados (véase Tabla 5.1), siendo el del tautómero  $\text{EK}^+$  un orden de magnitud más grande que el del tautómero  $\text{EE}^+$ .

$[\text{GH}]^+$  Para el caso de la guanina protonada Uchimaru y colaboradores [138] han mostrado mediante simulaciones computacionales que el tautómero KA 7H-9H<sup>+</sup> es más estable que el resto de los tautómeros posibles por al menos 0,24 eV. Una vez más, el espectro de FUV es asignado a la excitación del tautómero más estable a través de la Ecuación 5.2. El espectro presenta una progresión de bandas vibracionales bien resueltas, que hasta los  $1000 \text{ cm}^{-1}$  no muestran ensanchamientos. Esto indica la ausencia de procesos de decaimiento no radiativos rápidos.

$[\text{AH}]^+$  El espectro experimental de la adenina protonada consta de dos sistemas muy próximos en energía. Por un lado, una banda extremadamente ancha que se asemeja a un continuo, con origen a  $35460 \text{ cm}^{-1}$  (4,40 eV). Por otro lado, un segundo sistema que aparece a energías mayores, y que está compuesto por bandas vibracionales anchas, cuyo origen se encuentra a  $36630 \text{ cm}^{-1}$  (4,54 eV). En trabajos previos se ha informado que para el caso de la  $[\text{AH}]^+$  hay tres tautómeros cuyos estados electrónicos fundamentales se diferencian por menos de 0,1 eV, y sus excitaciones verticales también están dentro de los 0,1 eV. [126] Por lo que en este caso, ni la estimación dada por la Ecuación 5.2, ni el cálculo de la transición adiabática con restricción de simetría, son lo suficientemente confiables para realizar la asignación espectral. Marian y colaboradores [126] han determinado

mediante espectroscopía en fases gaseosa combinada con simulaciones computacionales, que en lo que concierne al estado fundamental, el tautómero más estable es el A 1H-9H<sup>+</sup>, seguido en orden creciente de energía por el tautómero A 3H-7H<sup>+</sup> y luego por el A 3H-9H<sup>+</sup>. Siendo los últimos dos menos estables que el A 1H-9H<sup>+</sup> por 0,02 eV y 0,08 eV, respectivamente.

El tautómero A 3H-9H<sup>+</sup> puede ser descartado como el responsable de la absorción observada experimentalmente debido a que, se ha informado que la longitud de onda de la transición adiabática es de 31250 cm<sup>-1</sup> (3,8 eV),[127] y en esa región espectral no se observó ninguna absorción. Además, teniendo en cuenta la baja temperatura a la que se termalizan los iones en este experimento y la diferencia de energía con el tautómero más estable, es de esperar que la población del tautómero A 3H-9H<sup>+</sup> sea despreciable.

Los otros dos tautómeros (A 1H-9H<sup>+</sup> y A 3H-7H<sup>+</sup>) tienen energías de excitación vertical muy similares, 4,83 eV y 4,80 eV respectivamente, y la energía de transición adiabática calculada con restricción de simetría, también es muy similar para ambos. La diferencia de energía entre la excitación a los dos primeros estados  $\pi\pi^*$  para ambos tautómeros es de alrededor de 0,2-0,3 eV, muy superior a la diferencia de energía observada entre las dos bandas obtenidas experimentalmente. Por lo que se puede desechar la posibilidad de que ambas bandas provengan de la absorción de un mismo tautómero. Teniendo en cuenta todos estos hechos, es probable que ambas bandas correspondan a la absorción de los dos tautómeros de menor energía.

En la Figura 5.4 puede observarse que en la región de menor energía del espectro, la intensidad de los fragmentos  $m/z=94$  y  $m/z=119$  que proviene de la pérdida de grupos H<sub>2</sub>NCN y NH<sub>3</sub> respectivamente, tienen la misma intensidad. Mientras que en la banda de mayor energía se observa que el fragmento  $m/z=119$  tiene mayor intensidad que el correspondiente  $m/z=94$ . Es lógico pensar que la diferencia observada en la intensidad de los fragmentos, se deba a diferencias estructurales entre los tautómeros que dan origen a las bandas de absorción. La pérdida del grupo H<sub>2</sub>NCN puede producirse directamente a partir del tautómero A 3H-7H<sup>+</sup>, mientras que en el caso del tautómero A 1H-9H<sup>+</sup>, la pérdida del mismo fragmento requeriría además una subsecuente pérdida de un átomo de hidrógeno, o un rearrreglo previo a la fragmentación. Por lo que se esperara que la eficiencia de fragmentación del tautómero A 1H-9H<sup>+</sup> para producir el grupo H<sub>2</sub>NCN sea menor que la correspondiente eficiencia del tautómero A 3H-7H<sup>+</sup>. Por ésto, se asignó la

banda azul al tautómero A 1H-9H<sup>+</sup> y la banda roja al A 3H-7H<sup>+</sup>. Sin embargo, para realizar una asignación rigurosa de ambas bandas es necesario realizar experimentos de espectroscopía de doble resonancia.

### 5.3.2.2. Tiempos de vida de los tautómeros asignados

Los tautómeros KA<sup>+</sup> y EA<sup>+</sup> de [CH]<sup>+</sup> y el A 1H-9H<sup>+</sup> de [AH]<sup>+</sup> pueden obtenerse por reacciones de transferencia de protón (TP) dentro de los pares de Watson-Crick (WC) (véase Figura 5.1) y a éstos los llamaremos tautómeros canónicos protonados. Para estos tautómeros, se estimaron tiempos de vida cortos de sus respectivos estados electrónicos excitados. Por otro lado, los tautómeros KA 7H-9H<sup>+</sup> de la [GH]<sup>+</sup> (que posee un tiempo de vida largo en el estado excitado) y el EE<sup>+</sup> de la [TH]<sup>+</sup> (que tiene un tiempo de vida corto en el estado excitado) no pueden ser producidos por reacciones de TP dentro de los pares de bases de WC. Por esto, es de esperar que las propiedades electrónicas de los tautómeros canónicos protonados [CH]<sup>+</sup> y [AH]<sup>+</sup> tengan relevancia en cuanto a la fotoestabilidad del ADN. En línea con los resultados obtenidos para las bases del ADN/ARN neutras, para las cuales se encontró que los tautómeros de relevancia biológica tiene tiempos de vida cortos en el estado electrónico excitado,[58–60] para las bases protonadas parecería que la misma regla también es cierta. Los tautómeros canónicos [CH]<sup>+</sup> y [AH]<sup>+</sup> tienen tiempos de vida cortos en el estado electrónico excitado, mientras que el tiempo de vida del tautómero no-canónico de la [GH]<sup>+</sup> tiene un tiempo de vida al menos tres órdenes de magnitud mayor.

Los pares de bases de WC también tienen tiempos de vida de estados electrónico excitado cortos, fenómeno que se ha relacionado con la fotoestabilidad del ADN.[139, 140] El proceso de desactivación del estado excitado en los pares de WC ha sido el objeto de un gran número de investigaciones,[58–60, 125, 139–143] sin embargo no se ha logrado obtener un único mecanismo unificado que explique dicho proceso de desactivación.

Las similitudes encontradas en las propiedades electrónicas de las bases neutras y protonadas, en lo que respecta a energías de excitación y tiempos de vida en el estado excitado, sugieren que las últimas también podrían tener un rol en el mecanismo de fotoestabilidad del ADN. Los datos mostrados en este capítulo acerca de las bases protonadas, constituyen el primer conjunto completo de información espectroscópica para

estas especies, y se espera que sirvan de referencia para futuros trabajos experimentales o trabajos de dinámica en el estado electrónico excitado.

### 5.3.3. Dímeros protonados de las bases pirimidínicas

#### 5.3.3.1. Comparación entre monómeros y dímeros protonados

**[C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>** En el caso de [CH]<sup>+</sup> (Sección 5.2) se observaron dos bandas de fragmentación, la banda “roja” que tiene su origen en 32900 cm<sup>-1</sup> (4,08 eV) y que fue asignada a la transición  $\pi\pi^* \leftarrow \pi\pi$  del tautómero KA<sup>+</sup>, y la banda “azul” cuyo origen se encuentra a 37305 cm<sup>-1</sup> (4,63 eV) y se asignó al mismo tipo de transición pero del tautómero EA<sup>+</sup>. Por otro lado, el espectro obtenido para el dímero protonado de la citosina ([C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, véase Figura 5.5) consiste en una única banda que tiene su origen a 34850 cm<sup>-1</sup> (4,32 eV), y se encuentra entre medio del origen de las dos bandas obtenidas para los monómeros. Las bandas vibracionales son anchas, lo que se asocia a un tiempo de vida corto en el estado electrónico excitado. La progresión vibracional es similar a la observada en el espectro de [CH]<sup>+</sup>, lo que indica que los modos de vibración intramoleculares no se ven perturbados por la generación del dímero.

**[T<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>** El espectro del dímero protonado de timina ([T<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>) se extiende por más de 9000 cm<sup>-1</sup> luego del origen de la transición electrónica que tiene lugar a 33625 cm<sup>-1</sup> (4,17 eV), Figura 5.5. Esta banda se encuentra corrida -3775 cm<sup>-1</sup> con respecto al origen de la transición de [TH]<sup>+</sup> asignada al tautómero EE<sup>+</sup>, que aparece a 37400 cm<sup>-1</sup> (4,63 eV) Sección 5.2. Por otro lado, como ya se mencionó, el tautómero EK<sup>+</sup> de [TH]<sup>+</sup> no se encontró experimentalmente, pero la energía de la transición electrónica para éste, se estimó mediante cálculos teóricos en alrededor de 28600 cm<sup>-1</sup> (3,54 eV). Teniendo esto en cuenta, al igual que lo encontrado para [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, la energía de la transición [T<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> se encuentra entre medio entre medio de la excitación de los dos tautómeros del monómero protonado.

En la región de baja energía del espectro del complejo [T<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> (véase Figura 5.6) se observan transiciones vibracionales bien resueltas de 12 cm<sup>-1</sup> de ancho, que están en el límite de resolución del láser. En contraste, para el monómero protonado se encontró que el ancho de las bandas vibracionales es de alrededor de 100 cm<sup>-1</sup>, lo que se atribuyó a un tiempo de vida corto del estado excitado. Esta diferencia encontrada para el monómero

y el dímero es bastante inesperada, pues no hay razón aparente para que el dímero presente un espectro menos congestionado que el monómero. Por lo que este resultado implica, que la formación del dímero inhibe la desactivación no radiativa, induciendo un aumento del tiempo de vida del estado electrónico excitado para el complejo  $[\text{T}_2\text{H}]^+$ .


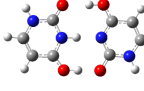
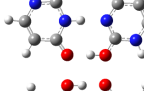
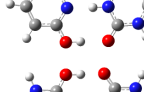
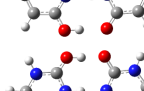
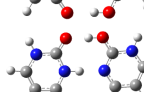
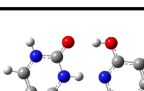
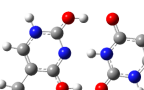

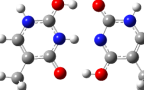
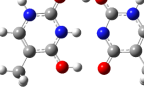


La progresión vibracional observada para el sistema  $[\text{T}_2\text{H}]^+$  no es fácil de asignar debido a la resolución intrínseca del láser, y la pequeña diferencia de energía entre los modos de la progresión (alrededor de  $30\text{ cm}^{-1}$ ). Del cálculo del estado fundamental del dímero, estos modos de baja frecuencia se pueden asignar movimientos de vibracionales intermoleculares fuera del plano. Los modos de vibración intermoleculares en el plano tienen un frecuencia de alrededor de  $120\text{ cm}^{-1}$ .

$[\text{U}_2\text{H}]^+$  Al igual que para el monómero de citosina protonada, en el caso del  $[\text{UH}]^+$  también se encontraron dos bandas de absorción, que se asignaron a los tautómeros  $\text{EE}^+$  y  $\text{KE}^+$ . La banda de absorción que se encuentra a  $31465\text{ cm}^{-1}$  ( $3,90\text{ eV}$ ) corresponde al tautómero  $\text{KE}^+$  y presenta transiciones vibracionales estrechas, mientras que la banda que aparece a mayor energía,  $38957\text{ cm}^{-1}$  ( $4,83\text{ eV}$ ), corresponde al tautómero  $\text{EE}^+$  y presentan un considerable ensanchamiento de las bandas vibracionales. Esta diferencia se ha adjudicado distintos tiempos de vida del estado electrónico excitado de ambos tautómeros. Al igual que para los demás dímeros estudiados, el origen de la transición electrónica del  $[\text{U}_2\text{H}]^+$  se encuentra entre medio,  $34850\text{ cm}^{-1}$  ( $4,32\text{ eV}$ ), de las transiciones electrónicas de los monómeros.

Como puede observarse en la Figura 5.6, a diferencia de lo observado para  $[\text{T}_2\text{H}]^+$ , las bandas vibracionales del  $[\text{U}_2\text{H}]^+$  son más estrechas que las de la banda azul del  $[\text{UH}]^+$  ( $\text{EE}^+$ ) pero más anchas que las de la banda roja del  $[\text{UH}]^+$  ( $\text{KE}^+$ ). Otra vez, el ensanchamiento observado puede deberse a congestión espectral o ha un tiempo de vida corto del estado electrónico excitado. En este caso, debido a la similitud estructural entre la timina y el uracilo, no parecería haber razones evidentes para pensar que en el espectro del  $[\text{U}_2\text{H}]^+$  tenga que existir mayor congestión espectral que para el complejo  $[\text{T}_2\text{H}]^+$ .



TABLA 5.3: Estructura y energía de excitación electrónica de los dímeros protonados de bases pirimidínicas. (a) Las estructuras y energías en el estado fundamental fueron calculados al nivel MP2/cc-pVDZ. (b) Las estructuras y energías de los estados excitados fueron calculados al nivel ADC(2)/cc-pVDZ. (c) Regla empírica utilizada para asignar las transiciones electrónicas a partir de la energía de excitación vertical,  $\delta = (E_{vert} - 0,5eV) - E_{exp}$ , donde la  $E_{vert}$  empleada es la correspondiente al primer estado electrónico excitado. (d) Energía de excitación al primer estado de transferencia de carga. (e) Opt  $C_s$  corresponde a la energía de transición adiabática al estado  $S_1$ , con restricción de simetría  $C_s$ . (f) La estructura encontrada para el dímero  $[C_2H]^+$  es consistente con la encontrada en trabajos previos. [144, 145] (g) La isomería cis-trans hace referencia a la orientación de los enlaces N-H, donde ocurre la formación del enlace glicosídico. (h) PT hace referencia a la ocurrencia de una transferencia de protón durante la optimización. La estructura inicial trans  $EK^+ \cdots KE$  converge a trans  $EE^+ \cdots KK$ . (i) En este caso la estructura inicial  $EE^+ \cdots KK$  converge en el estado excitado a la estructura  $EK^+ \cdots KE$ .

Dímero	$S_0^{(a)}$	$E_{(exp)}$	$E_{(vert)}^{(b)}$	$E_{(vert)}S_2^{(b)}$	$\delta^{(c)}$	TC <sup>(d)</sup>	Opt $C_s$ <sup>(e)</sup>
$[C_2H]^+$							
Cis $KA^+ \cdots AK$  (f)	0	4,32	4,91	4,96	0,09	5,73	4,44
$[U_2H]^+$							
Trans $KE^+ \cdots EK$  (g)	0	4,32	4,83	4,93	0,01	<5,8	4,35
Trans $EK^+ \cdots KE$  PT <sup>(h)</sup>							
Trans $EE^+ \cdots KK$ 	0,07		5,29	5,33	0,47	6,12	PT <sup>(i)</sup>
Cis $EE^+ \cdots KK$  (g)	0,084		5,44	5,47	0,62		
Cis $EK^+ \cdots KE$ 	0,124		4,94	4,99	0,12		
Cis $KE^+ \cdots EK$ 	0,15		4,90	5,20	0,08		
$[T_2H]^+$							
Trans $KE^+ \cdots EK$ 	0	4,17	4,68	4,80	0,01	5,85	4,23
Trans $EE^+ \cdots KK$ 	0,031		5,17	5,19	0,50	5,77	PT <sup>(i)</sup>
Cis $EE^+ \cdots KK$ 	0,04		5,19	5,39	0,52		
Cis $EK^+ \cdots KE$ 	0,084		4,84	4,99	0,17		
Cis $KE^+ \cdots EK$ 	0,108		4,73	5,25	0,06		
Trans $EK^+ \cdots KE$ 	0,19		5,41	5,49	0,74		

### 5.3.3.2. Estructuras en el estado fundamental

Se encontró que, los dímeros que interactúan más fuertemente son aquellos en los que se maximiza el número de puentes hidrógeno entre los monómeros. Aquellos dímeros formados por interacción de tipo  $\pi$  entre los monómeros son al menos 1 eV menos estables que los dímeros formados por interacción de tipo  $\sigma$ . Para el caso del dímero  $[\text{C}_2\text{H}]^+$ , sólo una estructura permite la interacción mediante tres puentes hidrógeno entre ambas bases. Esta estructura consta de dos moléculas de citosina en el estado ceto-amino (KA), donde una de ellas se encuentra protonada en el N(3). Este isómero se denominó  $\text{KA}^+\cdots\text{AK}$ . Por otro lado, para los sistemas  $[\text{T}_2\text{H}]^+$  y  $[\text{U}_2\text{H}]^+$  se pueden obtener diversas estructuras isoméricas en las que ambas bases interactúan mediante tres puentes hidrógeno. En la Tabla 5.3 se muestran las estructuras de los isómeros de menor energía encontrados y las energías relativas de sus respectivos estados electrónicos fundamentales ( $S_0$ ), las energías de excitación vertical a los dos primeros estados electrónicos excitados ( $E_{vert}$  y  $E_{vert}S_2$ ) y al estado de transferencia de carga (TC). También se muestra el parámetro empírico  $\delta = (E_{vert} - 0,5\text{eV}) - E_{exp}$  utilizado para llevar a cabo la asignación espectral y por último la energía de excitación adiabática calculada con restricción de simetría  $C_s$  (Opt  $C_s$ ).

Podría esperarse que la estructura del homodímero más estable, sea el resultado de la unión de dos monómeros en sus estructuras neutras y protonadas más estables. Por ejemplo en el caso de  $[\text{UH}]^+$ , la estructura  $\text{EE}^+$  es 0,08 eV más estable que el isómero  $\text{KE}^+$ , mientras que para el U neutro la estructura  $\text{KK}$  es 0,5 eV más estable que el tautómero  $\text{EK}$ . Cuando ambas estructuras están separadas, el sistema  $\text{EE}^+ + \text{KK}$  es 0,6 eV más estable que el sistema  $\text{KE}^+ + \text{EK}$  (Figura 5.8). Sin embargo el complejo  $\text{KE}^+\cdots\text{EK}$  es la estructura más estable encontrada para  $[\text{U}_2\text{H}]^+$ , y la energía de excitación calculada para este último está en buen acuerdo con la energía de la transición encontrada experimentalmente, (Tabla 5.3). Lo mismo es válido para  $[\text{T}_2\text{H}]^+$ . La mayor estabilidad de los isómeros con estructura  $\text{KE}^+\cdots\text{EK}$  probablemente se deba a su mayor capacidad de estabilizar la carga por resonancia entre las dos bases. Esto muestra, que la estructura más estable del dímero protonado no se puede deducir directamente de las estabilidades de los monómeros.

Para  $[\text{U}_2\text{H}]^+$ , en el estado electrónico fundamental del isómero trans  $\text{KE}^+\cdots\text{EK}$ , los cálculos a nivel MP2/cc-pVDZ localizan el protón en una de las moléculas (distancia NH

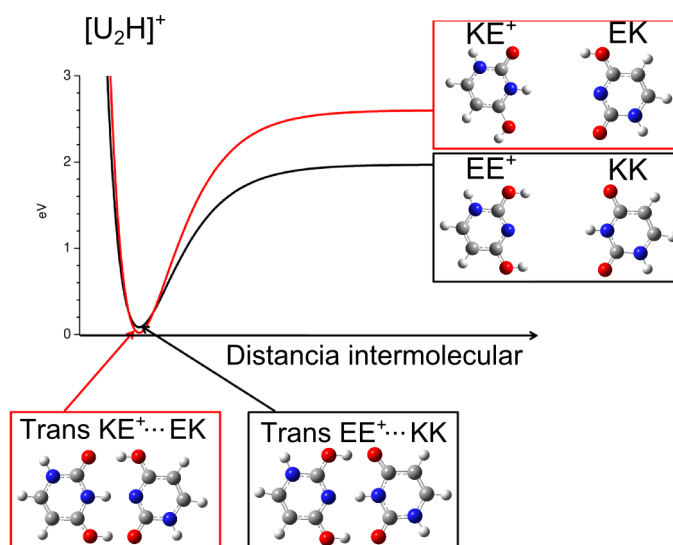


FIGURA 5.8: Esquema de la curva de energía potencial de disociación del dímico  $[U_2H]^+$ . A distancias grandes la estructura  $EE^+\cdots KK$  es la más estable, sin embargo a la distancia de equilibrio el isómero  $KE^+\cdots EK$  es el más estable.

= 1,07 Å). Sin embargo, el estado de transición de la coordenada  $N\cdots H\cdots N$ , calculado al mismo nivel de teoría, donde el protón se ubica entre medio de ambas moléculas se encuentra a  $875\text{ cm}^{-1}$  (0,11 eV) por encima de la energía de los dos isómeros  $KE^+\cdots EK$  en los cuales el protón se encuentra sobre una u otra molécula. Esta energía es ligeramente menor que la energía del punto cero del modo de estiramiento N-H. Por lo que, probablemente el protón se mueva de una base a la otra, dando lugar a una estructura de tipo Zundel para el  $[U_2H]^+$  en el estado electrónico fundamental. El mismo razonamiento puede generalizarse para los dímeros  $[T_2H]^+$  y  $[C_2H]^+$ , dado que para éstos, la energía del estado de transición sólo se modifica ligeramente, siendo  $882\text{ cm}^{-1}$  (0,12 eV) y  $1057\text{ cm}^{-1}$  (0,13 eV), para el primero y el segundo respectivamente.

Por otro lado, las estructuras  $KE^+\cdots EK$  y  $EE^+\cdots KK$  de  $[U_2H]^+$  y  $[T_2H]^+$ , también se pueden interconvertir por medio de una TP en la coordenada  $O\cdots H\cdots O$ , desde un oxígeno del  $KE^+$  (que pasaría ser una estructura  $KK$ ), a un oxígeno del isómero  $EK$  neutro, (que pasaría a ser  $EE^+$ ). La barrera para esta transferencia de protón en el estado fundamental del  $[U_2H]^+$  es de alrededor de  $700\text{ cm}^{-1}$  (0,08 eV), Figura 5.9, mientras que para el  $[T_2H]^+$  la misma tiene una energía de  $600\text{ cm}^{-1}$  (0,07 eV). Esta barrera probablemente no sea lo suficientemente “alta” para localizar el protón en un isómero u otro, por lo que la noción de la existencia de un isómero localizado puede carecer de sentido real.

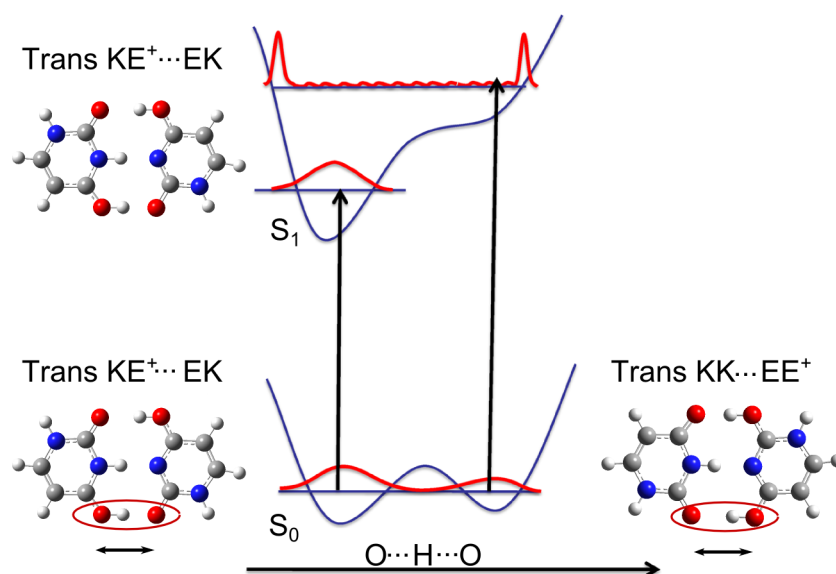


FIGURA 5.9: Esquema de la energía potencial del  $[U_2H]^+$  en la coordenada de estiramiento  $O \cdots H \cdots O$ . La curva inferior y la superior representan esquemáticamente el estado electrónico fundamental y el excitado, respectivamente. La línea azul indica el nivel  $\nu = 0$ . El isómero de la izquierda tiene configuración  $KE^+ \cdots EK$  y el de la derecha  $EE^+ \cdots KK$ .

### 5.3.3.3. Asignación de las transiciones electrónicas

Como se discutió en la Sección 5.2, para el caso de los monómeros protonados de las bases del ADN/ARN, la asignación espectral de los diferentes conformeros puede realizarse mediante la comparación del origen de la transición electrónica obtenida experimentalmente, y la excitación vertical desde el estado electrónico fundamental al excitado, mediante la regla empírica dada por la Ecuación 5.2. En el caso de los homodímeros protonados, para los cálculos de los estados electrónicos excitados sólo se consideran los isómeros de menor energía, no más de 0,2 eV por encima de la estructura más estable, debido a la baja temperatura a la que se termalizan los iones en el experimento impide la generación de isómeros menos estables. En la Tabla 5.3 se muestran los valores obtenidos para  $\delta = (E_{vert} - 0,5eV) - E_{exp}$ . Vale la pena destacar que para los casos de  $[U_2H]^+$  y  $[T_2H]^+$ , los isómeros con estructura  $EE^+ \cdots KK$  son sólo ligeramente menos estables que los correspondientes isómeros  $KE^+ \cdots EK$ . Sin embargo, los primeros no pueden ser responsables de la absorción encontrada experimentalmente, dado que, la estimación dada por la Ecuación 5.2 para la transición  $S_1 \leftarrow S_0$  da como resultado valores muy distintos a las energías de excitación obtenidas experimentalmente.

Como se mencionó en la Sección 5.3.2.1, en la mayoría de los casos, para los monómeros protonados de las bases del ADN/ARN se encuentra que no es posible optimizar la estructura del estado electrónico excitado, debido a que las deformaciones del anillo aromático llevan a intersecciones cónicas, donde los cálculos fallan debido al mezclado de estados electrónicos.[126, 146] Lo mismo es válido para los homodímeros protonados, para los cuales también se encontró que las estructuras más estables en el estado fundamental son planas. Por lo que para las estructuras más estables mostradas en la Tabla 5.3 se optimizó el primer estado electrónico excitado con restricción de simetría  $C_s$ . Las energías de excitación adiabáticas obtenidas bajo esta aproximación se muestran en la última columna de la Tabla 5.3. Puede observarse que estas energías calculadas están en muy buen acuerdo con las energías obtenidas experimentalmente y las estimaciones realizadas a partir de la Ecuación 5.2, lo que refuerza la asignación de las transiciones experimentales a los isómeros más estables, e indica que las estructuras del estado electrónico excitado para los dímeros son planas o sólo están ligeramente deformadas.

La diferencia de energía en el estado  $S_0$  entre los isómeros  $EE^+\cdots KK$  y  $KE^+\cdots EK$  (tanto de  $[U_2H]^+$  como  $[T_2H]^+$ ) es pequeña, además, como se discutió en la sección anterior, estos dos isómeros pueden interconvertirse fácilmente por una reacción de transferencia de protón. Por esto, no puede descartarse la presencia de los isómeros  $EE^+\cdots KK$ , sin embargo, en los espectros experimentales no se observan las bandas de absorción predichas mediante cálculo para éstos. Este hecho puede entenderse considerando que la optimización con restricción de simetría  $C_s$ , del primer estado excitado  $\pi\pi^*$  del isómero  $EE^+\cdots KK$  lleva a la estructura  $KE^+\cdots EK$  a través de una reacción de transferencia de protón sin barrera de reacción (Tabla 5.3). La curva de energía potencial a lo largo de la coordenada  $O-H\cdots O$  se esquematiza en la Figura 5.9 para el caso del  $[U_2H]^+$ . La diferencia de energía entre las transiciones verticales de ambos isómeros es de alrededor de 0,5 eV, por lo que la excitación del isómero  $EE^+\cdots KK$  llevará al sistema a un estado con gran exceso de energía vibracional, alta densidad de estados y por tanto factores de Franck Condon pequeños para la transición. Es por esto, que es de esperar que la absorción desde los isómeros  $EE^+\cdots KK$  estén enmascarada en el continuo de absorción que presentan los isómeros  $KE^+\cdots EK$  a altas energías.

Vale la pena recalcar, que aunque en el estado fundamental la función de onda vibracional no se encuentra localizada en uno de los tautómeros por lo cual no se puede definir cual es el isómero presente, la excitación al origen de la transición electrónica

$S_1 \leftarrow S_0$  localiza el protón en el tautómero  $KE^+ \cdots EK$ , ya que las energías de excitación y los factores de Franck Condon son diferentes para ambos isómeros. Entonces, aunque en el estado fundamental el protón está deslocalizado y la noción de la existencia de un único tautómero no tiene sentido estrictamente, en el estado electrónico excitado el protón sí está localizado y por tanto sí se puede pensar en la existencia de un único tautómero.

#### 5.3.3.4. Estado electrónico excitado de los dímeros protonados

Para las estructuras más estables de los dímeros, la transición al primer estado electrónico excitado es de carácter  $\pi\pi^*$  y está localizada en la entidad protonada del dímero. Por otro lado, la excitación al segundo estado electrónico excitado está localizada en la entidad neutra. En un trabajo previo acerca de la espectroscopía del dímero protonado de benceno, la primera transición electrónica se asignó a una TC desde el HOMO de la “parte neutra” del dímero, al LUMO de la entidad iónica.[147] Esta transferencia de carga origina una banda de absorción corrida fuertemente a menores energías, en la zona visible del espectro. Una situación similar se observó en el caso de moléculas aromáticas policíclicas,[132] para las cuales la transición electrónica de menor energía también se caracterizó como una banda de TC corrida hacia el rojo del espectro comparado con la transición de menor energía de las mismas especies neutras. En el caso de los dímeros de las bases pirimidínicas protonadas, las transiciones asociadas con transferencia de carga ( $n\pi^*$  y  $\pi\sigma^*$ ) son al menos el tercer estado excitado, y se encuentran como mínimo 1 eV por encima del estado  $\pi\pi^*$ . En el estado fundamental del dímero protonado de benceno la carga está 100 % localizada en la parte protonada de la molécula, mientras que para el caso de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas, la carga está deslocalizada aproximadamente un 20 % en la parte “neutra” de la molécula.

La energía de la transición 0-0 de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas son intermedias entre las energías de excitación de los monómeros en sus formas  $EA^+$  (o  $EE^+$ ) y  $KA^+$  (o  $EK^+$ ), como se puede ver en la Figura 5.10. Este efecto puede deberse a la deslocalización del protón entre las dos moléculas del dímero.

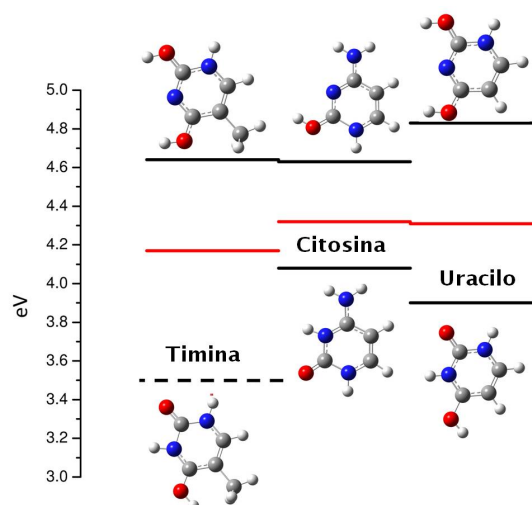


FIGURA 5.10: Esquema de la energía de las transiciones electrónicas para los diferentes tautómeros de las bases protonadas (líneas negras) y los homodímeros protonados (líneas rojas). En el caso de la timina protonada, la transición electrónica del tautómero EK<sup>+</sup> (línea de trazos) se obtuvo mediante cálculos

### 5.3.3.5. Tiempo de vida de los homodímeros protonados y comparación con los monómeros protonados

Los resultados de la estimación de los tiempos de vida de los homodímeros protonados se presentaron en la Sección 5.2.2. En la Tabla 5.4 se resumen los resultados obtenidos de los monómeros protonados y los dímeros protonados junto con su asignación estructural y el origen de la transición electrónica para facilitar su comparación.

En la Tabla 5.4 puede verse que el caso del dímero  $[T_2H]^+$  es notable, debido a que la dimerización produce una gran disminución del ensanchamiento de las bandas vibracionales. En el espectro FUV de  $[T_2H]^+$  se observó una progresión de baja frecuencia con una separación entre bandas de  $33\text{ cm}^{-1}$  y un ancho de banda de  $12\text{ cm}^{-1}$  que está en el límite de resolución espectral del láser, mientras que el ancho de banda obtenido para la  $[TH]^+$  es de  $(91\pm 20)\text{ cm}^{-1}$ . El ensanchamiento en el caso del monómero protonado se asoció a un tiempo de vida corto en el estado electrónico excitado, por lo que la formación del dímero aumenta el tiempo de vida de dicho estado en alrededor de dos ordenes de magnitud.

Una posible explicación de la diferencia en el comportamiento encontrado entre el dímero protonado y el monómero protonado de la timina es que, la comparación realizada es entre diferentes tautómeros. En el isómero asignado al dímero, tanto la

TABLA 5.4: Estimación del tiempo de vida del estado electrónico excitado para los monómeros y dímeros protonados de bases pirimidínicas del ADN/ARN, junto con sus correspondientes asignaciones estructurales.

Base Protonada	Origen de la Transición (cm <sup>-1</sup> )	Tiempo de Vida estimado (fs)
[U <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> KE <sup>+</sup> ...EK	34850	160 ± 20
[UH] <sup>+</sup> KE <sup>+</sup>	31465	≥330
[UH] <sup>+</sup> EE <sup>+</sup>	38957	40 ± 20
[T <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> KE <sup>+</sup> ...EK	33625	>5000
[TH] <sup>+</sup> EE <sup>+</sup>	37424	58 ± 20
[C <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> KA <sup>+</sup> ...AK	34850	85 ± 20
[CH] <sup>+</sup> KA <sup>+</sup>	32900	133 ± 20
[CH] <sup>+</sup> EA <sup>+</sup>	37305	98 ± 20

parte protonada como la neutra de la molécula se encuentran en la forma tautomérica KE. Mientras que el único tautómero observado para el monómero protonado [TH]<sup>+</sup> es el EE<sup>+</sup>. Lamentablemente, el tautómero KE<sup>+</sup> de [TH]<sup>+</sup> no se observó experimentalmente, lo que excluye la posibilidad de realizar una comparación directa.

Otra posible explicación a la diferencia encontrada, es que el tiempo de vida en el monómero esté controlado por el mecanismo de pérdida de H a través de un estado disociativo  $\pi\sigma^*$  NH/OH, como ocurre en muchos sistemas aromáticos protonados [148, 149] y neutros.[150] En estos casos, generalmente la formación de complejos con moléculas que prevengan la pérdida directa del átomo de H aumenta el tiempo de vida del estado excitado.[150, 151] Sin embargo, en el caso de los monómeros protonados no se observó el canal de fragmentación del átomo de H (Sección 5.2), que constituye una evidencia fundamental de la existencia de este tipo de mecanismos.[148] Una posible explicación de la ausencia del canal de fragmentación del átomo de H sería la existencia de un acoplamiento entre el estado  $\pi\sigma^*$  y el estado fundamental, lo que conduciría a un proceso de conversión interna rápido sin la eliminación de H. [148] Cualquiera de estos dos procesos que involucren el estiramiento del enlace OH, se encuentran bloqueados en el caso de los dímeros.

Para los otros dos dímeros estudiados ([C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> y [U<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>), las bandas vibracionales son más anchas que las correspondientes a las de sus monómeros protonados en igual estado tautomérico. Ésto indica que la formación del dímero reduce el tiempo de vida en el estado excitado aunque no de manera significativa. Para aportar información a la



causa de la disminución del tiempo de vida del estado excitado, es necesario realizar experimentos con mayor resolución espectral, o espectroscopía de doble resonancia. Sin embargo, una posible explicación podría estar enmarcada en la deslocalización del protón en el estado electrónico fundamental.

## 5.4. Conclusiones

En lo que respecta a las bases protonadas del ADN/ARN, se obtuvo un conjunto completo de datos experimentales acerca de sus propiedades espectroscópicas, y se realizó una asignación estructural de la especies presentes bajo las condiciones experimentales empleadas. En los casos que la comparación entre la base neutra y protonada fue posible, se observó que la protonación no induce un cambio drástico en la energía de la excitación electrónica, a diferencia de lo observado en otras especies aromáticas. En cuanto al tiempo de vida en el estado excitado, al igual que se observa para las bases neutras, los tautómeros protonados de relevancia biológica presentan tiempo de vida cortos. Sólo uno de los tautómeros de  $[\text{UH}]^+$  y el único detectado de la  $[\text{GH}]^+$  tienen tiempos de vida largos.

En este capítulo además, se presentaron los espectros de fotofragmentación UV de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas del ADN/ARN. Los espectros muestran transiciones vibracionales relativamente estructuradas, lo que indica que el tiempo de vida del estado electrónico excitado es del orden de unas pocas decenas de fs, e incluso mayor para el dímero de timina. El caso de  $[\text{T}_2\text{H}]^+$  es sorprendente pues se observa un espectro con buena resolución, al contrario de lo encontrado para el monómero protonado, lo que indica que la formación del dímero produce un aumento del tiempo de vida del estado electrónico excitado. La absorción de los dímeros ocurre entre medio de la absorción de los dos tautómeros encontrados para los correspondientes monómeros protonados ( $\text{EA}^+/\text{EE}^+$  y  $\text{KA}^+/\text{KE}^+$ ) y los cálculos de estructura electrónica muestran que la transición, en el caso de los dímeros está localizada en la entidad protonada. La banda de absorción de los dímeros está corrida más de 0,2 eV respecto a los monómeros protonados, lo que sugiere que la espectroscopía de absorción podría utilizarse para monitorer la formación de dímeros en fase condensada.

Los cálculos de estructura electrónica muestran que, en el estado fundamental de los dímeros, los protones N-H y O-H involucrados en los enlaces de puente hidrógeno intermoleculares, no se encuentran localizados en una de las bases debido a que las energías de los estados de transición para las coordenadas de interconversión  $N \cdots H \cdots N$  y  $O \cdots H \cdots O$  son pequeñas.

Los datos experimentales aquí mostrados sientan un punto de partida para el estudio de las propiedades fotofísicas de las bases del ADN/ARN protonadas. Por otro lado pueden ser utilizados como punto de referencia para estudiar por comparación, el efecto del cambio de la naturaleza del catión y/o la estructura molecular, sobre la energía de excitación y los tiempos de vida del estado electrónico excitado. Además estos resultados pueden servir para probar la eficiencia de métodos *ab initio*, en particular, en lo que concierne a la descripción de mecanismo de desactivación no radiativa.

## Capítulo 6

# Interacción de Citosina con $\text{Ag}^+$

---

## 6.1. Introducción

Brevemente, como se discutió en la introducción general de esta tesis, el ADN es una de las biomoléculas más importantes de la naturaleza y juega un rol central en el desarrollo de la vida. Esta molécula polimérica está constituida por 4 monómeros (llamadas bases desoxiribonucleicas), que forman dos pares complementarios adenina-timina (A-T) y guanina-citosina (G-C). Estas cuatro bases constituyen el alfabeto para la codificación del código genético, y el reconocimiento específico mediante puentes hidrógeno entre C-G y A-T, es fundamental para la correcta preservación y transferencia de la información codificada en el ADN.[4]

Las propiedades de las bases del ADN y de sus dímeros en fase gaseosa han sido extensivamente exploradas, y en trabajos recientes se han revisado los resultados más destacados en cuanto al estudio del tautomerismo, estructuras de reconocimiento de puente hidrógeno y la fotoquímica y fotoestabilidad de dichas moléculas y complejos.[58–60] En general el mayor esfuerzo se ha visto focalizado en estudiar las propiedades de los pares de bases de Watson-Crick (WC), que constituyen la estructura secundaria de la doble hélice canónica del ADN. Sin embargo, es sabido que el ADN puede adoptar otras estructuras macromoleculares, cuyas estabildades son fuertemente dependientes de la secuencia de bases que forma el ADN [32] y variables del ambiente químico como el pH,[32] presencia de ligandos [100, 152, 153] y cationes [18, 154], entre otras.

En este contexto, el estudio de las interacciones, del ADN en su conjunto, o de las bases individuales, con especies que puedan alterar su estructura es de gran interés. En particular, el estudio detallado de la interacción entre bases del ADN y cationes metálicos ha cobrado gran relevancia en los últimos años, debido al descubrimiento de que, dicho tipo de interacción puede estabilizar “reordenamientos” locales en la estructura del ADN.[21] Además, éste tipo de interacciones se han utilizado para generar pares de bases artificiales,[21] (comúnmente llamados pares de bases mediados por metales, PBMM) y estos pares exógenos al ADN han demostrado ser útiles para el desarrollo de nuevas tecnologías,[155, 156] cadenas de ADN artificiales [154, 157] y han demostrado su potencial aplicación como nuevas letras del código genético.[21]

En el desarrollo de los pares de bases artificiales mediados por metales, la idea original de Lee y colaboradores [158] fue remplazar el átomo de hidrógeno involucrado en

el enlace de puente hidrógeno, por un catión metálico. De esta forma, se logró por primera vez estabilizar dímeros de ADN utilizando Zn<sup>+2</sup> y otros cationes metálicos divalentes, donde dichos cationes ocupan el lugar del átomo de hidrógeno en la interacción entre las cadenas.

Al día de hoy se han desarrollado una gran diversidad de PBMM, dentro de éstas, es sabido que los “missmatching” T-T y C-C pueden convertirse en pares muy estables T-Hg<sup>+</sup>-T[19, 159, 160] y C-Ag<sup>+</sup>-C[20, 161] por la incorporación de Hg<sup>+2</sup> y Ag<sup>+</sup> conservando la forma canónica del ADN. Estas interacciones son altamente específicas, y la generación de agregados C-Ag<sup>+</sup>-C ha llevado a la utilización de cadenas de ADN ricas en C como matriz para la síntesis de clusters altamente fluorescentes del tipo ADN-Ag<sub>n</sub> [38, 49, 51, 162], los cuales se han posicionado como potenciales marcadores biológicos y sondas fluorescentes para microscopía.

Los sistema Ag<sub>n</sub>-ADN poseen dos bandas intensas de absorción, una en la región visible del espectro que es sintonizable con la secuencia de oligonucleótidos empleados, y otra en la región UV del espectro, que es común a todos los fluoróforos sin importar la posición de la banda visible. La banda de absorción UV está localizada en la región espectral donde se espera que absorban las cadenas de oligonucleótidos (260-270 nm, 38460 cm<sup>-1</sup>-37000cm<sup>-1</sup>). Fyngenson y colaboradores,[49] mostraron que la excitación de la banda UV produce el mismo espectro de emisión que la excitación de la banda visible, y descartó que dicha excitación se deba a estados electrónicos de alta energía como originalmente se había propuesto,[57] sino que se debe a la excitación del oligonucleótido. Esta conclusión abre un nuevo interrogante puesto a que se conoce muy bien que las bases del ADN poseen tiempos de vida cortos en sus estados electrónicos excitados y rendimientos cuánticos de fluorescencia extremadamente bajos,[58-60] por lo que cabe plantearse ¿por qué razón la interacción con Ag<sup>+</sup>/Ag incrementa el rendimiento de fluorescencia en los sistemas Ag<sub>n</sub>-ADN?

Además de la doble hélice canónica del ADN, otro plegamiento macromolecular importante que esta biomolécula puede adoptar es el llamado i-motif, descrito en más detalle en el Capítulo 1. Brevemente, ésta es una estructura tetramérica que se produce en condiciones ligeramente ácidas, en particular, cuando las cadenas son ricas en C.[30] Es sabido que este tipo de plegamiento es muy importante por estar relacionadas con el desarrollo de algunas enfermedades de retardo mental, en particular conocida como

“cromosoma x-frágil”. [31] El i-motif es producido por la interacción de un par de bases C···C entre dos cadenas paralelas, que interacción de manera no convencional mediante una protonación que da lugar a la formación de un par C-H<sup>+</sup>-C. Luego el plegamiento global se estabiliza por intercalación de dos de estos dímeros interaccionando en orientación “cola-cabeza”. [32]

Existen en literatura muy pocos ejemplos de la formación de i-motif a pH fisiológico, [33–35] sin embargo, recientemente Day y colaboradores [36] han demostrado que se puede obtener estructuras del tipo i-motif a dicho pH en presencia de iones Ag<sup>+</sup>, los cuales son responsables de inducir el plegamiento del ADN tomando el lugar del protón.

Más allá del valor que revisten los complejos en donde el ADN interacciona con metales, se encuentran en literatura muy pocos estudios estructurales detallados del plegamiento de este tipo de sistemas, y en general los existentes se refieren a sistemas donde la interacción ADN-catión conserva la doble hélice canónica. [18, 20, 163] Uno de los plegamientos no canónicos más estudiados desde el punto de vista estructural es la formación y estabilización del i-motif mediado por ácido. [32] Sin embargo, para el caso de la formación de los i-motif en presencia de Ag<sup>+</sup> no se ha realizado una caracterización estructural detallada, por lo que, no se puede realizar ningún tipo de predicciones respecto a la estabilidad de la estructura, o posibles deformaciones que sufrirá la macromolécula luego del acomplejamiento con el catión. Es por esto que, la investigación experimental y teórica acerca de interacciones base···base y plegamientos no convencionales en el ADN, es un campo de investigación muy activo.

En una primera aproximación al estudio de la interacción de metales con bases del ADN, Dopfer y colaboradores, haciendo uso de la espectroscopía DMIR y simulaciones computacionales estudiaron la estructura del dímero de piridina estabilizado por el catión Ag<sup>+</sup> en fase gaseosa, utilizando dicha molécula como un modelo biomimético simplificado de las bases pirimidínicas del ADN. [164] Luego, la misma combinación de espectroscopía y simulaciones computacionales fueron empleadas para estudiar la estructura de otros sistemas catión···base como, complejos de cationes alcalinos con citosina, [165] Pb<sup>+2</sup>···Uridina 5-monofosfato, [166] complejos de cisplatino con adenina y guanina [167] y apareamientos no convencionales de bases del tipo Hoogsteen. [168] A

continuación se resumen brevemente los resultados más importantes para el desarrollo de la discusión de este capítulo:

· Uno de los primeros antecedentes acerca del estudio de la interacción de cationes metálicos con bases de ADN fue el trabajo llevado a cabo por Dopfer y colaboradores,[164] en el que se utilizó la piridina (Pyr) como modelo simplificado de las bases pirimidínicas del ADN. Haciendo uso de la espectroscopía DMIR y simulaciones computacionales, en ese trabajo se estudiaron iones del tipo  $[\text{Py}_n\text{Ag}]^+$  (con  $n=1$  y  $2$ ). Para el caso del ión  $[\text{Py}_2\text{Ag}]^+$ , los autores encontraron que la estructura es plana y lineal donde ambas moléculas, mediante una interacción de tipo  $\sigma$ , interaccionan con el catión a través del nitrógeno heterocíclico de las mismas, dicha estructura se muestra en la Figura 6.1. Los autores concluyeron que dicha estructura es la única presente en las condiciones experimentales y descartaron la presencia de complejos con interacción de tipo  $\pi$ . Por otro lado, los autores no lograron obtener el espectro de DMIR del ión de estequometría 1:1 más allá del empleo de un láser de electrones libres acoplado a uno de  $\text{CO}_2$  de alta potencia. Atribuyeron este comportamiento a la alta energía de interacción entre la molécula y el catión.

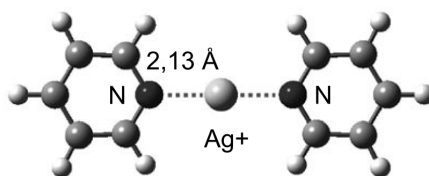


FIGURA 6.1: Estructura determinada para el sistema  $[\text{Pyr}_2\text{Ag}]^+$  por medio de espectroscopía de DMIR y simulaciones computacionales. La imagen fue tomada de la referencia [164]

· Rodgers y colaboradores, también haciendo uso de la espectroscopía DMIR y simulaciones computacionales, estudiaron la agregados de estequemoetria 1:1 surgidos de la interacción de la citosina con cinco de los metales alcalinos  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Cs}^+$ , Figura 6.2. Los espectros de DMIR de todos los agregados formados comparten, similitudes, pero de manera notable, la banda más intensa sufre corrimientos a mayores energías y las eficiencias de fragmentación aumenta, conforme crece el radio del catión estudiado. Los autores atribuyeron este comportamiento a una disminución de la energía de interacción catión...citosina, a medida que aumenta el radio del primero. Por otro lado, la comparación de los espectros experimentales con los simulados para diferentes

isómeros, apunta al hecho de que en las condiciones experimentales, para todo los agregados estudiados, la estructura es similar sin importar la naturaleza del catión. En dicha estructura, la cual se muestra en la Figura 6.2, la citosina se encuentra en su estado tautomérico cetó-amino e interacciona con el catión a través del N(3) y del O del grupo carbonilo. Los autores no encontraron en el espectro experimental bandas correspondientes a isómeros donde la citosina se encuentre en otro estado tautomérico, o estructuras donde la interacción cation...base sea del tipo  $\pi$ . [165]

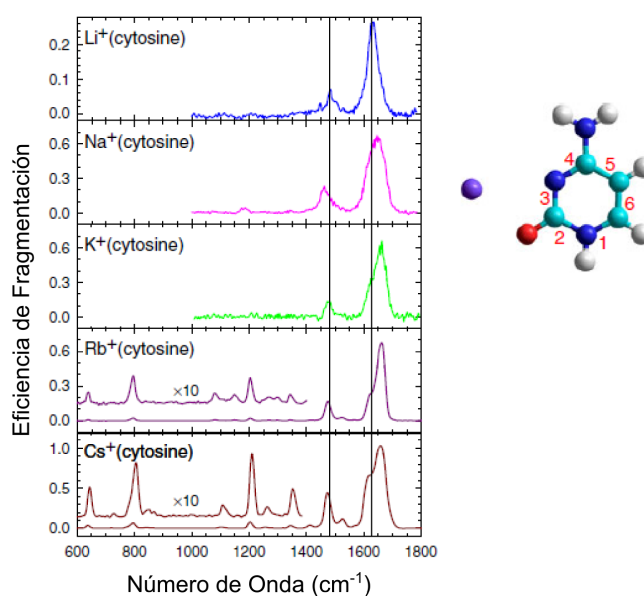


FIGURA 6.2: Espectros de DMIR y estructura determinados para sistemas del tipo  $[C\text{-Metal Alcalino}]^+$ . La imagen fue tomada de la referencia [165].

A la luz de los antecedentes mencionados, se propuso estudiar la interacción de citosina con el catión  $Ag^+$ . Dentro de nuestro esquema "bottom-up" se propuso explorar sistemas de complejidad creciente, empezando por el sistema  $[CAg]^+$  continuando por  $[CAg-H_2O]^+$  y  $[C_2Ag]^+$ , lo que permitió proveer información acerca de cómo la interacción base...catión permite estabilizar pares de bases y plegamientos no canónicos en el ADN. Luego, una vez caracterizado estructuralmente el sistema  $[C_2Ag]^+$ , se logró estudiar la espectroscopía UV de éste mediante la técnica FUV. La comparación de los resultados obtenidos para los sistemas  $[C_2H]^+$  y  $[C_2Ag]^+$  mostró claras diferencias en el tiempo de vida del estado electrónico excitado. Bajo la aproximación de utilizar dichos sistemas como un modelo reduccionista de los fluoróforos  $Ag_n$ -ADN, se obtuvo información a nivel molecular acerca del efecto de la naturaleza del catión en la fotofísica de la banda de absorción UV de las bases del ADN y el origen de la misma.



## 6.2. Resultados

En la presente sección se presentan los resultados obtenidos del estudio de la interacciones de citosina con Ag<sup>+</sup>. En una primera instancia se describen los resultados obtenidos mediante espectroscopía DMIR acoplada a espectrometría de masas para los sistemas [CAg]<sup>+</sup>, [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>, éstos fueron empleados para la determinación estructural de dichos sistemas. Posteriormente, se presentan los resultados obtenidos para el agregado [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> mediante FUV. Los detalles concernientes a las técnicas espectroscópicas y los sistemas experimentales empleados se encuentran en los Capítulos 2 y 3, respectivamente.

### 6.2.1. Espectroscopía de DMIR de los sistemas [CAg]<sup>+</sup>, [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>

Los iones [CAg]<sup>+</sup>, [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> se obtuvieron mediante la inyección de una solución de AgNO<sub>3</sub> 250 μM y citosina (C) 500 μM, utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1). Debido a que en la fuente ESI se genera una gran cantidad de iones, para obtener los espectros de DMIR es necesario aislar la especie de interés, como se describió en el Capítulo 3, en el sistema experimental empleado los iones fueron seleccionados y aislados en la interfaz cuadrupolar de un espectrómetro de masas por resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FTICR). Los espectros de masas obtenidos luego de aislación de los iones [CAg]<sup>+</sup> ( $m/z = 217,8$  y  $219,8$ ), [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> ( $m/z = 235,8$  y  $237,8$ ) y [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> ( $m/z = 329,8$  y  $331,8$ ) se muestran en las Figuras 6.3a, 6.4a y 6.5a respectivamente. En éstas puede verificarse la eficiente aislación de cada ión. La identificación de dichas especies pueden realizarse inequívocamente tanto por su relación  $m/z$ , como por el patrón isotópico que presentan, dado que, en la naturaleza existen dos isótopos del átomo de plata diferenciados por dos unidades de masa atómica, y con abundancias relativas del orden de <sup>107</sup>Ag(51,8%) y <sup>109</sup>Ag(48,2%). En el recuadro de las Figuras 6.3a, 6.4a y 6.5a, graficado en negro, se muestra una ampliación en la región de  $m/z$  correspondiente a cada ión aislado. Además, se muestra en rojo la simulación del espectro de masas para cada ión. En todos los casos puede observarse un excelente acuerdo entre el espectro de masas teórico y el experimental, lo que es evidencia suficiente para la identificación de las especies obtenidas.

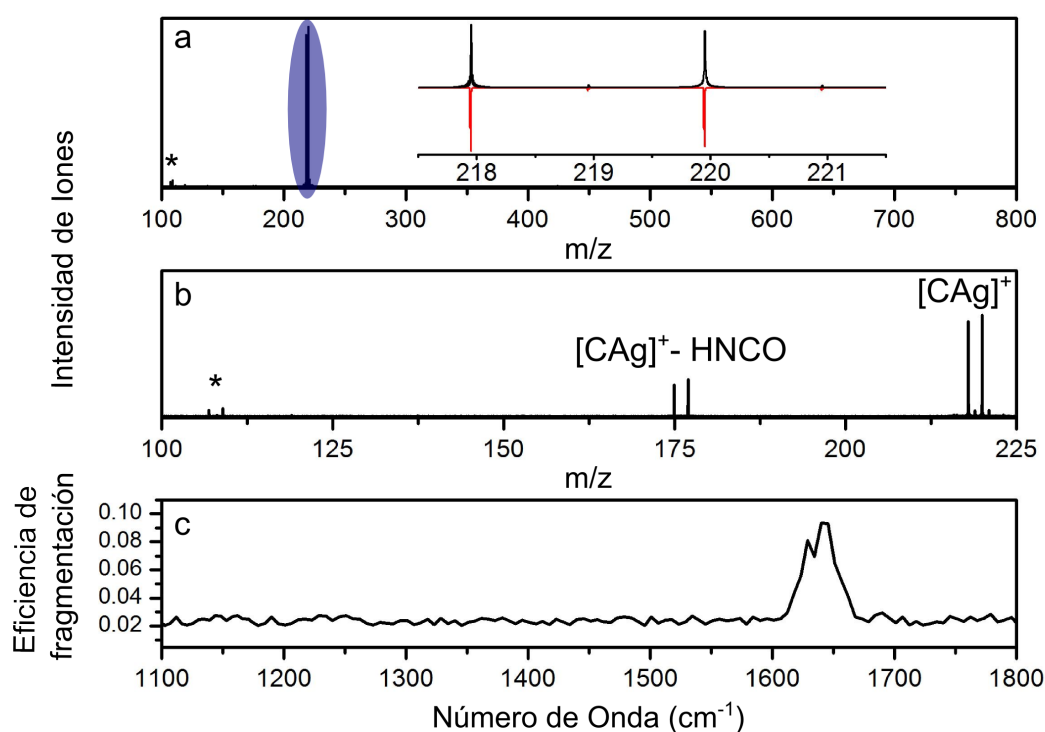


FIGURA 6.3: . (a) Espectro de masas obtenido aislando el ión  $[CAG]^+$  cuando se inyecta una solución de  $AgNO_3$   $250 \mu M$  y  $C$   $500 \mu M$ , utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1). En el recuadro se muestra, en negro, una ampliación en la región de  $m/z$  correspondiente al ión  $[CAG]^+$ , y en rojo, la simulación del espectro de masas para dicha especie. (b) Espectro de masas obtenido luego de la fragmentación del ión  $[CAG]^+$  con fotones de  $1640 \text{ cm}^{-1}$ , donde se observa que el único canal de fragmentación es la pérdida del ácido isocianico (HNCO), las especies marcadas con (\*) corresponden a la presencia del catión plata, éste no es producido por fotofragmentación. (c) Espectro de DMIR obtenido entre  $1100$  y  $1800 \text{ cm}^{-1}$  para el sistema  $[CAG]^+$ .

Con el fin de obtener los espectros de DMIR, una vez aislados los iones de interés, éstos fueron fragmentados mediante la radiación infrarroja emitida por el láser de electrones libres (FEL) instalado en el *Centro Láser IR de Orsay (CLIO)* de la Universidad Paris-sud.

En la Figura 6.3b se muestra el espectro de masas obtenido luego de la irradiación del ión  $[CAG]^+$  con fotones de  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Como puede verse, el único producto de fragmentación encontrado es la pérdida de un grupo de  $m/z = 43$ , que corresponde a la eliminación de ácido isocianico HNCO de la  $C$ . En dicha figura se marca con \* la presencia del catión  $Ag^+$ , la intensidad de dicho ión es independiente de la irradiación con el láser de fragmentación por lo que, no corresponde a un producto de fotofragmentación, sino que, probablemente sea producido por CID. El espectro de DMIR obtenido para

el sistema  $[CAg]^+$  entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  considerando este único canal de fragmentación se muestra en la Figura 6.3c. Éste se obtuvo acoplando la emisión del FEL y un láser de  $CO_2$ , utilizando el máximo tiempo de irradiación de ambos (5 s del FEL y 50 ms del láser  $CO_2$ ) sin filtros ni atenuadores. Aún así, la eficiencia de fragmentación obtenida es baja, alcanzando un máximo de 10% en la única banda observada, que se encuentra centrada en  $1643\text{ cm}^{-1}$ .

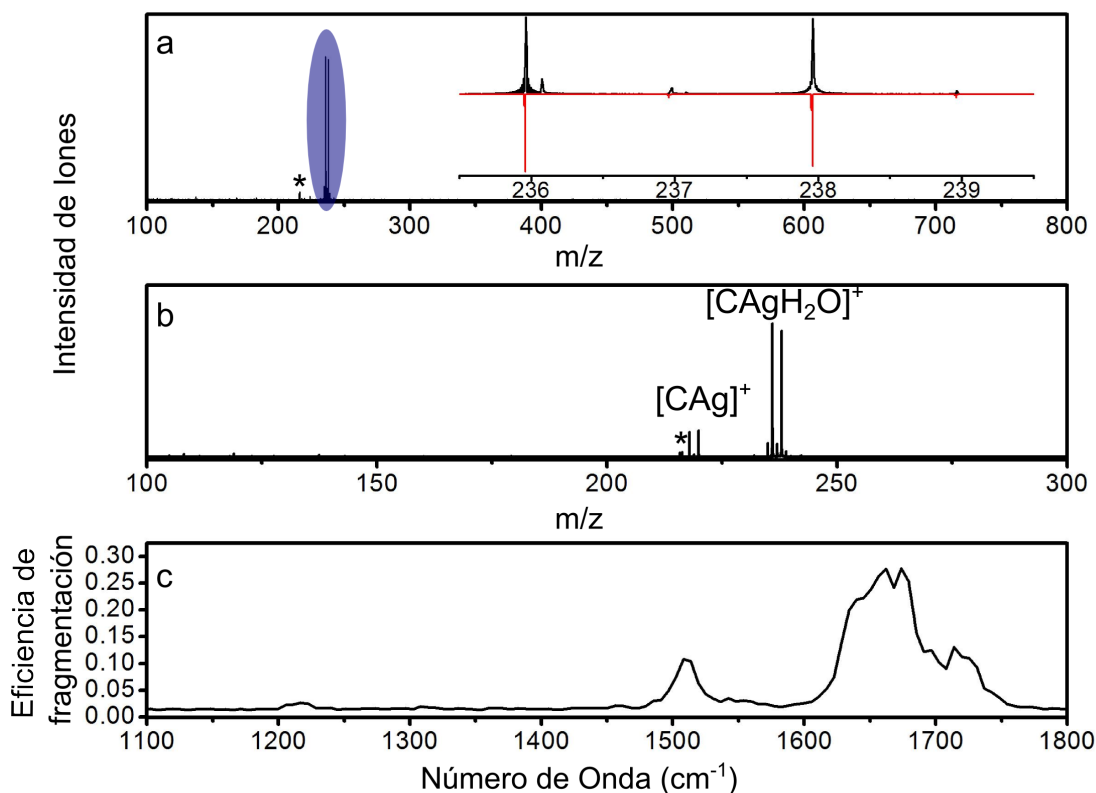


FIGURA 6.4: (a) Espectro de masas obtenido aislando el ión  $[CAg-H_2O]^+$ , cuando se inyecta una solución de  $AgNO_3$   $250\ \mu M$  y  $C$   $500\ \mu M$ , utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1). En el recuadro se muestra, en negro, una ampliación en la región de  $m/z$  correspondiente al ión  $[CAg-H_2O]^+$ , y en rojo, la simulación del espectro de masas para dicha especie. (b) Espectro de masas obtenido luego de la fragmentación del ión  $[CAg-H_2O]^+$  con fotones de  $1667\text{ cm}^{-1}$ , donde se observa que el único producto es la pérdida de una molécula neutra de agua. La especie marcada con (\*) es desconocida, pero se verificó que no es producido por fotofragmentación. (c) Espectro de DMIR obtenido entre  $1100$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$  para el catión  $[CAg-H_2O]^+$ .

En la Figura 6.4b se muestra el espectro de masas obtenido luego de la irradiación del ión  $[CAg-H_2O]^+$  con fotones de  $1670\text{ cm}^{-1}$ . En este caso, el único producto de fragmentación observado es la pérdida de una molécula neutra de agua, lo que es esperable, puesto que este canal de fragmentación involucra la ruptura del enlace más débil del complejo. En dicha figura se marca con \* la presencia de una especie desconocida, se

verificó que la intensidad de éste es independiente de la longitud de onda de irradiación, por lo que no es producida por fotofragmentación y no interviene a la hora de calcular la eficiencia de fragmentación. El espectro de DMIR obtenido para el sistema [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> entre 1100 cm<sup>-1</sup> y 1800 cm<sup>-1</sup> se muestra en la Figura 6.4c, éste se obtuvo combinando 100 ms de irradiación con el FEL y 30 ms de irradiación con el láser de CO<sub>2</sub>. El espectro presenta una banda intensa y ancha cuyo pico se encuentra a 1667 cm<sup>-1</sup> con dos hombros a 1719 cm<sup>-1</sup> y 1639 cm<sup>-1</sup>. Además se observan otras dos bandas de menor intensidad a 1511 cm<sup>-1</sup> y 1215 cm<sup>-1</sup>. Cabe recalcar que el espectro también fue colectado utilizando filtros y atenuadores para la radiación láser con el objeto de eliminar la saturación en caso de existir, sin embargo no se logró mejorar la resolución espectral de la banda centrada a 1667 cm<sup>-1</sup>. Este resultado parece indicar que dicha banda de fragmentación es producto del solapamiento de más de un modo de vibración.

En el caso del ión [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> se encontró que el único canal de fotofragmentación consiste en la pérdida de una molécula neutra de C, lo que da como producto el ión [CAg]<sup>+</sup> de  $m/z = 218,8$  y  $220,8$ . A modo de ejemplo, en la Figura 6.5b se muestra el espectro de masas obtenido cuando el ión padre es irradiado con fotones de 1710 cm<sup>-1</sup>. En esta figura además, pueden observarse iones de baja intensidad en  $m/z = 236,8$  y  $238,8$  que corresponden a los aductos [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, los cuales se producen como consecuencia de la colisión de los iones hijos [CAg]<sup>+</sup> con trazas de H<sub>2</sub>O presente en el espectrómetro de masas. Por tanto, éstos últimos también fueron tenidos en cuenta al momento de calcular la eficiencia de fragmentación. Por otro lado, también se observan la presencia del catión Ag<sup>+</sup> \* cuya intensidad no depende de la longitud de onda de irradiación, por lo que no es producida por fotofragmentación. El espectro de DMIR obtenido entre 1100 cm<sup>-1</sup> y 1800 cm<sup>-1</sup> para éste sistema se muestra en la Figura 6.5c. El mismo se obtuvo mediante la irradiación del ión aislado durante 150 ms con el láser FEL. En esta figura se pueden observar dos bandas pronunciadas a 1645 cm<sup>-1</sup> y 1710 cm<sup>-1</sup> con un hombro a 1690 cm<sup>-1</sup>, y una serie de bandas de menor intensidad a 1210 cm<sup>-1</sup>, 1435 cm<sup>-1</sup>, 1490 cm<sup>-1</sup> y 1525 cm<sup>-1</sup>.

### 6.2.2. Espectroscopía FUV del sistema [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>

Para estudiar la espectroscopía de fragmentación UV (FUV) el ión [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> se obtuvo en fase gaseosa mediante la inyección de una solución de AgNO<sub>3</sub> 250 μM y C

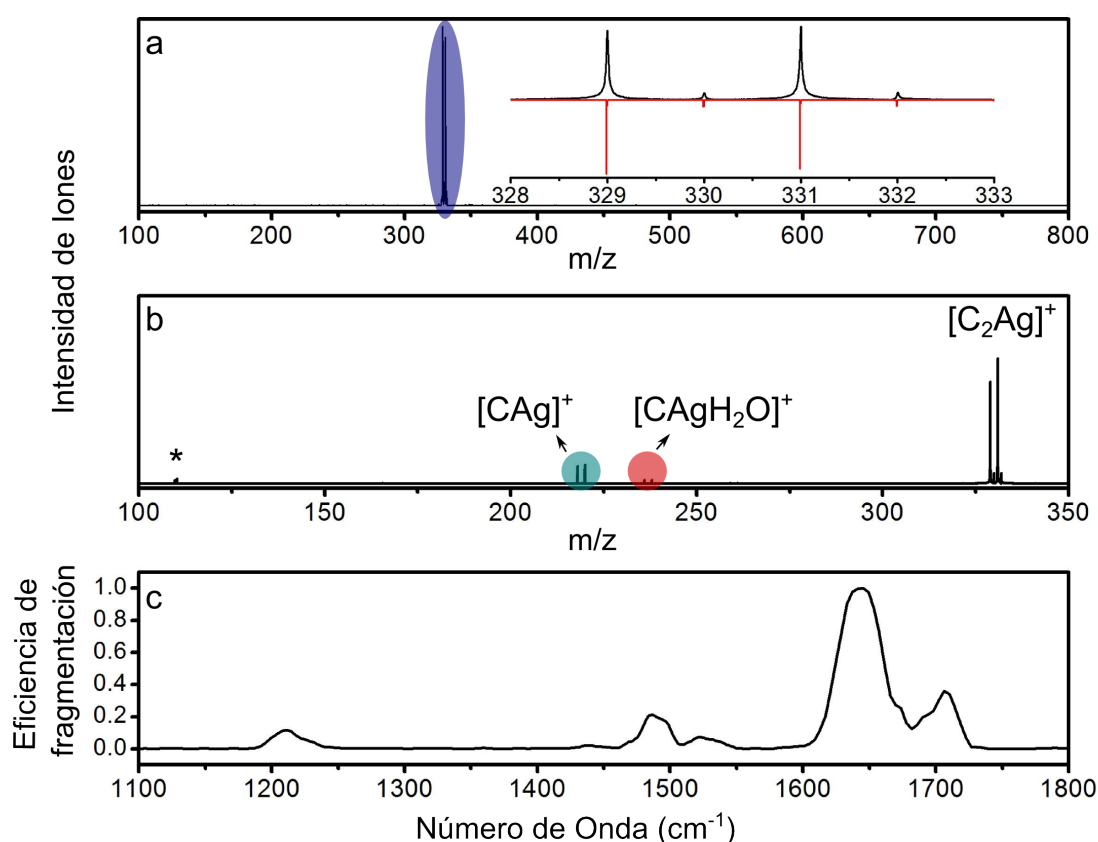


FIGURA 6.5: (a) Espectro de masas obtenido aislando el ión  $[C_2Ag]^+$  cuando se inyecta una solución de  $AgNO_3$  250  $\mu M$  y C 500  $\mu M$ , utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1). En el recuadro se muestra, en negro, una ampliación en la región de  $m/z$  correspondiente al ión  $[C_2Ag]^+$ , y en rojo, la simulación del espectro de masas para dicha especie. (b) Espectro de masas obtenido luego de la fragmentación del ión  $[C_2Ag]^+$  con fotones de 1710  $cm^{-1}$ , donde se observa que le único canal de fragmentación es la pérdida de una molécula neutra de citosina. Además se observó la formación de los aductos de solvatación  $[CAG-H_2O]^+$  a partir de los iones hijos  $[CAG]^+$ , ambas especies fueron tenidas en cuenta para calcular la eficiencia de fragmentación. las especies marcadas con (\*) corresponden a la presencia del catión plata, éste no es producido por fotofragmentación. (c) Espectro de DMIR obtenido entre 1100 y 1800  $cm^{-1}$  para el catión  $[C_2Ag]^+$ .

500  $\mu M$ , utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1). Con el objetivo de obtener el espectro FUV, el ión de interés fue seleccionado y aislados en una trampa cuadrupolar tridimensional (QIT). Los detalles del sistema experimental empleado se encuentran descritos en el Capítulo 3. El espectro de masa del ión  $[C_2Ag]^+$  ( $m/z = 329, 8$  y  $331, 8$ ) obtenido luego de la aislación se muestra en la Figura 6.6a. En esta figura puede verificarse la correcta aislación de la especie de interés. Tal como se mencionó en la sección anterior, tanto la relación  $m/z$  como el patrón isotópico que presenta el ión padre permiten la identificación inequívoca de la especie.

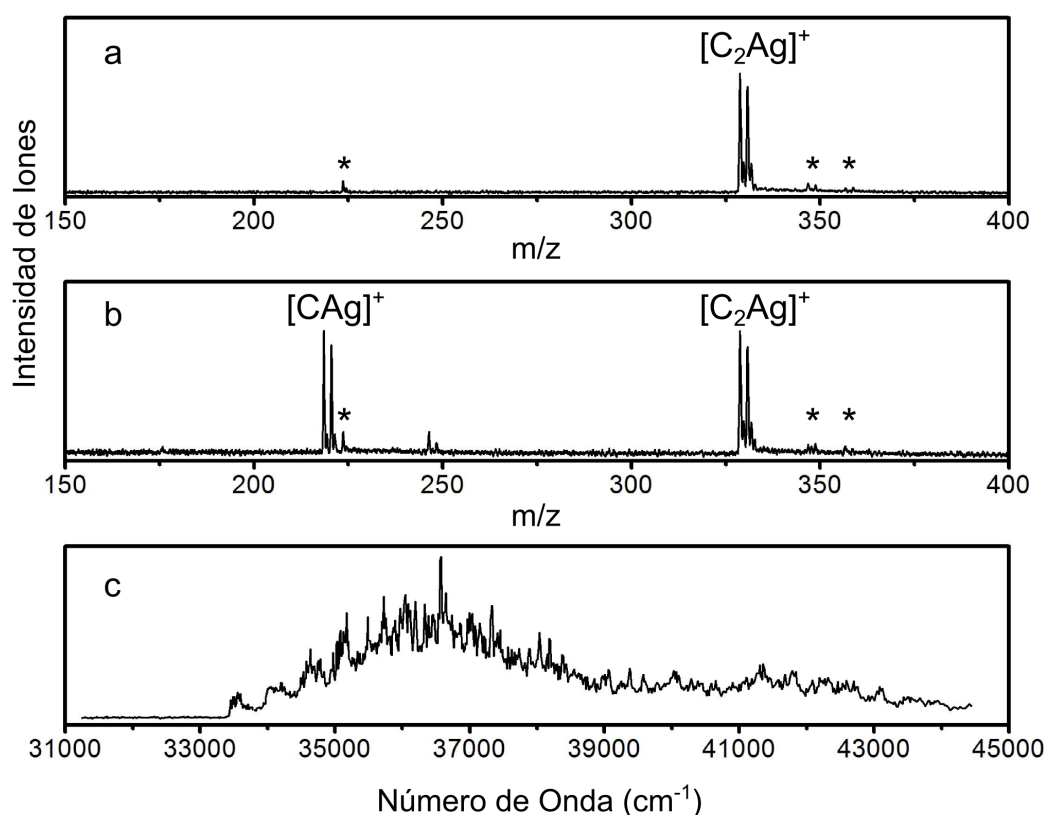


FIGURA 6.6: (a) Espectro de masas obtenido aislando el ión  $[C_2Ag]^+$  cuando se inyecta una solución de  $AgNO_3$   $250 \mu M$  y citosina  $500 \mu M$ , utilizando como solvente una mezcla agua/metanol (1:1).. (b) Espectro de masas obtenido luego de la fragmentación del ión  $[C_2Ag]^+$  con fotones de  $33489,6 \text{ cm}^{-1}$ , donde se observa que le único producto es la pérdida de una molécula neutra de C. Las especie marcada con (\*) no intervienen en la fotofragmentación. (c) Espectro FUV obtenido entre  $31000 \text{ cm}^{-1}$  ( $3,84 \text{ eV}$ ) y  $45000 \text{ cm}^{-1}$  ( $5,58 \text{ eV}$ ) para el sistema  $[C_2Ag]^+$ .

En la Figura 6.6b se muestra el espectro de masas obtenido luego de la irradiación del ión padre con fotones de  $33489,6 \text{ cm}^{-1}$ . Al igual que en los resultados obtenidos para esta especie mediante DMIR, el único canal de fragmentación observado es la pérdida de una molécula neutra de C. Sin embargo, en este caso no se observa el producto de solvatación del fotofragmento  $[CAg]^+$ . Además, en esta figura se marca con \* la presencia de especies que no se pudieron eliminar de la trampa de iones, pero se verificó que su presencia no intervienen en el proceso de fotofragmentación. El espectro de FUV obtenido para el sistema  $[C_2Ag]^+$  entre  $31000 \text{ cm}^{-1}$  ( $3,84 \text{ eV}$ ) y  $45000 \text{ cm}^{-1}$  ( $5,58 \text{ eV}$ ) se muestra en la Figura 6.6c. El origen de la transición electrónica para el catión  $[C_2Ag]^+$  se encuentra a  $33422,6 \text{ cm}^{-1}$  ( $4,14 \text{ eV}$ ). El espectro obtenido presenta muy buena resolución con bandas bien definidas cuyo ancho a mitad de altura (FWHM) es de  $(12 \pm 2) \text{ cm}^{-1}$ , tal que se pueden distinguir dos progresiones vibracionales de baja energía con frecuencias

de  $\nu = 24 \text{ cm}^{-1}$  y  $123 \text{ cm}^{-1}$ . La resolución del espectro se mantiene hasta energías de excitación de  $1500 \text{ cm}^{-1}$  por encima del origen de la transición electrónica.

### 6.3. Análisis y Discusión

En la presente sección se discutirán los resultados mostrados respecto al estudio de la interacción de citosina con  $\text{Ag}^+$ . Mediante espectroscopía de DMIR se estudiaron sistemas de complejidad creciente con el objetivo último de proveer información acerca de cómo la interacción base-cation permite estabilizar apareamientos y plegamientos no canónicas en el ADN. Además, una vez caracterizado estructuralmente el sistema  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , se estudió su respuesta espectroscópica a la radiación UV y mediante la comparación con el sistema  $[\text{C}_2\text{H}]^+$ , se analizó el efecto de la naturaleza del catión sobre el tiempo de vida del estado excitado, para contribuir de esta forma al entendimiento de la naturaleza de los altos rendimientos cuanticos de fluorescencia de fluoróforos del tipo ADN-Ag<sub>n</sub> cuando éstos son excitados en su banda de absorción UV.

#### 6.3.1. Determinación estructural del ión $[\text{CAg}]^+$ mediante DMIR

En la Figura 6.3b de la Sección 6.2.1 se mostró que, mediante irradiación IR el único producto de fragmentación del ión  $[\text{CAg}]^+$  es la pérdida de ácido isocianico, éste resultado es inesperado teniendo en cuenta los siguientes antecedentes experimentales:

- Estudios previos indican que para el caso de  $[\text{CH}]^+$  mediante DMIR, el único fragmento encontrado es la pérdida del grupo amino,[119] mientras que para el mismo sistema fragmentado con radiación UV, se observan los productos correspondientes a la pérdida de  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{HNCO}$ .(Capítulo 5)
- Para los agregados del tipo  $[\text{C-Metal Alcalino}]^+$ , mediante DMIR y CID se observa que el único canal de fragmentación es la pérdida de citosina neutra.[165]

La diferencia encontrada en los canales de fragmentación de los sistemas  $[\text{CH}]^+$ ,  $[\text{CAg}]^+$  y  $[\text{C-Metal Alcalino}]^+$  parece indicar que la naturaleza de la interacción entre la citosina y el catión  $\text{Ag}^+$  es distinta al que presenta dicha molécula con el protón o metales alcalinos.

Comparando el espectro de DMIR obtenido para el ión  $[\text{CAg}]^+$  y los correspondientes reportados por Rodgers [165] para complejos de citosina con metales alcalinos,

encontramos que la posición de la única banda de fragmentación observada para el ión [CAG]<sup>+</sup> coincide con la banda de máxima fragmentación encontrada para el sistema [CLi]<sup>+</sup>, para el cual, esta banda también aparece a  $\sim 1640$  cm<sup>-1</sup>. Para el resto de los metales alcalinos, dicha absorción se mueve a mayores energías siendo 1650 cm<sup>-1</sup>, 1660 cm<sup>-1</sup>, 1670 cm<sup>-1</sup> y 1670 cm<sup>-1</sup> la posición de la misma banda de para los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> y Cs<sup>+</sup> respectivamente.

Para interpretar el espectro de DMIR presentado en la Figura 6.3c, se realizaron simulaciones computacionales al nivel de teoría de DFT. Se realizó una exploración de la superficie de energía potencial para el sistema [CAG]<sup>+</sup>, utilizando como estructuras de partida para la posterior optimización, diversas estructuras en las que se modificó, el tipo de interacción C $\cdots$ Ag<sup>+</sup> ( $\sigma$  o  $\pi$ ) y el estado tautomérico la molécula. Para simplificar la notación, al igual que en el Capítulo 5, resumimos el estado de tautomérico de la citosina con las iniciales (E) enol, (A) amino, (I) imino y (K) para ceto (del inglés Keto). Además, para evitar ambigüedades se utiliza un número en el caso de que el la nomenclatura a través del estado tautomérico no sea suficiente para identificar una estructura inequívocamente.

En la Tabla 6.1 se muestran las seis estructuras más estables encontradas, que abarcan todos los estados tautoméricos de la citosina y sus rotámeros. En dicha tabla además, se muestran las entalpías a 0 K corregidas por el error de superposición de bases y los  $\Delta G$  a 300 K, ambas cantidades relativas al isómero más estable. Vale la pena recalcar que, los isómeros encontrados con interacción C $\cdots$ Ag<sup>+</sup> de tipo  $\pi$  son al menos 1,24 eV menos estables que los que presentan interacción  $\sigma$ , por lo que no son tenidos en cuenta en la discusión.

Como puede verse en la Tabla 6.1, al igual que lo observado para otros sistemas del tipo [C $\cdots$ X]<sup>+</sup>, [119, 165] el mínimo global de energía obtenido para el ión [CAG]<sup>+</sup> corresponde a un isómero en el que la citosina se encuentra en su estado tautomérico ceto-amino (KA), e interacciona con el catión Ag<sup>+</sup> simultáneamente a través del oxígeno carbonílico y el N(3) heterocíclico, a este isómero lo llamamos KA1. El segundo isómero en energía (KA2), 0,15 eV menos estable que el mínimo global KA1, también presenta tautomería ceto-amino, pero en este caso el catión Ag<sup>+</sup> interacciona con la molécula a través del N(1) y el oxígeno carbonílico. De los siguientes cuatro isómeros, dos presentan tautomería EA y los otros dos KI, las estructuras de igual tautomería



son ratámeros de la citosina. Dichas estructuras son considerablemente menos estables que las que poseen tautomería KA.

Es conveniente enfatizar en este punto que, antes de la irradiación con el láser infrarrojo, los iones son termalizados a temperatura ambiente.[169] Entonces, teniendo en cuenta el  $\Delta G$  calculado a 300 K es posible estimar la población relativa de cada isómero considerando una distribución de Boltzmann a esa temperatura. Dichas poblaciones relativas también se muestran en la Tabla 6.1.

TABLA 6.1: Isómeros más estables del complejo  $[Cag]^+$ , obtenidos considerando los diferentes estados tautoméricos que puede adoptar la citosina. El nivel de teoría utilizado fue DFT/b3lyp. Para los átomos C,H,N y O se utilizaron las bases 6-311G++(d,p), para el catión  $Ag^+$  se utilizó el pseudopotencial de 36 electrones SDD y las bases que lo acompañan en el paquete de cálculo GAUSSIAN 09.[112] Los datos termoquímicos se obtuvieron teniendo en cuenta la energía del punto cero y la corrección por superposición de bases. Todos los datos se presentan en eV.

	<b>KA1</b>	<b>KA2</b>	<b>EA1</b>
$\Delta H$ (0 K)	0	0,15	0,25
$\Delta G$ (300 K)	0	0,14	0,25
Población Relativa	1	$4,0 \times 10^{-3}$	$5,3 \times 10^{-5}$

	<b>KI1</b>	<b>KI2</b>	<b>EA2</b>
$\Delta H$ (0 K)	0,44	0,47	0,52
$\Delta G$ (300 K)	0,43	0,45	0,51
Población Relativa	$5,1 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^{-9}$

En la Figura 6.7 se muestran en forma comparativa el espectro de DMIR obtenido experimentalmente para el sistema  $[Cag]^+$ , y los espectros de absorción infrarroja simulados para los tres isómeros más estables. En la Figura 6.7b se muestra el espectro

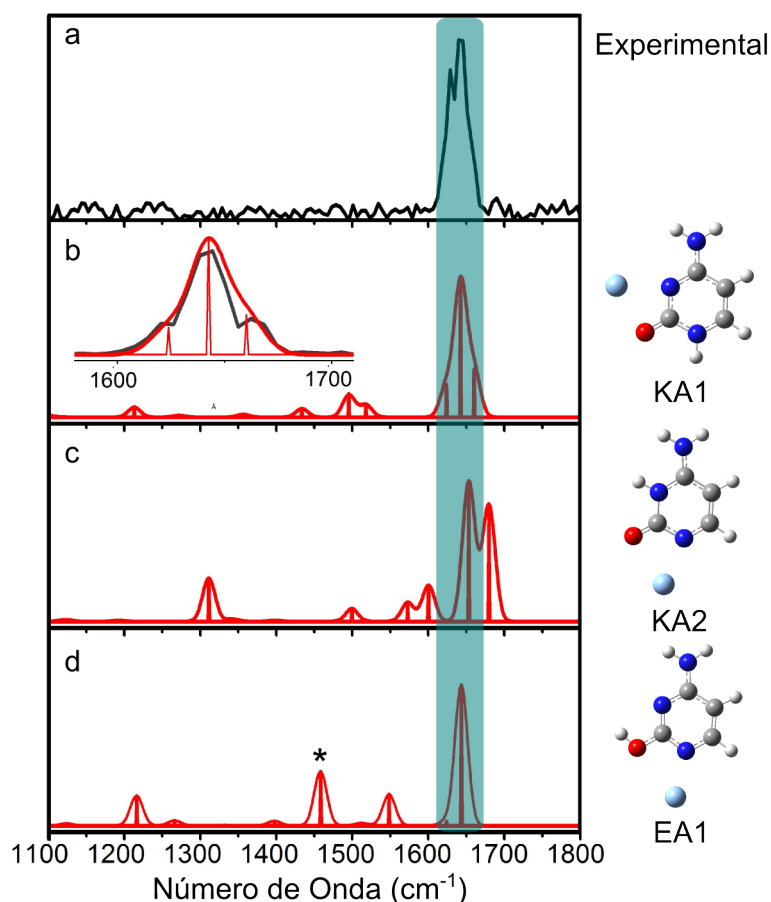


FIGURA 6.7: a) Espectro de DMIR experimental correspondiente al ión  $[CAg]^+$ , (b-d) En rojo se muestran los espectros de absorción IR simulados para los tres isómeros más estables. En el recuadro del panel (b) se muestra una ampliación en la región de  $1600\text{ cm}^{-1}$  - $1700\text{ cm}^{-1}$  de un espectro obtenido con mayor resolución. Las frecuencias calculadas fueron corregidas por un factor de 0,98.[170]

simulado para el isómero KA1, para éste, en la región espectral comprendida entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1700\text{ cm}^{-1}$ , se observa la presencia de tres bandas vibracionales a  $1624\text{ cm}^{-1}$ ,  $1639\text{ cm}^{-1}$  y  $1660\text{ cm}^{-1}$  que corresponden respectivamente a, el “*bendig*” del grupo amino, el estiramiento del enlace C=O y por último, a un acoplamiento entre ambos modos y un tercer modo de “*wagging*” del N1-H. La convolución de estos tres modos normales con un ancho de  $10\text{ cm}^{-1}$  (resolución espectral del láser) da como resultado una única banda de absorción centrada en  $1643\text{ cm}^{-1}$ , señalada en verde, que se ajusta correctamente al espectro experimental. Además, en el recuadro de la figura Figura 6.7b se muestra una ampliación de la misma región espectral registrada con mayor resolución. En éste, la envolvente de la banda de absorción se resuelve en una banda central y dos hombros, y puede observarse el muy buen acuerdo entre el espectro simulado y el experimental. En la Figura 6.7c se muestra el espectro simulado para el isómero KA2, para el cual, la

banda de estiramiento del grupo C=O se mueve a energías mayores (1680 cm<sup>-1</sup>) y como consecuencia, no hay un buen acuerdo entre el espectro simulado y el experimental. Finalmente, en la Figura 6.7d se muestra el espectro de absorción IR simulado para el isómero EA1, para el cual, la banda del “*bendig*” del grupo amino se predice a 1642 cm<sup>-1</sup> lo que está en buen acuerdo con el centro de la banda de absorción obtenida experimentalmente. Sin embargo, en el caso de la estructura EA1 al no tener un grupo carbonilo en la molécula, la simulación en la región comprendida entre 1600 cm<sup>-1</sup> y 1700 cm<sup>-1</sup> sólo muestra la presencia de una única banda intensa, lo que hace que el ancho de la transición simulada sea considerablemente menor que la observada experimentalmente. Además, en el espectro simulado se observa una banda a ~1460 cm<sup>-1</sup> (señalada con \*) correspondiente a la distorsión simétrica del anillo aromático en el plano de simetría Cs, que tiene la mitad de intensidad que la banda correspondiente al *bendig* del grupo amino. Por lo que, podría esperarse que dicha banda sea observable experimentalmente. Sin embargo en la región comprendida entre 1400 cm<sup>-1</sup> y 1500 cm<sup>-1</sup> no hay ningún aumento en la eficiencia de fragmentación del ión [CAg]<sup>+</sup>.

Sin duda, la baja eficiencia de fragmentación obtenida para el sistema [CAg]<sup>+</sup> dificulta la obtención de información espectral para asignar inequívocamente la estructura de dicho ión. Sin embargo, teniendo en cuenta los siguientes aspectos discutidos:

- El excelente acuerdo entre el espectro de absorción IR simulado para el isómero KA1 y el espectro de DMIR obtenido experimentalmente.
- La gran diferencia en estabilidad y población relativa calculada entre la estructura KA1 y los isómeros menos estables.
- En otros estudios en fase gaseosa de la interacción de la C con cationes, la C se encuentra en su estado tautomérico KA.[119, 165]

Se puede concluir que, en las condiciones experimentales de trabajo, la estructura del sistema [CAg]<sup>+</sup> corresponde a la del complejo KA1.

La baja eficiencia de fragmentación del ión [CAg]<sup>+</sup>(10%) podría entenderse como una consecuencia de la alta energía de interacción entre la C···Ag<sup>+</sup>, que se estimó mediante simulaciones a nivel DFT en 2,86 eV. Sin embargo Rodgers y colaboradores estimaron que la energía de interacción C···Li<sup>+</sup> del complejo [CLi]<sup>+</sup> es ligeramente mayor (2,95 eV).[165] y también lo es su eficiencia de fragmentación (25%) , lo que posibilita

observar otras bandas de menor intensidad en el espectro de DMIR del sistema [CLi]<sup>+</sup>. Este hecho, sumado a que los canales de fragmentación para ambos complejos son diferentes, parecerían indicar que la naturaleza de la interacción entre éstos cationes y la citosina también es diferente. Más experimentos y simulaciones computacionales son necesarias para terminar de entender estas diferencias.

### 6.3.2. Determinación estructural del ión [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> mediante DMIR

La discusión de los resultados obtenidos para el complejo [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, se realizó tomando como punto de partida el análisis de la Sección 6.3.1 que concluye que la estructura del ión [CAg]<sup>+</sup> presente en fase gaseosas es la correspondiente al isómero KA1, y además teniendo en cuenta que, para la adquisición de los espectros de DMIR de las especies [CAg]<sup>+</sup> y [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> las condiciones experimentales se mantuvieron inalteradas. Por lo que, la estructura del ión [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> deben ser consecuencia de la solvatación de la especie KA1.

Para interpretar el espectro de DMIR mostrado en la Figura 6.4c, se realizaron simulaciones computacionales al nivel de teoría de DFT. Se realizó una exploración de la superficie de energía potencial para el sistema [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, utilizando como estructuras de partida diversas estructuras de solvatación del complejo KA1, donde la molécula de agua interacciona con el catión plata y los diversos grupos funcionales de la molécula. Como se mantuvo constante el estado tautomérico de la citosina la nomenclatura puede simplificarse. Los diversos isómeros son llamados [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-N (N=1,2,3...etc) donde la numeración se utiliza para distinguir entre los isómeros en orden creciente de energía. En la Tabla 6.2 se muestran las estructuras obtenidas, las entalpías a 0 K y los ΔG a 300 K, relativos a la energía del isómero más estable, junto con las poblaciones relativas a 300 K de los distintos isómeros, calculada considerando una distribución de Boltzmann como se explicó en la Sección 6.3.1.

En la Tabla 6.2 puede verse que la solvatación del ión [CAg]<sup>+</sup> produce una estabilización mayor cuando la molécula de agua interacciona directamente con el catión Ag<sup>+</sup>, que cuando ésta interacciona con los demás grupos funcionales de la molécula de citosina. Además, en la misma tabla se observa que la solvatación del isómero KA1 produce dos isómeros casi isoenergéticos que constituyen los mínimos absolutos de nuestra búsqueda conformacional. A primera vista los isómeros [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-1 y [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-2

TABLA 6.2: Energética de los sitios de solvatación del ión  $[CAG]^+$ . El nivel de teoría utilizado fue DFT/B3LYP. Para los átomos C,H,N y O se utilizaron las bases 6-311G++(d,p), para el catión  $Ag^+$  se utilizó el pseudopotencial de 36 electrones SDD y las bases que lo acompañan en el paquete de cálculo GAUSSIAN 09.[112] Los datos termoquímicos se obtuvieron teniendo en cuenta la energía del punto cero y la corrección por superposición de bases. Todos los datos se presentan en eV.

	$[CAG-H_2O]^+-1$	$[CAG-H_2O]^+-2$	$[CAG-H_2O]^+-3$
$\Delta H$	0	0,02	0,38
$\Delta G$ (300 K)	0,01	0	0,43
Población Relativa	0,55	1	$6,7 \times 10^{-8}$

	$[CAG-H_2O]^+-4$	$[CAG-H_2O]^+-5$
$\Delta H$	0,48	0,51
$\Delta G$ (300 K)	0,48	0,52
Población Relativa	$9,0 \times 10^{-9}$	$1,6 \times 10^{-9}$

son similares, pero la posición del catión  $Ag^+$  cambia. En el primero, el catión  $Ag^+$  interacciona directamente N(3) heterocíclico y en el último, el catión se encuentra más cerca del átomo del oxígeno carbonílico. En ambos caso, la molécula de agua se ubica formando un ángulo de alrededor de  $180^\circ$  lo que es de esperar, pues este catión forma complejos di-coordinados lineales.

En la estructura  $[CAG-H_2O]^+-3$  la molécula de agua actúa como un ligando bidentado, y puede observarse claramente que esta interacción es muy desfavorable energéticamente. En las estructuras 4 y 5, el agua interacciona a través del átomo de hidrógeno del N(4) y solvatando el grupo amino, respectivamente. Estas últimas estructuras son las menos estables. Cabe recalcar que para el sistema  $[CAG-H_2O]^+$ , no se encontraron estructuras donde la interacción  $[CAG]^+ \cdots H_2O$  sea de tipo  $\pi$ .

Es interesante destacar en este punto, el gran ensanchamiento que presenta la banda más intensa del espectro centrada a  $1667\text{ cm}^{-1}$ . Como se mencionó en la Sección 6.2.1, no se logró mejorar la resolución espectral en la región comprendida entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1800\text{ cm}^{-1}$ , por lo que, es de esperar que dicho ensanchamiento sea producido por la presencia de más de una banda en la misma región espectral asociadas a los dos isómeros más estables. El fundamento de esta hipótesis se discute en los siguientes párrafos en función de los resultados expuestos.

Considerando la diferencia en estabilidad y de población relativa que existen entre las estructuras más estables y los isómeros con estructura  $[CAg-H_2O]^+-(3,4\text{ y }5)$ , se puede descartar la presencia de los últimos en las condiciones experimentales de trabajo. Sin embargo, debido a que los isómeros  $[CAg-H_2O]^+-1$  y  $-2$  son casi-isoenergéticos, no se puede descartar a *priori* la presencia de ninguno, por lo que, en el la Figura 6.8(a-c) se muestran en forma comparativa el espectro de DMIR obtenido experimentalmente para el sistema  $[CAg-H_2O]^+$ , y los espectros de absorción infrarrojos simulados para las estructuras  $[CAg-H_2O]^+-1$  y  $-2$  respectivamente. La banda de menor intensidad, señalada

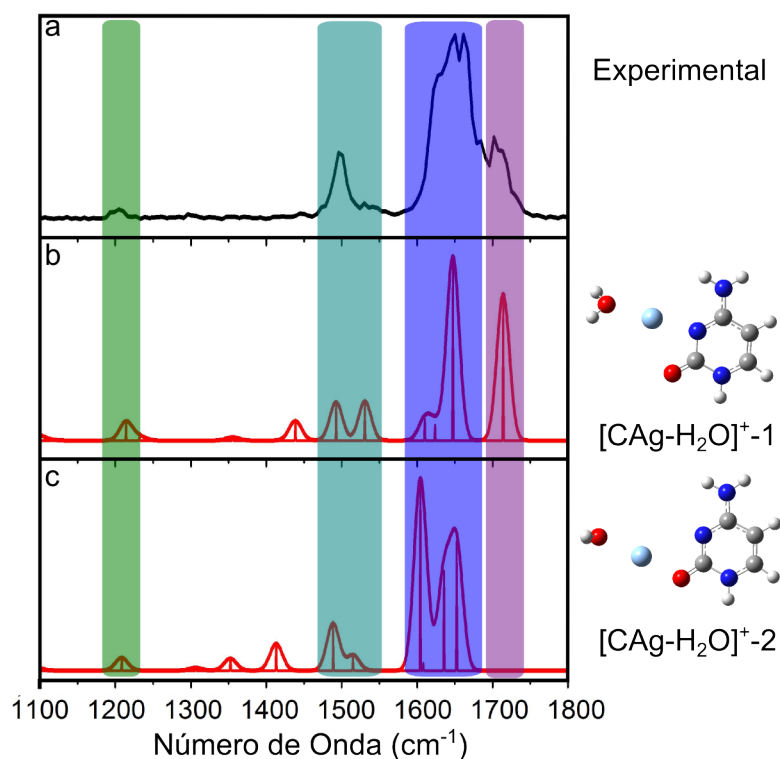


FIGURA 6.8: a) Espectro de DMIR experimental correspondiente al ión  $[CAg-H_2O]^+$ , (b-c) En rojo se muestran los espectros de absorción IR simulados para los dos isómeros más estables. Las frecuencias calculadas fueron corregidas por un factor de 0,98.[170]

en verde oscuro, que en el espectro experimental aparece a  $1215\text{ cm}^{-1}$ , se observa en los dos espectros simulados alrededor de  $1211\text{ cm}^{-1}$ , y corresponde a la deformación de los ángulos de enlace C-H en el plano del anillo aromático. Como se destaca en el recuadro verde claro, la banda que aparece a  $1511\text{ cm}^{-1}$  en el espectro experimental, puede deberse a la superposición de dos bandas asociadas a modos de deformación de los enlaces C-C en el plano del anillo aromático, que en los espectros simulados se observan a  $1490\text{ cm}^{-1}$  y  $1515\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$ , y a  $1490\text{ cm}^{-1}$  y  $1533\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-2}$ .

Teniendo en cuenta las diferencias estructurales que presentan los dos isómeros más estables, es de esperarse que el modo de estiramiento del carbonilo aparezca a diferentes frecuencias debido a que, en el isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$  puede considerarse que el grupo C=O está “libre”, mientras que en la estructura  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-2}$  el átomo de O interacciona de manera directa con el catión. En concordancia con esto, las simulaciones de los espectros indican que la absorción de dicho modo de vibración ocurre a  $1715\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$  y que presenta un corrimiento de  $-113\text{ cm}^{-1}$  hacia el rojo ( $1602\text{ cm}^{-1}$ ) en el caso de isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-2}$ .

Por otro lado, es de esperarse que la energía de la banda correspondiente al “*bending*” del grupo amino no sea muy diferente entre los dos isómeros, considerando que el ambiente químico de dicho grupo funcional es similar en ambas estructuras. Las simulaciones de los espectros de absorción indican que para ambos isómeros, este modo vibracional absorbe alrededor de  $1648\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro experimental puede verse claramente una banda a  $1719\text{ cm}^{-1}$  que se corresponde muy bien con la banda de absorción del estiramiento del grupo C=O del isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$ , que como se dijo anteriormente se espera a  $1715\text{ cm}^{-1}$  (recuadro violeta), lo que es una evidencia de la presencia de dicho isómero en las condiciones experimentales de trabajo. Sin embargo, la banda del “*bending*” del grupo amino del  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$  no es suficiente para explicar el ancho de la banda observada a  $1667\text{ cm}^{-1}$ . Teniendo en cuenta que no se logró obtener un espectro con mejor resolución más allá del uso de filtros y el láser de  $\text{CO}_2$ , se espera que el ensanchamiento de dicha banda y la presencia de un hombro a  $1639\text{ cm}^{-1}$  se deba a la superposición de las bandas correspondientes a los modos de “*bending*” del grupo amino del isómero  $[\text{CAg-H}_2\text{O}]^{+-1}$ ,

el “*bending*” del amino del isómero [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-2 y el estiramiento del grupo C=O de este último (todos remarcados es azul).

Finalmente, para apoyar la conclusión de la existencia de ambos isómeros, se realizó un análisis de la energía de los agregados [CAg]<sup>+</sup> y [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> en función de la posición del catión. Para esto, se varió la posición del catión Ag<sup>+</sup> respecto del ángulo que forma éste último con los dos átomos “auxiliares” mostrados en la Figura 6.9. El valor de dicho ángulo fue modificando gradualmente, y para cada valor de éste se realizó una optimización del resto de las coordenadas con y sin la molécula de agua. Las curvas de energía obtenidas de esta forma se muestran en la Figura 6.9, donde en negro y en rojo se grafican los resultados para los iones [CAg]<sup>+</sup> y [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, respectivamente. Puede verse que para el sistema [CAg]<sup>+</sup> se obtiene un único mínimo de energía cuando el ángulo es de 62°, estructura que corresponde a la isómero KA1 antes mencionado. Cuando el ángulo aumenta o disminuye se observa un marcado incremento de la energía del sistema. Sin embargo para el sistema [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> se observan dos mínimos que corresponden a las estructuras [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-1 y -2, separadas por una barrera de energía de alrededor de 0,05 eV, el análisis de los modos normales de vibración muestra que el máximo de esta barrera corresponde al estado de transición para la isomerización con una frecuencia imaginaria de  $i$  60,3 cm<sup>-1</sup>. En la misma figura se muestra la estructura del estado de transición y los vectores de movimiento correspondientes al modo de la frecuencia imaginaria. Teniendo en cuenta los resulta mostrados, se puede concluir que la solvatación del sistema [CAg]<sup>+</sup> genera un doble pozo de energía potencial, y recordando que la energía térmica es de 0,024 eV, es de esperarse que ambos iones se encuentren presentes en las condiciones experimentales de trabajo.

### 6.3.3. Determinación estructural del ión [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> mediante DMIR

Las discusiones de los resultados obtenidos acerca de los sistemas [CAg]<sup>+</sup> y [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, confirman que el empleo conjunto de la espectroscopía de DMIR y simulaciones computacionales, constituye una herramienta apta para la determinación estructural de sistemas de esta naturaleza. En la presente sección se discuten los resultados obtenidos a partir del estudio del ión [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>, lo que permitió realizar por primera vez una asignación estructural detallada de dicho sistema.



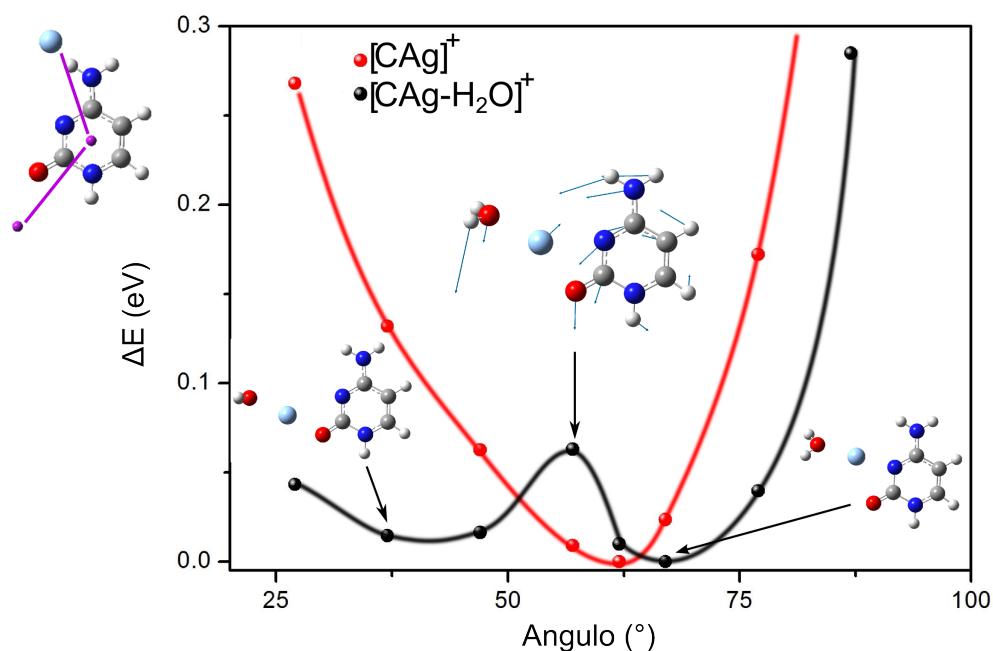
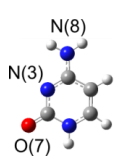
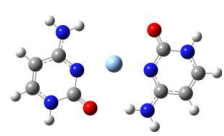
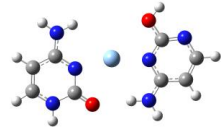
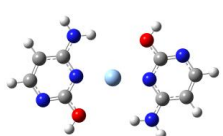
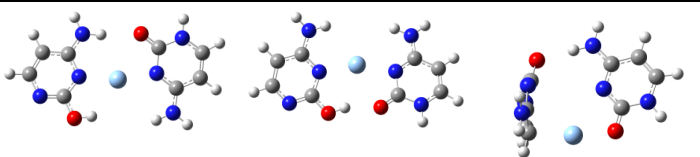
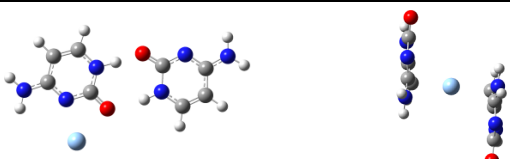


FIGURA 6.9: Curvas de energía potencial de los iones  $[CAg]^+$  y  $[CAg-H_2O]^+$  a lo largo de la coordenada que considera la posición del catión  $Ag^+$  entre los grupos  $C=O$  y  $C-N-C$  de la citosina. Los cálculos fueron realizados al nivel de teoría DFT/b3lyp, para los átomos de C, H, O y N se utilizaron las bases 6-311G++(d,p) y para catión  $Ag^+$  se utilizó el pseudopotencial de 36 electrones SDD y las bases que lo acompañan en el paquete de cálculo GAUSSIAN 09.[112] El ángulo que forma el catión  $Ag^+$  con los dos átomos “auxiliares” se varió progresivamente, y a cada valor de éste se optimizó el resto del sistema con (línea y esferas rojas) y sin la molécula de agua (línea y esferas negras)

El espectro de DMIR experimental del ión  $[C_2Ag]^+$  que se presentó en la Figura 6.5c, y para su interpretación se realizaron simulaciones computacionales al nivel de teoría de DFT. Las discusiones de la secciones 6.3.1 y 6.3.2 referidas a los sistemas  $[CAg]^+$  y  $[CAg-H_2O]^+$  permiten tomar como punto de partida en esta discusión que la citosina en el sistema  $[C_2Ag]^+$  se encuentra en su estado tautomérico cetamino, sin embargo, debido a que los sistemas  $[CAg]^+$  y  $[CAg-H_2O]^+$  no se generaron por fragmentación directa del sistema  $[C_2Ag]^+$ , y para no agregar un grado de especulación a la discusión, se realizó una exploración de la superficie de energía potencial para el sistema  $[C_2Ag]^+$ , utilizando como estructuras de partida para la posterior optimización, diversos isómeros en los que se modificó el tipo de interacción  $Ag^+ \cdots$  citosina ( $\sigma$  o  $\pi$ ), y el estado tautomérico de ambas moléculas de citosina. La nomenclatura empleada para estos dímeros consiste en dos letras para cada molécula de citosina, que indican el estado de tautomerismo de cada una de ellas según las iniciales (E) enol, (A) amino, (I) imino y (K) para cetamino. Además, se emplean los símbolos  $\sigma$  y  $\pi$  para indicar el tipo de interacción de cada molécula con el catión  $Ag^+$ . En caso de surgir ambigüedades,

se agregó un número a la nomenclatura para distinguir isómeros de igual tautomería e igual tipo de interacción. En la Tabla 6.3 se muestran las ocho estructuras más estables encontradas. En esta tabla puede observarse a primera vista que, las estructuras con interacciones  $\sigma$  son más estables que las estructuras que poseen interacciones de tipo  $\pi$ . Siendo el isómero con interacción  $\pi$  de menor energía, 1 eV menos estable que la estructura determinada como mínimo global.

TABLA 6.3: La superficie de energía potencial del sistema  $[C_2Ag]^+$  fue explorada al nivel de teoría b3lyp, utilizando para los átomos C,H,N, y O el conjunto de bases 6-311G++(d,p) y para el átomo de Ag, el pseudopotencial SDD y las bases correspondientes de dicho pseudopotencial incorporadas en el paquete GAUSSIAN 09.[112] Las propiedades termoquímicas fueron calculadas teniendo en cuenta la energía del punto cero y la corrección por superposición de bases. Los valores se encuentran en unidades de eV

			
	<b>KA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> 1</b>	<b>EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> 1</b>	<b>EA<sub>σ</sub>EA<sub>σ</sub></b>
$\Delta H$ (0 K)	0	0,33	0,73
$\Delta G$ (300 K)	0	0,33	0,64
Población Relativa	1	$2,4 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-11}$
			
	<b>EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> 2</b>	<b>EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> 3</b>	<b>KA<sub>π</sub>KA<sub>σ</sub></b>
$\Delta H$ (0 K)	0,79	0,80	1,00
$\Delta G$ (300 K)	0,76	0,79	1,02
Población Relativa	$1,6 \times 10^{-13}$	$5,9 \times 10^{-14}$	$1,4 \times 10^{-18}$
			
	<b>KA<sub>σ</sub>KA</b>	<b>KA<sub>π</sub>KA<sub>π</sub></b>	
$\Delta H$ (0 K)	1,06	2,38	
$\Delta G$ (300 K)	0,97	2,26	
Población Relativa	$4,3 \times 10^{-17}$	$2,4 \times 10^{-39}$	

El mínimo global de energía encontrado corresponde a una estructura plana, en la cual ambas moléculas de citosina se encuentran en su forma ceto-amino (KA), y el catión plata interacciona con simetría  $\sigma$  con los pares electrónicos no enlazantes del N(3) de cada molécula. La distancia de interacción N(3)citosina $\cdots$ Ag $^+$  ( $d_{Ag^+-N}$ ) es de 2.1 Å. A este isómero de mínima energía le corresponde la nomenclatura  $KA_\sigma KA_\sigma$ , y muchas de las estructuras de prueba convergieron a ésta. Hay dos características a destacar respecto a la estructura de este isómero. Por un lado, los enlaces N(1)H y N(1')H que son los involucrados en la formación del enlace glicosídico para dar lugar al nucleótido, se encuentran en posición transoid (o anti-paralela, véase Figura 6.10), [171] a diferencia de lo que ocurre en la formación de la doble hélice canónica, en la que estos enlaces se encuentran en posición cisoid (paralela). Por otro lado, la estructura  $KA_\sigma KA_\sigma$  es asimétrica respecto de las distancias intermoleculares O(7) $\cdots$ N(8') (3,3 Å) y O(7') $\cdots$ N(8) (5,3 Å) como puede observarse en la Figura 6.10. Se puede re-optimizó la estructura  $KA_\sigma KA_\sigma$  con restricción de simetría al grupo  $C_{2h}$ , pero el análisis de las frecuencias de la geometría obtenida de esta forma, muestra que la estructura simétrica corresponde a un estado de transición para la formación de uno u otro de los puentes hidrógeno, NH $_2\cdots$ O=C, con una frecuencia imaginaria de  $i17\text{ cm}^{-1}$ .

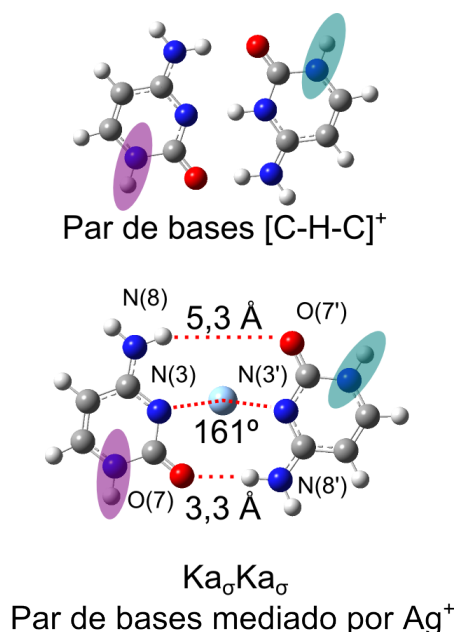


FIGURA 6.10: Comparación de la estructura  $[C_2H]^+$  en el plegamiento i-motif y la estructura  $KA_\sigma KA_\sigma$  determinada para el sistema  $[C_2Ag]^+$ . En la figura se resaltan las posiciones donde tienen lugar los enlaces glicosídicos, además de las distancias y ángulos más relevantes.

El segundo isómero de menor energía es el EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>1 (se encontraron diversas estructuras del tipo EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>, y para distinguir entre ellas se las numeró de menor a mayor energía), en el cual el catión Ag<sup>+</sup> está unido a las dos moléculas de citosina a través de los pares de electrones no enlazantes del N(3) y N(3'), pero en este caso la forma tautomérica de ambas moléculas no es la misma, una se encuentra en forma enol-amino (EA) y la otra en forma ceto-amino (KA). El isómero EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> es 0,33 eV menos estable que el isómero KA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>. El tercer isómero de mayor energía es el EA<sub>σ</sub>EA<sub>σ</sub>, en el cual ambas moléculas de citosina se encuentran en su forma tautomérica enol-amino (EA), y otra vez, el catión Ag<sup>+</sup> interactúa con ambas moléculas a través de los pares no enlazantes de los N(3) heterocíclicos. Este isómero es 0,73 eV menos estable que el isómero KA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>.

Las entalpías a 0 K corregidas por el error de superposición de bases, y los ΔG a 300 K, relativos a la energía del isómero KA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> se resumen en la Tabla 6.3. En la misma tabla también se muestra la población relativa de cada isómero respecto al más estable, calculada considerando una distribución de Boltzmann a 300 K.

Para realizar la asignación estructural, comparamos el espectro experimental (Figura 6.11a) con los espectros de absorción IR simulados para las tres estructuras de menor energía, Figura 6.11(b-d). En la misma figura además se analiza la presencia o ausencia de bandas características para cada estructura en el espectro experimental. Por ejemplo, la banda intensa que se observa a 1710 cm<sup>-1</sup> con un hombro a 1690 cm<sup>-1</sup> puede atribuirse al estiramiento de dos grupos carbonilos C=O no equivalentes, lo que sugiere que las moléculas de citosina deben encontrarse en el estado tautomérico KA. Por otro lado, para los isómeros EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>1 y EA<sub>σ</sub>EA<sub>σ</sub> se esperaría encontrar bandas características asociadas a la presencia del grupo enol a 1280 cm<sup>-1</sup> y 1325 cm<sup>-1</sup>, que se resaltan en la Figura 6.11(c,d) con \*. La banda predicha a 1575 cm<sup>-1</sup> que corresponde a un modo de deformación en el plano, de un anillo aromático sustituido con un grupo donador π (como el grupo OH), también es una marca característica de los isómeros con tautomería EA, y tampoco se observa en el espectro experimental. Además el isómero EA<sub>σ</sub>EA<sub>σ</sub> no presenta ninguna banda a 1710 cm<sup>-1</sup>, donde se observa la banda de mayor intensidad en el espectro experimental. Para el isómero EA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub>1 si predice una banda a 1710 cm<sup>-1</sup>, pero ninguna de las bandas características del grupo enol se encuentran en el espectro experimental.

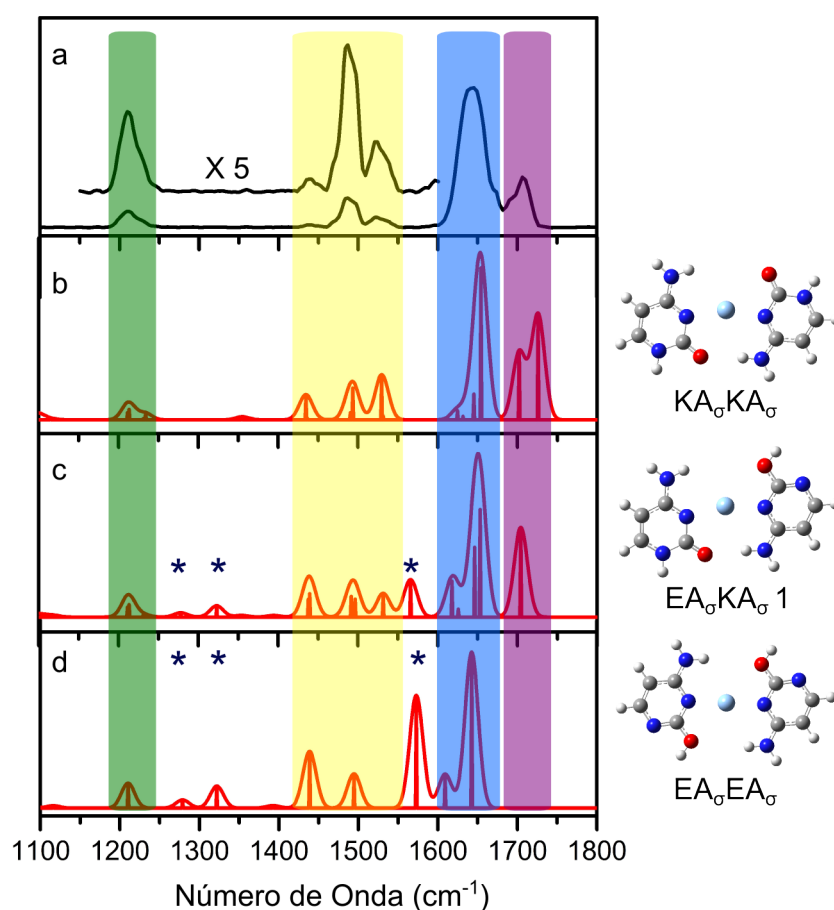


FIGURA 6.11: (a) Espectro experimental de DMIR del complejo  $[C_2Ag]^+$  entre 1100 y  $1800\text{ cm}^{-1}$ . (b-d) corresponden a los espectros IR simulados de las estructuras  $KA_\sigma KA_\sigma$ ,  $EA_\sigma KA_\sigma 1$  y  $EA_\sigma EA_\sigma$  respectivamente. Las frecuencias calculadas fueron corregidas por un factor de 0,98.[170]

Entre los tres isómeros de menor energía, el espectro simulado del complejo  $KA_\sigma KA_\sigma$  es el que mejor se ajusta al observado experimentalmente. El espectro de absorción IR simulado para este isómero (Figura 6.11b) presenta dos bandas intensas a  $1720\text{ cm}^{-1}$  y  $1702\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes a los modos de estiramiento C=O de los grupos carbonilos, que se encuentran a diferentes frecuencias debido a que presentan diferentes distancias con el grupo  $NH_2$ . Otra banda intensa es predicha a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a deformación simétrica del grupo  $NH_2$  con interacción de puente hidrógeno. Además, el espectro simulado del isómero  $KA_\sigma KA_\sigma$  presenta un grupo de tres bandas en la región entre  $1450\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$  que también se observan en el espectro experimental. Como se mencionó anteriormente, también se optimizó la estructura del isómero  $KA_\sigma KA_\sigma$  con restricción de simetría  $C_{2h}$ , encontrándose que consiste en un estado de transición. En la Figura 6.12 se muestran los espectros simulados de los isómeros  $KA_\sigma KA_\sigma$  con y sin

restricción de simetría, junto con el espectro experimental. Como es de esperarse, se observa que la estructura simétrica presenta sólo una banda de estiramiento de los grupos C=O a  $1723\text{ cm}^{-1}$ , debido a que ambos son equivalentes. Por lo que la presencia de las dos bandas a  $1710\text{ cm}^{-1}$  y  $1690\text{ cm}^{-1}$  en el espectro experimental, y la predicción de estas dos a  $1720\text{ cm}^{-1}$  y  $1702\text{ cm}^{-1}$  para el isómero  $KA_\sigma KA_\sigma$ , es una clara evidencia de que en las condiciones experimentales se forma el complejo asimétrico, y que esta asimetría no es un artificio de las simulaciones computacionales.

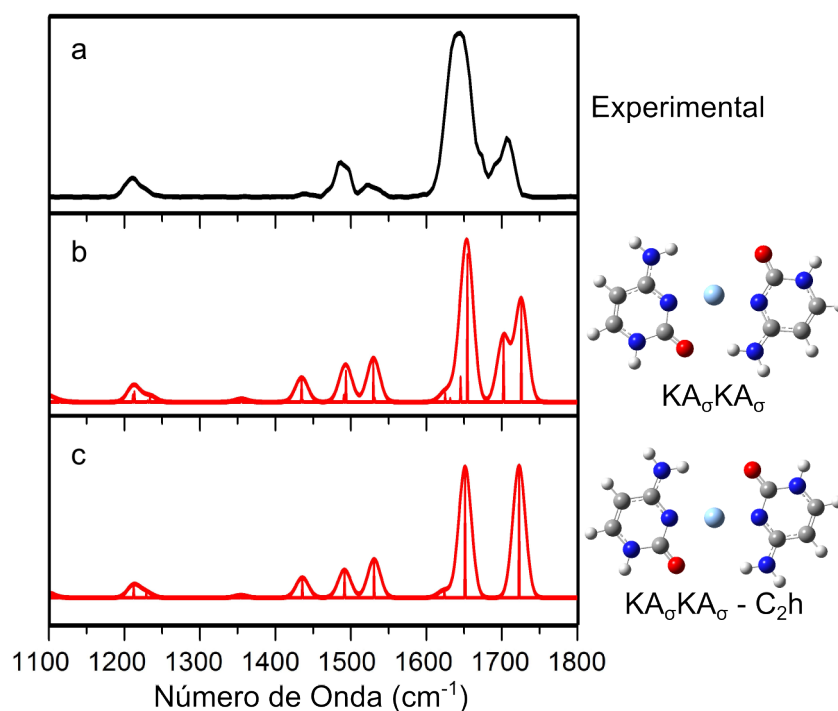


FIGURA 6.12: (a) Espectro experimental de DMIR obtenido para el ión  $[C_2Ag]^+$ . (b y c) muestran a modo de comparación los espectros del complejo  $KA_\sigma KA_\sigma$ , con y sin restricción de simetría  $C_{2h}$ , respectivamente. Las frecuencias calculadas fueron corregidas por un factor de 0,98.[170]

Aunque la presencia de los isómeros menos estables  $EA_\sigma KA_\sigma$  y  $EA_\sigma EA_\sigma$  no puede descartarse por completo, el buen acuerdo existente entre el espectro de DMIR experimental y el espectro de absorción IR, junto con los resultados teóricos (diferencia de energía y poblaciones relativas), nos permite concluir que bajo las condiciones experimentales la estructura del sistema  $[C_2Ag]^+$  corresponde a la del isómero  $KA_\sigma KA_\sigma$ .

En el contexto de la búsqueda de la generación de pares de bases artificiales, los resultados mostrados en esta sección son de relevancia por dos razones principales. Primero, se encontraron estructuras similares para dímeros de citosina ( $C-H^+-C$ )[145] y citosinas sustituidas ( $XC-H^+-CX$ ) mediadas por protón.[144, 172] Como puede verse en

la Figura 6.10, el isómero  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  puede considerarse un derivado del comúnmente aceptado par protonado  $C-H^+-C$  que estabiliza el plegamiento i-motife no canónico del ADN, manteniendo la simetría anti-paralela entre los enlaces glicosídicos, necesaria para dicho plegamiento (Capítulo 1). Este resultado está en línea con lo observado recientemente [36] respecto de la formación de estructuras de tipo i-motif del ADN a pH neutro en presencia de iones  $Ag^+$ . El segundo punto de importancia, radica en el hecho de que la estructura encontrada para el isómero  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  mantiene una simetría planar, lo que es de fundamental importancia para la interacción entre los dímero de las diferentes cadenas, para la formación de la estructura tetramérica del i-motif.

Vale la pena recalcar que no se encontró un mínimo de energía para la estructura  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  con orientación cisoid entre los enlace  $N(1)H$  y  $N(1')H$ . Se esperaría encontrar dicha estructura en el caso de ocurrir un “missmaching” C-C en la doble hélice canónica. Este resultado está en acuerdo con publicaciones anteriores,[171] que indican que la estructura cisoid sólo se puede estabilizar bajo condiciones de restricción de simetría, y que del análisis de frecuencias se encuentra que ésta corresponde al estado de transición para la rotación interna hacia la formación de la estructura transoid. La fuerza impulsora de esta rotación, consiste principalmente en la repulsión estérica y electrostática entre los grupos  $NH_2$  de las dos moléculas de citosina.[171] Además, en la estructura cisoid no es posible la interacción por puente hidrógeno entre las dos moléculas, lo que hace que esta última sea alrededor de 0,33 eV menos estable que el isómero  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  transoid.

Las simulaciones realizadas indican que la energía de interacción  $C-Ag^+\cdots C$  es de alrededor de 2,22 eV para el isómero  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$ . Esta energía es considerablemente mayor a la correspondiente al dímero protonado  $C-H^+\cdots C$ , determinada por medio de CID en 1,76 eV y por simulaciones computacionales en 1,75 eV.[144] La gran energía de interacción encontrada para  $C-Ag^+\cdots C$  en el complejo  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  se debe mayormente a la interacción entre el catión y los pares no enlazantes de los  $N(3)$  heterocíclicos de cada molécula, pero también tiene una contribución importante de la interacción de puente hidrógeno  $NH_2\cdots O=C$ . Para el isómero  $KA_{\sigma}KA_{\sigma}$  la distancia  $d_{Ag-N}=2,1$  Å produce un distanciamiento considerable entre ambas moléculas de citosina  $d_{N(3)-N(3)}=4,2$  Å, por lo que la distorsión de la simetría encontrada es necesaria para la formación de un puente hidrógeno entre el grupo  $NH_2$  de una citosina y el grupo  $C=O$  de la otra. Esta interacción es la fuerza impulsora de la distorsión. Es de esperar que la estabilización por

el puente hidrógeno sea del orden de la diferencia de energía entre la estructura transoid y la cisoid (0,33 eV) donde dicha interacción no ocurre.

Los resultados aquí mostrados están de acuerdo con los obtenidos recientemente en fase condensada, que indican que los dúplex con apareamientos C-C en orientación cisoid generados en presencia de cationes Ag<sup>+</sup>, presenta una temperatura de cambio de fase de 309,6 K. Dicha temperatura es 12 K menor que la correspondiente al cambio de fase para el mismo dúplex con apareamiento m<sup>5</sup>iC-C en orientación transoid (m<sup>5</sup>iC=5metilcitosina), también generado en presencia de cationes Ag<sup>+</sup>. [161] Los autores sugieren que el aumento en la temperatura del cambio de fase puede deberse a la estabilización conjunta producida por la presencia del cationes Ag<sup>+</sup> y la formación del puente hidrógeno en la estructura transoid. Los resultados aquí mostrados indican que esta hipótesis es posible, y que la existencia de este efecto puede ocurrir sólo mediante la ruptura de la simetría en el isómero KA<sub>σ</sub>KA<sub>σ</sub> con geometría transoid.

#### **6.3.4. Efecto de la naturaleza catión en el tiempo de vida y propiedades electrónicas de los dímeros de bases del ADN: Comparación de los Sistemas [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>**

Debido a que, como se mencionó en la sección anterior la estructura del complejo [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> es similar que la del complejo [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, con el remplazo formal del H<sup>+</sup> por el catión Ag<sup>+</sup>, en esta sección se realizara una comparación de las propiedades ópticas y electrónicas de ambos complejos, obtenidos mediante espectroscopía FUV. Los resultados referidos al catión [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> fueron presentados en le Capítulo 5 y aquí sólo se los utilizará a modo comparativo para evaluar el efecto de catión sobre las propiedades anteriormente mencionadas.

Los espectros de FUV de los sistemas [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> se registraron en la región espectral comprendida entre 31000 cm<sup>-1</sup> (3,84 eV) y 45000 cm<sup>-1</sup> (5,58 eV) y se presentaron en las figuras Figura 6.6c y Figura 5.5 respectivamente. Los espectros fueron obtenidos bajo idénticas condiciones experimentales con el objetivo de poder realizar una comparación entre ambos. Con el objeto de facilitar la visualización, dichos resultados se muestran en forma conjunta en la Figura 6.13.



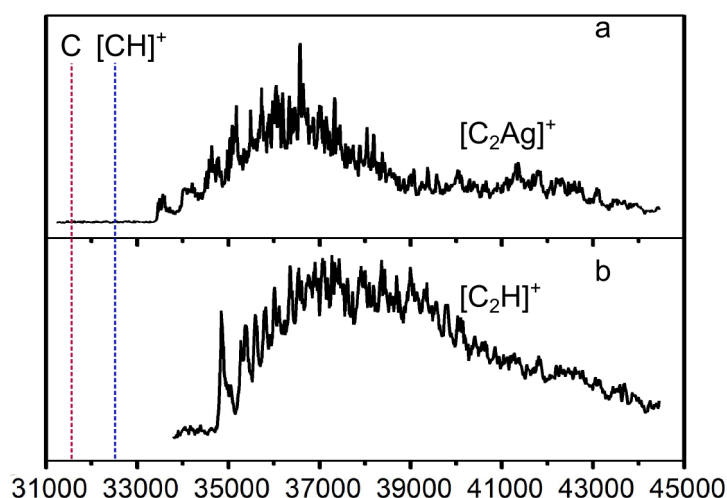


FIGURA 6.13: Espectros de FUV de los sistemas a)  $[C_2Ag]^+$  y b)  $[C_2H]^+$  en el rango espectral completo estudiado  $31000\text{ cm}^{-1}$  (3,84 eV) y  $45000\text{ cm}^{-1}$  (5,58 eV). En líneas punteadas se indican los orígenes de las transiciones electrónicas de los componentes individuales de los complejos, C[173] y  $CH^+$ . [174] Las transiciones electrónicas del átomo de plata, [108]  $30469,2\text{ cm}^{-1}$  (328,2 nm) y el catión  $Ag^+$   $90334,2\text{ cm}^{-1}$ ,  $89928,1\text{ cm}^{-1}$  y  $83612,1\text{ cm}^{-1}$  (110,7 nm, 111,2 nm y 119,6 nm) [109, 175] se encuentra fuera de escala.

El origen de las transiciones electrónicas para  $[C_2Ag]^+$  y  $[C_2H]^+$  se encuentran cercanas en energía, siendo  $33433,6\text{ cm}^{-1}$  (4,14 eV) la energía de absorción para el primero y  $34855,3\text{ cm}^{-1}$  (4,32) para el segundo. Éstas además, son similares a los orígenes de las transiciones electrónicas de la citosina neutra,  $C^{00}=31824,8\text{ cm}^{-1}$  (3,94 eV) [173] y la citosina protonada  $[CH]^{+00}=32948,9\text{ cm}^{-1}$  (4,08 eV). [174] En la Figura 6.14 se muestra una ampliación de la región espectral donde tienen lugar los orígenes de las transiciones para ambos complejos. En ésta puede verse claramente que los espectros de ambos sistemas presentan estructuras vibracionales y anchos de banda marcadamente diferentes.

Como se discutió en el Capítulo 5, el tiempo de vida del estado electrónico excitado puede estimarse del ancho de las bandas vibracionales a partir del ajuste a una función Voigt. [174] Bajo la aproximación de que no existe congestión espectral, el ensanchamiento de las bandas vibracionales está relacionado sólo con el tiempo de vida del estado electrónico excitado mediante el principio de incertidumbre, a través de la Ecuación 5.1. El espectro del complejo  $[C_2Ag]^+$  muestra claramente que la resolución espectral es lo suficientemente buena como para resolver progresiones vibracionales de modos tan bajos como  $24\text{ cm}^{-1}$ , además el ensanchamiento rotacional puede ser despreciado debido a que la temperatura del experimento es de alrededor de 30 K. [174] Teniendo en cuenta

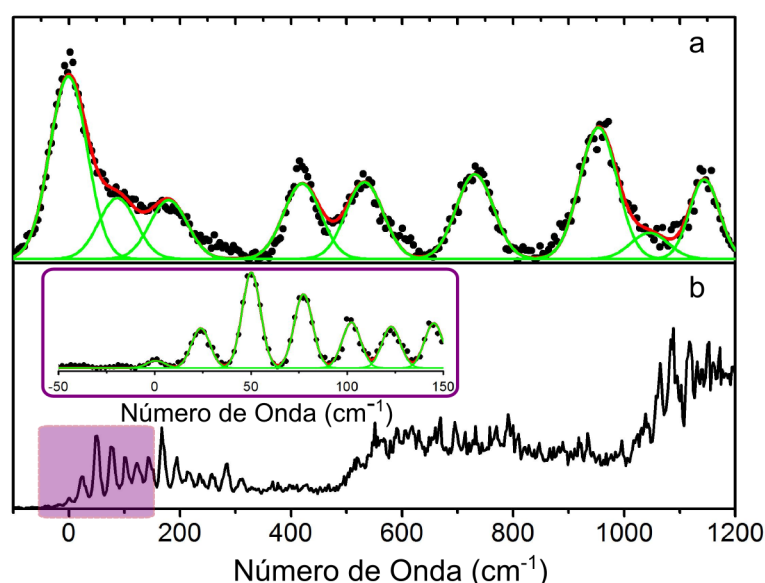


FIGURA 6.14: Región de baja energía de los espectros FUV. a)  $[C_2H]^+$  y b)  $[C_2Ag]^+$ . En el panel (b) se agregó una ampliación de los primeros  $150\text{ cm}^{-1}$  del espectro, en la cual se observa una progresión vibracional de baja frecuencia. Las bandas vibracionales fueron ajustadas a funciones Voigt.

estas consideraciones, podemos tomar por válida la aproximación dada por la Ecuación 5.1. Del análisis de las bandas vibracionales, se encontró que el ancho de banda (FWHM) Lorentziano del perfil Voigt utilizado para los ajustes, correspondiente al sistema  $[C_2Ag]^+$  es menor a  $1\text{ cm}^{-1}$  y está asociado a un tiempo de vida  $\tau > 5000\text{ fs}$ . Por otro lado para el sistema  $[C_2H]^+$ , como ya se mencionó en el Capítulo 5 el FWHM es de  $62\text{ cm}^{-1}$ , lo que corresponde un tiempo de vida estimado de  $\tau = 85\text{ fs}$ , que es al menos dos órdenes de magnitud menor que el correspondiente  $\tau$  del sistema  $[C_2Ag]^+$ . Esta notable diferencia muestra que la sustitución del  $H^+$  por  $Ag^+$  tiene un marcado efecto en la dinámica del estado electrónico excitado del complejo. El incremento del tiempo de vida del estado electrónico excitado encontrado para el complejo  $[C_2Ag]^+$ , es compatible con los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia encontrados para los agregados ADN- $Ag_n$ , sintetizados en matrices de ADN ricas en citosina,[46–48, 51] en comparación a los observados para ADN o nanopartículas de Ag.

Para complementar la discusión de los resultados experimentales, se realizaron simulaciones computacionales de las excitaciones electrónicas mediante cálculos al nivel de teoría RI-ADC(2). Para la comparación con el estado fundamental, las estructuras fueron re-optimizadas al nivel MP2.

TABLA 6.4: Estructuras y excitación electrónica de los sistemas  $[C_2Ag]^+$  y  $[C_2H]^+$ . <sup>a</sup> valores en unidades de  $eV$ . Las estructuras y energías del estado fundamental fueron recalculadas al nivel MP2 cc-pVDZ. Las estructuras y energías de los estados electrónicos excitados fueron calculados al nivel RI-ADC(2) cc-pVDZ

	$C_2Ag^+$ $0-0_{exp} = 4,16 eV$			$C_2H^+$ $0-0_{exp} = 4,32 eV$		
	$S_0^a$	$1A'(1)^a$	$1A''(1)^a$	$S_0^a$	$1A'(1)^a$	$1A''(1)^a$
Fuerza del oscilador		0,15	0,011		0,13	0,0004
Optimización $S_0$	0,00	4,79	4,88	0,00	4,92	5,82
Optimización $A'$	1,10	<b>4,10</b>	3,93	0,52	<b>4,44</b>	5,31
Optimización $A''$	2,00	5,32	<b>3,04</b>	3,29	3,63	<b>6,11</b>

La optimización de la estructura en el estado fundamental al nivel MP2 condujo al mismo resultado obtenido mediante la utilización de otros niveles de teoría. [144, 145, 171] Considerando que ambos complejos pertenecen al grupo de simetría  $C_s$ , se calcularon las energías de excitación vertical ( $E_{vert}$ ) de los estados electrónicos de simetría  $A'$  (densidad electrónica simétrica respecto al plano de simetría del complejo) y  $A''$  (densidad electrónica anti-simétrica respecto al plano de simetría del complejo) obtenidas se muestran en la Tabla 6.4.

En muchos casos donde las bases del ADN se encuentran en estado neutro o protonado, la optimización del estado  $S_1$  conduce a una deformación fuera del plano del anillo aromático, que conduce a una intersección cónica entre los estado  $S_0$  y  $S_1$ , dando como resultado una rápida desactivación del estado electrónico excitado mediante una conversión interna al estado  $S_0$ . [146] Los sistemas  $[C_2Ag]^+$  y  $[C_2H]^+$  son demasiado complejos por lo que, en una primera aproximación, considerando que las estructuras en el estado fundamental son planas, se consideró que en el estado electrónico excitado la estructura de los complejos mantienen su simetría  $C_s$ . Además, los estados  $A'$  y  $A''$  se encuentran muy cerca en energía, por lo que los intentos de optimización sin restricción de simetría,

fallan debido al cruzamiento y acoplamiento entre estados.

La optimización de los estados  $A'$  y  $A''$  con la restricción de simetría  $C_s$  permite estimar la energía de excitación adiabática ( $E_{ad}$ ), aproximación ya empleada en la discusión del Capítulo 5. La ( $E_{ad}$ ) calculadas de esta forma, están de acuerdo con los orígenes de las transiciones obtenidas experimentalmente ( $0-0_{exp}$ ). Esta información se resume en la Figura 6.15 y la Tabla 6.4.

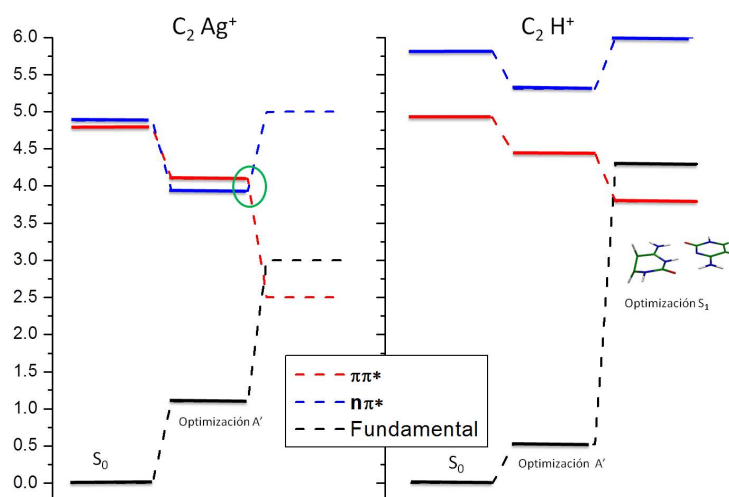


FIGURA 6.15: Esquema de los niveles de energía de los sistemas  $[C_2Ag]^+$  y  $[C_2H]^+$ . Las líneas indican las energías obtenidas a través de la optimización del estado fundamental y el  $A'$ . Para el sistema  $[C_2H]^+$ , el estado excitado  $S_1$  puede optimizarse sin restricción de simetría, dando como resultado una geometría fuertemente distorsionada. Para el sistema  $[C_2Ag]^+$ , la optimización de los estados electrónicos excitados sin restricción de simetría no converge, probablemente debido a que los dos estados excitados están muy cerca en energía. Las líneas punteadas son indicativas del posible mecanismo de decaimiento no radiativo.

En la Tabla 6.4 se muestran, resaltadas en negro las energías de excitación ( $E_{ad}$ ) desde el estado fundamental al primer estado  $A''$  para cada complejo. Además, en rojo se muestran los valores de excitación que mejor se ajustan a los valores obtenidos experimentalmente para el origen de las transiciones electrónicas de cada complejo ( $0-0_{exp}$ ). En ambos casos, se trata de la transición desde el estado fundamental al primer estado excitado de simetría  $A'$ . Para ambos iones el estado  $A'$  corresponde a una excitación del tipo  $\pi\pi^*$ , con la diferencia de que, para el sistema  $[C_2Ag]^+$ , dicha excitación ocurre con una transferencia parcial de carga (TC) entre las dos moléculas (Figura 6.16).

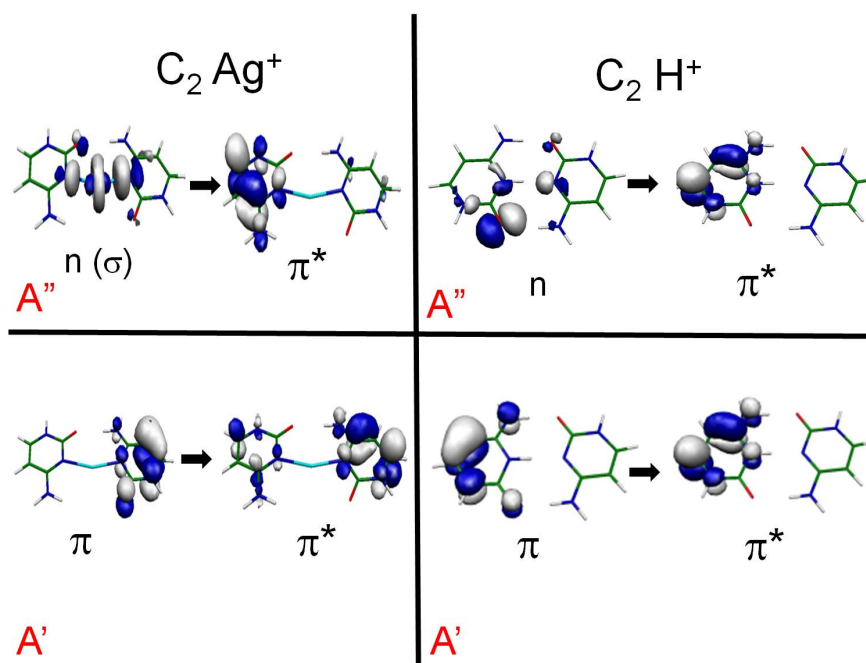


FIGURA 6.16: Principales orbitales involucrados en las transiciones electrónicas que conducen a los estados excitados  $A'$  y  $A''$  de los sistemas  $[C_2Ag]^+$  y  $[C_2H]^+$

En el caso del sistema  $[C_2Ag]^+$ , a la geometría de equilibrio del estado fundamental, el estado  $\pi\pi^*$  ( $A'$ ) es de menor energía que el estado excitado  $A''$  (Figura 6.15), que se puede caracterizar como un estado  $n_{Ag}\pi^*$  (Figura 6.16). La optimización en el estado electrónico excitado  $A'$  con restricción de simetría  $C_s$ , estabiliza el estado  $A''$  a menor energía respecto al estado  $A'$  ópticamente accesible (Figura 6.15). Luego de una deformación del plano, la optimización del estado  $A''$  devuelve el sistema a su estado planar. Por otro lado, la optimización de la misma deformación en el estado estado  $A'$  produce una estabilización de la energía. Esto puede implicar que a lo largo de la coordenada de deformación del plano molecular, el cruce entre los estados  $\pi\pi^*$  y  $n\pi^*$  puede producir una barrera de energía, que evitaría la relajación no radiativa rápida del estado  $S_1$  por medio de la conversión interna al estado  $S_0$ .

Por otro lado, en el caso del complejo  $[C_2H]^+$ , el estado  $n\pi^*$  ( $A''$ ) se mantiene por encima del estado  $\pi\pi^*$  ( $A'$ ) luego de la optimización bajo las restricción de simetría  $C_s$ . En ausencia de la restricción de simetría  $C_s$ , ambos estados se mezclan y la optimización del estado  $S_1$  conduce a un cruzamiento con el estado fundamental. Es probable que exista una correlación entre la diferencia de energía entre los estados  $\pi\pi^*$  y  $n\pi^*$ , y la el incremento en el tiempo de vida observado cuando el estado  $n\pi^*$  es ligeramente más estable que el  $\pi\pi^*$ , sin embargo esto se encuentra aún bajo análisis ya que para llegar a

esta conclusión es necesario disponer de un número apreciable de datos que puedan ser contrastables por medio de simulaciones.

Una hipótesis para racionalizar la diferencia de los tiempos de vida observados para los sistema  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$  y  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  es la siguiente: la transición electrónica produce el estado  $\pi\pi^*$  en su estructura de simetría Cs. Si no hay un estado  $n\pi^*$  de menor energía, el estado  $S_1 \pi\pi^*$  fácilmente puede sufrir una deformación en el plano, lo que produce una conversión interna al estado fundamental. Por otro lado, si existe un estado  $n\pi^*$  de menor energía, la deformación en el plano produce un cruzamiento entre estos estado, generando una barrera en la coordenada de deformación del plano, que previene el cruzamiento del estado  $\pi\pi^*$  con el estado fundamental a bajas energías de excitación. Por lo que en el segundo caso, se esperaría un aumento del tiempo de vida del estado excitado.

## 6.4. Conclusiones

Durante el desarrollo de este capítulo, como primera aproximación al entendimiento de las interacciones del tipo  $\text{ADN} \cdots \text{Ag}_n$ , se estudió como modelo simplificado la interacción entre  $\text{Ag}^+$  y la molécula de citosina. Los experimentos realizados por espectroscopía de disociación multifotónica IR permitieron determinar la estructura de los complejos que forma la molécula con el catión, con el fin de entender como dicha interacción permite estabilizar estructuras no canónicas en el ADN. Debido a la complejidad del sistema en estudio se optó por un enfoque “bottom-up”, por lo que se estudiaron sistemas de complejidad creciente partiendo por el sistema  $[\text{CAG}]^+$ ,  $[\text{CAG-H}_2\text{O}]^+$  y  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ . Posteriormente, una vez conocida la estructura del sistema  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$  se estudió su espectroscopía UV mediante la técnica FUV, y los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes al sistema  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  con el fin de evaluar el efecto del tipo de catión sobre la fotofísica de los sistemas del tipo  $\text{ADN} \cdots \text{Ag}_n$ .

En las Secciones 6.3.1 y 6.3.2, se presentaron los estudios de la interacción de  $\text{Ag}^+$  con citosina ( $[\text{CAG}]^+$ ), y su complejo de solvatación ( $[\text{CAG-H}_2\text{O}]^+$ ). Para el sistema  $[\text{CAG}]^+$ , se encontró que la estructura del complejo presente en las condiciones experimentales es muy similar al obtenido para la interacción de la C con otros cationes. En dicha estructura, la molécula se encuentra en su estado tautomérico ceto-amino (KA) e interacción con el catión  $\text{Ag}^+$  simultáneamente a través del N(3) heterocíclico y el O del

grupo C=O. Notablemente, los canales de fragmentación del complejo [CAg]<sup>+</sup> difieren de los observados para los complejos de citosina con cationes alcalinos y protón. En particular, la diferencia más importante es la observada respecto al complejo [CLi]<sup>+</sup>, puesto a que ambos complejos tienen estructuras y energías de disociación (catión...C) similares, pero los canales de fragmentación y las eficiencias de fragmentación son muy diferentes, éste fenómeno probablemente se deba a la naturaleza del enlace catión...C o a la energética de los canales de fragmentación.

Para el complejo de solvatación [CAg-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, se encontró que existen dos estructuras isoméricas quasi-isoenergéticas, y que en las condiciones de trabajo se puede dar cuenta del espectro experimental de DMIR obtenido sólo si se considera la presencia de ambas estructuras.

En la Sección 6.3.3, combinando la espectroscopía DMIR y simulaciones computacionales se logró asignar la estructura del par de bases no convencional [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>, en la cual ambas moléculas de citosina se encuentran en su forma ceto-amino (KA), y el catión plata interactúa con simetría  $\sigma$  con los pares electrónicos no enlazantes del N(3) de cada molécula. La estructura encontrada para este sistema es relevante debido a su similitud a la estructura ya conocida del dímero protonado [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> responsable de la estabilización del plegamiento de forma i-motif del ADN. Al comparar las estructuras de los sistemas [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> y [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> encontramos que la formación de este último consiste en el reemplazo del enlace intermolecular NH<sup>+</sup>...N, por el enlace N...Ag<sup>+</sup>...N que resulta ser más fuerte que el primero. Es probable que el aumento de la estabilidad del sistema [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup> se deba a un efecto cooperativo entre la formación de la interacción N...Ag<sup>+</sup> y el enlace de puente hidrógeno intermolecular. El estudio de la competencia entre Ag<sup>+</sup> y H<sup>+</sup> en el plegamiento i-motif podría dar lugar al desarrollo de switches moleculares dependientes de pH y la concentración de Ag<sup>+</sup>.

Finalmente, mediante espectroscopía FUV se encontró que la formación del dímero de dos moléculas de citosina con el catión Ag<sup>+</sup>, no cambia drásticamente las propiedades de la transición electrónica respecto a lo observado para [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup> y [CH]<sup>+</sup> en cuanto a su energía de excitación, al contrario a lo encontrado para agregados catiónicos de plata u oro con aminoácidos, para los cuales se encuentra una nueva banda de absorción en la región entre 300 nm y 450 nm, que se atribuye a una banda de transferencia de carga.[176–182] Los resultados aquí mostrados están de acuerdo con lo reportado por

Fyngenson y colaboradores [49], que sugieren que en fase condensada la absorción UV de los sistema ADN-Ag<sub>n</sub> altamente fluorescentes se debe a la excitación electrónica de las bases del ADN. Por otro lado el acomplejamiento con Ag<sup>+</sup> cambia significativamente el tiempo de vida del estado electrónico excitado, cuando se lo compara con el acomplejamiento con H<sup>+</sup>. El origen de ésta diferencia se puede interpretar como un efecto del catión Ag<sup>+</sup> sobre las superficies de energía potencial de los estados electrónicos excitados, que genera una barrera de energía en el camino hacia la intersección cónica entre el estado fundamental y el excitado. Esta intersección cónica sí está presente en el sistema [C<sub>2</sub>H]<sup>+</sup>, lo que lleva a una rápida desactivación no radiativa de este último. Es de esperarse que el aumento del tiempo de vida del estado electrónico excitado encontrado para el sistema [C<sub>2</sub>Ag]<sup>+</sup>, esté relacionado con los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia observados para los sistemas ADN...Ag<sub>n</sub>, aunque debe tenerse en cuenta que la fluorescencia de estos últimos aparece luego de la reducción química de catión Ag<sup>+</sup>. Sin embargo Dougurd y colaboradores [176–182] han establecido que los sistemas catiónicos pueden dar información relevante respecto a de las propiedades ópticas de los agregado híbridos metal-biomolécula.

Uno de los objetivo principales de la conjugación entre metales y sistemas biológicos, es la creación de una nueva generación de sensores moleculares, y la espectroscopía en fase gaseosa puede ayudar a desarrollar sistemas modelos para construir el entendimiento de estos sistemas desde un enfoque “bottom-up”. En este contexto, el próximo paso en esta investigación consiste en el estudio mediante DMIR y FUV de agregados de Ag<sub>n</sub>, con cierto grado de reducción química, interaccionando con pequeños oligonucleótidos.



## Capítulo 7

# Conclusiones y Perspectivas

---

## 7.1. Conclusiones y Perspectivas

El objetivo central del este trabajo doctoral fue el de estudiar cómo la interacción con diferentes átomos y cationes permite estabilizar apareamientos y plegamientos no canónicos en el ADN/ARN y cómo dicha interacción modifica las propiedades ópticas de los agregados generados, de forma tal de dilucidar las razones que originan los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia de los sistemas híbridos  $\text{Ag}_n$ -ADN. Para obtener información molecular detallada acerca del problema de investigación planteado, se eligieron sistemas modelo simplificados, factibles de ser estudiados en fase gaseosa, asilados y mediante técnicas de espectroscopía láser. De tal forma que los resultados obtenidos establezcan un punto de partida que permita avanzar en el estudio del problema planteado, desde un enfoque “bottom-up” aumentando la complejidad del modelo empleado. En este marco, los sistemas químicos más relevantes empleados fueron la piridina, la tirosina y las bases del ADN/ARN. Para obtener información acerca de la estructura de los agregados estudiados se utilizó la espectroscopía de disociación multifotónica IR, y las técnicas de ionización multifotónica aumentada por resonancia y la fragmentación UV fueron empleadas para estudiar la fotofísica de dichos agregados. Los resultados experimentales siempre se acompañaron de simulaciones de estructura electrónica.

A continuación se repasan brevemente, las conclusiones mas importantes a las que se arribó a lo largo de esta tesis:

En una primera instancia en el Capítulo 4 se estudió la interacción de moléculas orgánicas con átomos y cationes metálicos. Para esto, primero, se probó el funcionamiento del sistema experimental desarrollado durante esta tesis, en cuanto a su capacidad de generar agregados moleculares, de moléculas aromáticas volátiles (MOv) a partir de expansiones supersónicas, o expansiones supersónicas acopladas a vaporización láser de metales y MOv. Cabe recalcar en este punto que, el diseño, construcción y ensamblado del espectrómetro lineal TOF del tipo Wiley McLaren para estudios tanto espectrométricos como espectroscópicos REMPI-TOF constituyó un apartado especial en este doctorado, y que dicho equipamiento con resolución isotópica en el análisis de especies, se encuentra en funcionamiento en los laboratorios del INFIQC-CLCM-UNC.

Los resultados obtenidos en cuanto a la generación de agregados por la expansión supersónica de MOv muestran que es posible generar agregados del tipo  $(\text{Tol})_n$  con

$n=1-12$ , lo que constituye una fuerte evidencia de que el sistema diseñado y construido funciona exitosamente en lo que respecta a la generación de agregados moleculares mediante expansiones supersónicas y detección por fotoionización acoplada a espectrometría de masas. Posteriormente, los experimentos realizados acoplando la expansión supersónica sembrada con Tol junto con la vaporización láser de Ba metálico, muestran que dicho acoplamiento funciona existosamente, en el sentido de que el enfriamiento producido por la expansión es suficiente para enfriar colisionalmente el producto de la vaporización y generar agregados entre moléculas orgánicas sembradas en la expansión y átomos metálicos producidos por la vaporización.

Más allá de que el sistema experimental parece funcionar correctamente para la generación de agregados del tipo  $[Ba_n(Tol)_m]$ , no se logró obtener agregados del átomo de Ag o  $Ag_n$  con moléculas orgánicas. De manera notable, la generación y detección de agregados del catión  $Ag^+$  con Tol y Pyr generados en estado iónico a partir de la vaporización láser no revistió mayor dificultad.

La discusión llevada a cabo acerca de la naturaleza de la interacción de Ba,  $Ba^+$ , Ag y  $Ag^+$  con el Tol parecen indicar que las diferencias observadas en el comportamiento de estas especies no se debe a la energía de interacción o a la estabilidad de los agregados en el estado neutro, sino a la eficiencia de detección de los agregados neutros por medio del esquema de fotoionización utilizado. En el caso de los agregados de MOv con Ba, la energía de ionización de los mismos se encuentra por debajo de la energía del fotón de ionización de 4,66 eV, lo cual posibilita su ionización por absorción de un solo fotón. Por el contrario, los agregados con Ag poseen un potencial de ionización de mayor energía que la del fotón, lo cual hace necesaria la absorción de dos fotones de 4,66 eV, utilizando un estado electrónico excitado intermediario para la absorción del segundo fotón. Los cálculos teóricos muestran que a la energía de excitación del primer fotón existe una gran congestión de estados electrónicos excitados que pueden inducir procesos de desactivación no-radiativa del estado electrónico intermediario, conduciendo a un tiempo de vida muy corto para dicho estado, lo que imposibilita la absorción eficiente del segundo fotón, cuando se utilizan láseres con pulsos de nanosegundos. Por lo tanto, el proceso de ionización necesario para la detección de los agregados neutros, no se lleva a cabo independientemente de que los mismos hayan sido generados.

La imposibilidad de detectar agregados de Ag neutros por fotoionización marcó un

punto de inflexión en el desarrollo de este trabajo de tesis, y significó un vuelco hacia el estudio de agregados catiónicos.

Como primera aproximación al estudio de sistemas iónicos, se eligió estudiar la espectroscopía de sistemas protonados, esta elección se basó principalmente en dos hechos. Por un lado, y desde un punto de vista experimental, la gran versatilidad de las fuentes de electrospray para la generación de agregados protonados era un punto de partida alentador para el estudio de la interacción de las bases del ADN/ARN con cationes. Por otro lado, estudiar la espectroscopía de los sistemas protonados, sentaría una base para establecer por comparación el efecto del cambio del catión por un uno metálico.

En lo que respecta a las bases protonadas del ADN/ARN, se obtuvo un conjunto completo de datos experimentales acerca de sus propiedades espectroscópicas, y se realizó una asignación estructural de la especies presentes bajo las condiciones experimentales empleadas. En los casos en que la comparación entre la base neutra y protonada fue posible, se observó que la protonación no induce un cambio drástico en la energía de la excitación electrónica, a diferencia de lo observado en otras especies aromáticas. En cuanto al tiempo de vida en el estado excitado, al igual que se observa para las bases neutras, los tautómeros protonados de relevancia biológica presentan tiempo de vida cortos. Sólo uno de los tautómeros de  $[UH]^+$  y el único isómero detectado de la  $[GH]^+$ , que no pueden ser generados por transferencia de protón en los pares de WC, tienen tiempos de vida largos.

Posteriormente al estudio de la espectroscopía de las bases protonadas del ADN/ARN, se abordó el estudio de la respuesta espectroscópica de los homodímeros protonados de las bases pirimidínicas del ADN/ARN. Los espectros obtenidos indican que, el tiempo de vida del estado electrónico excitado de los homodímeros protonados es mayor a unas pocas decenas de fs, e incluso mayor para el dímero de timina. El caso de  $[T_2H]^+$  es sorprendente pues se observa un espectro con buena resolución espectral, al contrario de lo encontrado para el monómero protonado, lo que indica que la formación del dímero produce un aumento del tiempo de vida del estado electrónico excitado. La absorción de los dímeros ocurre a energías intermedias a la absorción de los dos tautómeros encontrados para los correspondientes monómeros protonados ( $EA^+/EE^+$  y  $KA^+/KE^+$ ) y los cálculos de estructura electrónica muestran que la transición, en el caso de los dímeros está localizada en la entidad protonada. Además, los cálculos de estructura

electrónica muestran que, en el estado fundamental de los dímeros, los protones N-H y O-H involucrados en los enlaces de puente hidrógeno intermoleculares, no se encuentran localizados en una de las bases sino que son móviles, debido a que las energías de los estados de transición para las coordenadas de interconversión  $N \cdots H \cdots N$  y  $O \cdots H \cdots O$  son pequeñas.

Los datos experimentales obtenidos en cuanto a la espectroscopía de las bases y los homodímeros protonados pueden ser utilizados como punto de referencia para estudiar por comparación, el efecto del cambio de la naturaleza del catión y/o la estructura molecular, sobre la energía de excitación y los tiempos de vida del estado electrónico excitado. Estos resultados se encuentran condensados en las dos publicaciones siguientes:

· M. Berdakin, G. Feraud, C. Dedonder, C. Jouvét y G. A. Pino. Excited States of Protonated DNA/RNA Bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:10643-1650, 2014.

· G. Feraud, M. Berdakin, C. Dedonder, C. Jouvét y G. A. Pino. Excited States of Proton-Bound DNA/RNA Base Homodimers: Pyrimidines. *J. Phys. Chem. B*, DOI: 10.1021/jp505756a.

Posteriormente, como primera aproximación al entendimiento de las interacciones del tipo  $ADN \cdots Ag_n$ , se estudió como modelo simplificado la interacción entre  $Ag^+$  y la molécula de citosina. Los experimentos realizados por espectroscopía de DMIR permitieron determinar la estructural de los complejos que forma la molécula con el catión, con el fin de entender como dicha interacción permite estabilizar estructuras no canónicas en el ADN. Debido a la complejidad del sistema en estudio se optó por un enfoque “bottom-up”, por lo que se estudiaron sistemas de complejidad creciente partiendo por el sistema  $[CAg]^+$ ,  $[CAg-H_2O]^+$  y  $[C_2Ag]^+$ . Una vez conocida la estructura del sistema  $[C_2Ag]^+$  se estudió su espectroscopía UV mediante la técnica FUV, y los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes al sistema  $[C_2H]^+$  con el fin de evaluar el efecto del tipo de catión sobre la fotofísica de los sistemas del tipo  $ADN \cdots Ag_n$ .

Para el ión  $[CAg]^+$ , se encontró que la estructura del complejo presente en las condiciones experimentales es muy similar al obtenido para la interacción de la C con los cationes de los metales alcalinos. En dicha estructura, la molécula se encuentra en su estado tautomérico ceto-amino (KA) e interacciona con el catión  $Ag^+$  simultáneamente a través del N(3) heterocíclico y el O del grupo C=O. Notablemente, los canales de

fragmentación del complejo  $[\text{C}Ag]^+$  difiere de los observados para los complejos de citosina con cationes alcalinos y protón. En particular, la diferencia más importante es la observada respecto al complejo  $[\text{CLi}]^+$ , puesto a que ambos complejos tienen estructuras y energías de disociación (catión $\cdots$ C) similares, pero los canales de fragmentación y las eficiencias de fragmentación son muy diferentes, éste fenómeno probablemente se deba a la naturaleza del enlace catión $\cdots$ C o a la energética de los canales de fragmentación.

Para el complejo de solvatación del ión KA1 ( $[\text{C}Ag\text{-H}_2\text{O}]^+$ ), se encontró que existen dos estructuras isoméricas casi-isoenergéticas, y que en las condiciones de trabajo se puede dar cuenta del espectro experimental de DMIR obtenido, sólo si se considera la presencia de ambas estructuras. Correspondientes a dos sitios de interacción del catión  $\text{Ag}^+$  con la C. En el primero, el catión interacciona directamente N(3) heterocíclico y en el último, el catión se encuentra más cerca del átomo del oxígeno carbonílico. En ambos casos, la molécula de agua se ubica formando ángulos de alrededor de  $180^\circ$

Combinando la espectroscopía DMIR y simulaciones computacionales se logró asignar la estructura del par de bases no convencional  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , en la cual ambas moléculas de citosina se encuentran en su forma ceto-amino (KA), y el catión plata interacciona con simetría  $\sigma$  con los pares electrónicos no enlazantes del N(3) de cada molécula. La estructura encontrada para este sistema es relevante debido a su similitud a la estructura ya conocida del dímero protonado  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  responsable de la estabilización del plegamiento de forma i-motif del ADN. Al comparar las estructuras de los sistemas  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  y  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$  encontramos que la formación de este último consiste en el reemplazo del enlace intermolecular  $\text{NH}^+\cdots\text{N}$ , por el enlace  $\text{N}\cdots\text{Ag}^+\cdots\text{N}$  que resulta ser más fuerte que el primero.

Finalmente, mediante espectroscopía FUV se encontró que la formación del dímero de dos moléculas de citosina con el catión  $\text{Ag}^+$ , no cambia drásticamente las propiedades de la transición electrónica respecto a lo observado para  $[\text{C}_2\text{H}]^+$  y  $[\text{CH}]^+$  en cuanto a su energía de excitación, al contrario que lo encontrado para agregados catiónicos de plata u oro con aminoácidos, para los cuales se encuentra una nueva banda de absorción en la región entre  $33333\text{ cm}^{-1}$  (4,13 eV) y  $22222\text{ cm}^{-1}$  (2,76 eV), que se atribuye a una banda de transferencia de carga.[176–182] Los resultados mostrados están de acuerdo con lo reportado por Fyngenson y colaboradores,[49] que sugieren que en fase condensada la absorción UV de los sistema ADN- $\text{Ag}_n$  altamente fluorescentes se debe a la excitación

electrónica de las bases del ADN. Por otro lado el acomplejamiento con  $\text{Ag}^+$  cambia significativamente el tiempo de vida del estado electrónico excitado, cuando se lo compara con el acomplejamiento con  $\text{H}^+$ . El origen de esta diferencia se puede interpretar como un efecto del catión  $\text{Ag}^+$  sobre las superficies de energía potencial de los estados electrónicos excitados, que genera una barrera de energía en el camino hacia la intersección cónica entre el estado fundamental y el excitado. Esta intersección cónica está presente en el sistema  $[\text{C}_2\text{H}]^+$ , lo que lleva a una rápida desactivación no radiativa por conversión interna al estado  $\text{S}_0$  de este último. Es de esperarse que el aumento del tiempo de vida del estado electrónico excitado encontrado para el sistema  $[\text{C}_2\text{Ag}]^+$ , esté relacionado con los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia observados para los sistemas  $\text{ADN} \cdots \text{Ag}_n$ .

Los resultados obtenidos en cuanto a la estructura y propiedades ópticas de los agregados del ión  $\text{Ag}^+$  con citosina se encuentran en las siguientes dos publicaciones:

· M. Berdakin, V. Steinmetz, P. Maître, y G. A. Pino. Gas Phase Structure of Metal Mediated (Cytosine) $_2\text{Ag}^+$  Mimics the Hemiprotonated (Cytosine) $_2\text{H}^+$  Dimer in i-Motif Folding. *J. Phys. Chem A*, 118:3804-3809, 2014

· M. Berdakin, G. Feraud, C. Dedonder, C. Jouvét y G. A. Pino. Effect of  $\text{Ag}^+$  on the Excited-State Properties of a Gas-Phase (Cytosine) $_2\text{Ag}^+$  Complex: Electronic Transition and Estimated Lifetime. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5:2295-2301, 2014.

Como ya se mencionó, entre los objetivos principales de la conjugación entre metales y sistemas biológicos, está la creación de una nueva generación de sensores moleculares y manipular la estructura secundaria y terciaria del ADN/ARN. La espectroscopía en fase gaseosa puede contribuir al entendimiento de estos procesos desde un enfoque “bottom-up” mediante el uso de sistemas modelo. En este contexto, el avance en esta investigación consiste en aumentar la complejidad del objeto de estudio. Así una de las direcciones que ésta puede tomar es el de estudiar mediante DMIR y FUV de agregados de  $\text{Ag}_n$ , con cierto grado de reducción química, interaccionando no sólo con las bases nitrogenadas sino también con los nucleósidos, nucleótidos y pequeños oligonucleótidos.

A lo largo de la tesis se realizaron pruebas para probar la factibilidad de incrementar la complejidad del sistema químico estudiado. En particular se evaluó la posibilidad de estudiar agregados de complejidad creciente formados por la interacción de  $\text{Ag}^+$  con citidina (Cyt, citosina+ribosa) y citidinia monofosfato (CytPhos, citosina+ribosa+fosfato). En la Figura 7.1a se muestran los resultados obtenidos mediante espectroscopía de

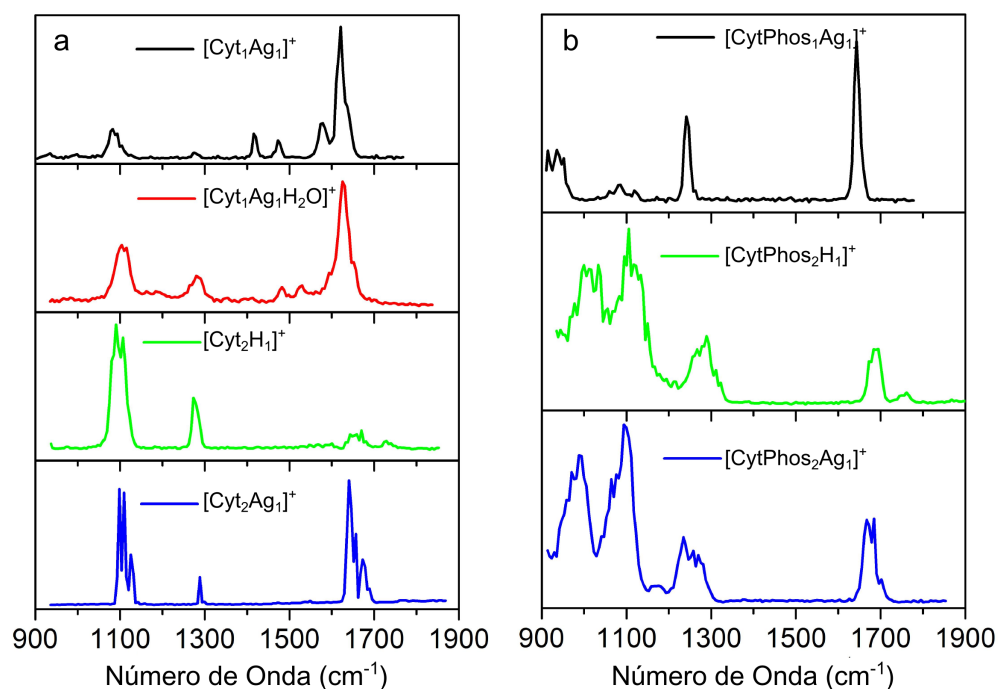


FIGURA 7.1: a) Espectro de DMIR experimentales correspondiente a los iones  $[\text{Cyt}_1\text{Ag}_1]^+$ ,  $[\text{Cyt}_1\text{Ag}_1\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{Cyt}_2\text{Ag}_1]^+$  y  $[\text{Cyt}_2\text{H}_1]^+$ , b) Espectros de DMIR experimentales correspondientes a los iones  $[\text{CytPhos}_1\text{Ag}_1]^+$ ,  $[\text{CytPhos}_2\text{Ag}_1]^+$  y  $[\text{CytPhos}_2\text{H}_1]^+$ .

DMIR para los siguientes agregados con Cyt,  $[\text{Cyt}_1\text{Ag}_1]^+$ ,  $[\text{Cyt}_1\text{Ag}_1\text{H}_2\text{O}]^+$ ,  $[\text{Cyt}_2\text{Ag}_1]^+$  y  $[\text{Cyt}_2\text{H}_1]^+$ . Por otro lado en la Figura 7.1b se muestran los espectros de DMIR obtenidos para los agregados de  $\text{Ag}^+$  con CytPhos,  $[\text{CytPhos}_1\text{Ag}_1]^+$ ,  $[\text{CytPhos}_2\text{Ag}_1]^+$  y  $[\text{CytPhos}_2\text{H}_1]^+$ . En estas figuras se observa claramente enormes diferencias entre los agregados, en las bandas de absorción originadas por los grupos N-H y C=O ( $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ - $1800\text{ cm}^{-1}$ ), las bandas de absorción C-C y C-H de la ribosa ( $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ - $1150\text{ cm}^{-1}$ ) y la región de absorción del grupo fosfato ( $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ - $1000\text{ cm}^{-1}$ ). La complejidad química y estructural de estos sistemas combinado con la limitación experimental dada por la resolución espectral del láser hace que, una caracterización estructural precisa como las realizadas durante esta tesis sea difícil de alcanzar. Sin embargo creemos que el contraste de los resultados experimentales obtenidos para estos sistemas de complejidad creciente, con simulaciones computacionales específicas para la exploración de superficies de energía potencial (dinámica molecular y/o Montecarlo), más la simulación de espectros mediante métodos de estructura electrónica, podría brindar una muy valiosa información acerca del sitio de unión de los cationes en el nucleótido completo. Es decir,



si la presencia del grupo fosfato y la ribosa modifican el sitio de interacción de los cationes, o si aún en presencia de los primeros, el sitio de unión preferencial de los cationes se mantiene en los grupos funcionales de la base.



# Bibliografía

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, y M. McCarthy. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types: Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated From Pneumococcus Type III. *J.Exp.Med.*, 79:137–158, 1944.
- [2] M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, y H. R. Wilson. Molecular Structure of Deoxy-pentose Nucleic Acids. *Nature*, 171:738–740, 1953.
- [3] R. E. Franklin y R. G. Gosling. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature*, 171:740–741, 1953.
- [4] J. D. Watson y F. H. C. Crick. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [5] W. Saenger. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1984.
- [6] S. Neidle. *Nucleic Acid Structure and Recognition*. Oxford University Press, Oxford, 2002.
- [7] C. R. Calladine y H. R. Drew. *Understanding DNA. The Molecule & How It Works*. Academic Press, London, 1997.
- [8] S. Neidle. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- [9] C. Branden y J. Tooze. *Introduction to Protein Structure*. Garland Science, New York, 1999.
- [10] J. Šponer y F. Lankaš. *Computational Studies of RNA and DNA*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2006.

- [11] V. Gabelica. *Nucleic Acids in the Gas Phase*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2014.
- [12] A. Gelbin, B. Schneider, L. Clowney, S. Hsieh, W. K. Olson, y H. M. Berman. Geometric Parameters in Nucleic Acids : Sugar and Phosphate Constituents. *J. Am. Chem. Soc.*, 118:519–529, 1996.
- [13] P. O. Löwdin. Proton Tunneling in DNA and its Biological Implications. *Rev. Mod. Phys.*, 35:724–732, 1963.
- [14] P. O. Löwdin. Quantum Genetics and the Aperiodic Solid: Some Aspects on the Biological Problems of Heredity, Mutations, Aging, and Tumors in View of the Quantum Theory of the DNA Molecule . *Adv. Quant. Chem.*, 2:213 – 360, 1965.
- [15] M. S. Redfearn. Proton Tunneling in Radiation-Induced Mutation. *Science*, 146: 649–650, 1964.
- [16] R. E. Dickerson, H. R. Drew, B. N. Conner, R. M. Wing, A. V. Fratini, y M. L. Kopka. The Anatomy of A, B, and Z-DNA. *Science*, 216:475–486, 1982.
- [17] D. B. Oh, Y. G. Kim, y A. Rich. Z-DNA-Binding Proteins Can Act as Potent Effectors of Gene Expression in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:16666–16671, 2002.
- [18] S. Johannsen, N. Megger, D. Böhme, R. K. O. Sigel, y J. Müller. Solution Structure of a DNA Double Helix With Consecutive Metal-Mediated Base Pairs. *Nat. Chem.*, 2:229–234, 2010.
- [19] Y. Miyake, H. Togashi, M. Tashiro, H. Yamaguchi, S. Oda, M. Kudo, Y. Tanaka, Y. Kondo, R. Sawa, T. Fujimoto, y T. Machinami. Mercury<sup>II</sup>-Mediated Formation of Thymine-Hg<sup>II</sup>-Thymine Base Pairs in DNA Duplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 128: 2172–2173, 2006.
- [20] A. Ono, C. Shiqi, T. Humika, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, y Y. Tanaka. Specific Interactions Between Silver(I) Ions and Cytosine-Cytosine Pairs in DNA Duplex. *Chem. Comm.*, 44:4825–4827, 2008.
- [21] Y. Takezawa y M. Shionoya. Metal-Mediated DNA Base Pairing: Alternatives to Hydrogen-Bonded Watson-Crick Base Pairs. *Acc. Chem. Res.*, 45:2066–2076, 2012.

- [22] N. C. Seeman. DNA in a Material World. *Nature*, 421:427–431, 2003.
- [23] X. Li y D. R. Liu. DNA-Templated Organic Synthesis: Nature’s Strategy for Controlling Chemical Reactivity Applied to Synthetic Molecules. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:4848–4870, 2004.
- [24] Y. Lu y J. Liu. Functional DNA Nanotechnology: Emerging Applications of DNazymes and Aptamers. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:580–588, 2006.
- [25] U. Feldkamp y C. M. Niemeyer. Rational Design of DNA Nanoarchitectures. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45:1856–76, 2006.
- [26] C. M. Niemeyer y C. A. Mirkin. *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [27] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, y S. Neidle. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. *Nucleic Acids Res.*, 34:5402–15, 2006.
- [28] L. H. Hurley. DNA and its Associated Processes As Targets for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2:188–200, 2002.
- [29] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, y P. B. Arimondo. The Triple Helix: 50 Years Later, the Outcome. *Nucleic Acids Res.*, 36:5123–5138, 2008.
- [30] K. Gehring, J. L. Leroy, y M. Guéron. A Tetrameric DNA Structure With Protonated Cytosine-Cytosine Base Pairs. *Nature*, 363:561–565, 1993.
- [31] P. Fojtík y M. Vorlíčková. The Fragile X Chromosome (GCC) Repeat Folds Into a DNA Tetraplex at Neutral pH. *Nucleic Acids Res.*, 29:4684–4690, 2001.
- [32] M. Guéron y J. L. Leroy. The i-motif in Nucleic Acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:326–331, 2000.
- [33] X. Li, Y. Peng, J. Ren, y X. Qu. Carboxyl-Modified Single-Walled Carbon Nanotubes Selectively Induce Human Telomeric i-motif Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103:19658–19663, 2006.
- [34] D. Sun y L. H. Hurley. The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-Myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression. *J. Med. Chem.*, 52:2863–2874, 2009.

- [35] J. Zhou, C. Wei, G. Jia, X. Wang, Z. Feng, y C. Li. Formation of i-motif Structure at Neutral and Slightly Alkaline pH. *Mol. Biosyst.*, 6:580–586, 2010.
- [36] H. A. Day, C. Huguin, y Z. A. E. Waller. Silver Cations Fold i-motif at Neutral pH. *Chem. Comm.*, 49:7696–7698, 2013.
- [37] L. A. Peyser, A. E. Vinson, A. P. Bartko, y R. M. Dickson. Photoactivated Fluorescence From Individual Silver Nanoclusters. *Science*, 291:103–106, 2001.
- [38] J. Zheng, P. R. Nicovich, y R. M. Dickson. Highly Fluorescent Noble-Metal Quantum Dots. *Annu. Rev. Phy. Chem.*, 58:409–431, 2007.
- [39] K. L. Kelly, E. A. Coronado, L. L. Zhao, y G. C. Schatz. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B.*, 107:668–677, 2003.
- [40] P. Gruene, D. M. Rayner, B. Redlich, A. F. G. van der Meer, J. T. Lyon, G. Meijer, y A. Fielicke. Structures of Neutral Au<sub>7</sub>, Au<sub>19</sub>, and Au<sub>20</sub> Clusters in the Gas Phase. *Science*, 321:674–6, 2008.
- [41] J. Li, X. Li, H. J. Zhai, y L. S. Wang. Au<sub>20</sub>: A Tetrahedral Cluster. *Science*, 299:864–867, 2003.
- [42] C. T. Campbell, S. C. Parker, y D. E. Starr. The Effect of Size-Dependent Nanoparticle Energetics on Catalyst Sintering. *Science*, 298:811–814, 2002.
- [43] J. Zheng, C. Zhang, y R. M. Dickson. Highly Fluorescent , Water-Soluble , Size-Tunable Gold Quantum Dots. *Phys. Rev. Lett.*, 93:077402, 2004.
- [44] J. Zheng y R. M. Dickson. Individual Water-Soluble Dendrimer-Encapsulated Silver Nanodot Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:13982–13983, 2002.
- [45] L. Peyser-Capadona, J. Zheng, J. González, T. H. Lee, S. Patel, y R. M. Dickson. Nanoparticle-Free Single Molecule Anti-Stokes Raman Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 94:058301, 2005.
- [46] C. M. Ritchie, K. R. Johnsen, J. R. Kiser, Y. Antoku, R. M. Dickson, y J. T. Petty. Ag Nanocluster Formation Using a Cytosine Oligonucleotide Template. *J. Phys. Chem. C.*, 111:175–181, 2007.

- [47] T. Vosch, Y. Antoku, J. C. Hsiang, C. I. Richards, J. I. Gonzalez, y R. M. Dickson. Strongly Emissive Individual DNA-Encapsulated Ag Nanoclusters as Single-Molecule Fluorophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104:12616–12621, 2007.
- [48] C. I. Richards, S. Choi, J. C. Hsiang, Y. Antoku, T. Vosch, A. Bongiorno, Y. L. Tzeng, y R. M. Dickson. Oligonucleotide-Stabilized Ag Nanocluster Fluorophores. *J. Am. Chem. Soc.*, 8:5038–5039, 2008.
- [49] P. R. O'Neill, E. G. Gwinn, y D. K. Fygenson. UV Excitation of DNA Stabilized Ag Cluster Fluorescence Via the DNA Bases. *J. Phys. Chem. C.*, 115:24061–24066, 2011.
- [50] P. R. O. Neill, L. R. Velazquez, D. G. Dunn, E. G. Gwinn, y D. K. Fygenson. Hairpins With Poly-C Loops Stabilize Four Types of Fluorescent Ag<sub>n</sub>: DNA. *J. Phys. Chem. C.*, 113:4229–4233, 2009.
- [51] J. T. Petty, S. P. Story, J. C. Hsiang, y R. M. Dickson. DNA-Templated Molecular Silver Fluorophores. *J. Phys. Chem. Lett.*, 4:1148–1155, 2013.
- [52] S. Choi, J. Yu, S. A. Patel, Y. L. Tzeng, y R. M. Dickson. Tailoring Silver Nanodots for Intracellular Staining. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 10:109–115, 2011.
- [53] H. C. Yeh, J. Sharma, J. J. Han, J. S. Martinez, y J. H. Werner. A DNA-Silver Nanocluster Probe That Fluoresces Upon Hybridization. *Nano Lett.*, 10:3106–3110, 2010.
- [54] W. Guo, J. Yuan, y E. Wang. Oligonucleotide-stabilized Ag Nanoclusters As Novel Fluorescence Probes for the Highly Selective and Sensitive Detection of the Hg<sup>2+</sup> ion. *Chem. Comm.*, pages 3395–3397, 2009.
- [55] T. Li, L. Zhang, J. Ai, S. Dong, y E. Wang. Ion-Tuned DNA-Ag Fluorescent Nanoclusters As Versatile Logic Device. *ACS Nano*, 5:6334–6338, 2011.
- [56] D. Schultz, K. Gardner, S. S. R. Oemrawsingh, N. Markešević, K. Olsson, M. Debord, D. Bouwmeester, y E. Gwinn. Evidence for Rod-Shaped DNA-Stabilized Silver Nanocluster Emitters. *Adv. Mater.*, 25:2797–803, 2013.
- [57] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud, y R. M. Dickson. DNA-Templated Ag Nanocluster Formation. *J. Am. Chem. Soc.*, 126:169–173, 2004.

- [58] K. Kleineremanns, D. Nachtigallová, y M. S. deVries. Excited State Dynamics of DNA Bases. *Int. Rev. Phys. Chem.*, 32:308–342, 2013.
- [59] C. E. Crespo-Hernández, B. Cohen, P. M. Hare, y B. Kohler. Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids. *Chem. Rev.*, 104:1977–2019, 2004.
- [60] H. Saigusa. Excited-State Dynamics of Isolated Nucleic Acid Bases and Their Clusters. *J. Photochem. Photobiology. C*, 7:197–210, 2006.
- [61] C. Enjalbal, D. Maux, J. Martinez, R. Combarieu, y J. L. Aubagnac. Mass Spectrometry and Combinatorial Chemistry New Approaches for Direct Support-Bound Compound Identification. *Comb. Chem. High Throughput Screening.*, 4:363–373, 2001.
- [62] D. Maux, C. Enjalbal, J. Martinez, J. L. Aubagnac, y R. Combarieu. Static Secondary Ion Mass Spectrometry to Monitor Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 12:1099–105, 2001.
- [63] J. J. Jones, M. J. Stump, R. C. Fleming, J. O. Lay, y C. L. Wilkins. Investigation of MALDI-TOF and FT-MS Techniques for Analysis of Escherichia Coli Whole Cells. *Anal. Chem.*, 75:1340–1347, 2003.
- [64] G. L. Glish y R. W. Vachet. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2:140–150, 2003.
- [65] H. J. Cooper y A. G. Marshall. Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis Of Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 49(12):5710–5718, 2001.
- [66] Resolution of 11,000 Compositionally Distinct Components in a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Crude Oil. *Anal. Chem.*, 74:4145–4149, 2002.
- [67] J. H. Gross. *Mass Spectrometry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2004.
- [68] W. E. Stephens. A Pulsed Mass Spectrometer With Time Dispersion. *Phys. Rev.*, 69:691, 1946.
- [69] Iván Cabanillas-Vidosa. *Efectos Cuánticos y de Solvatación Microscópica en Interacciones Intermoleculares a Muy Bajas Temperaturas*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 2010.



- [70] J. P. Schermann. *Spectroscopy and Modelling of Biomolecular Building Blocks*. Elsevier, Oxford, 2008.
- [71] W. C. Wiley y I. H. McLaren. Time of Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.*, 26:1150–1157, 1955.
- [72] J. L. Wiza. Microchannel Plate Detectors. *Nucl. Instrum. Methods.*, 162:587–601, 1979.
- [73] D. J. Douglas, A. J. Frank, y D. Mao. Linear ion traps in mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 24:1–29, 2005.
- [74] O. V. Boyarkin, S. R. Mercier, A. Kamariotis, y T. R. Rizzo. Electronic Spectroscopy of Cold, Protonated Tryptophan and Tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:2816–2817, 2006.
- [75] M. W. Forbes, M. Sharifi, T. Croley, Z. Lausevic, y R. E. March. Simulation of ion Trajectories in a Quadrupole Ion Trap: a Comparison of Three Simulation Programs. *J. Mass Spectrom.*, 34:1219–1239, 1999.
- [76] R. E. March y R. J. Hughes. *Quadrupole Storage Mass Spectrometry*. John Wiley and Sons, Chichester, 1989.
- [77] F. He, C. L. Hendrickson, y A. G. Marshall. Baseline Mass Resolution of Peptide Isobars: a Record For Molecular Mass Resolution. *Anal. Chem.*, 73:647–650, 2001.
- [78] M. B. Comisarow y A. G. Marshall. The Early Development of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Spectroscopy. *J. Mass Spectrom.*, 31:581–585, 1996.
- [79] M. B. Comisarow y A. G. Marshall. Frequency Sweep Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.*, 26:4–5, 1974.
- [80] A. G. Marshall y C. L. Hendrickson. Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Detection: Principles and Experimental Configurations. *Int. J. Mass. Spectrom.*, 215:59–75, 2002.
- [81] M. H. Amad, N. B. Cech, G. S. Jackson, y C. G. Enke. Importance of Gas-Phase Proton Affinities in Determining the Electrospray Ionization Response for Analytes and Solvents. *J. Mass. Spectrom.*, 789:784–789, 2000.

- [82] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, y C. M. Whitehouse. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*, 246:64–71, 1989.
- [83] G. Taylor. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. Royal Soc. London. A.*, 280(1382):383–397, 1964.
- [84] M. S. Wilm y M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's Beam of Macromolecules at Last? *Int. J. Mass. Spectrom.*, 136:167–180, 1994.
- [85] D. Fotiadis, L. Yan, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel, y K. Palczewski. Rayleigh Jets From Levitated Microdroplets. *Nature*, 421:2003, 2003.
- [86] T. H. Maiman. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature*, 187(1):493, 1960.
- [87] R. E. Honig y J. R. Woolston. Laser-Induced Emission of Electrons, Ions, and Neutral Atoms From Solid Surfaces. *Appl. Phys. Lett.*, 2:138–140, 1963.
- [88] L. V. Zhigilei. Dynamics of the Plume Formation and Parameters of the Ejected Clusters in Short-Pulse Laser Ablation. *Appl. Phys. A.*, 76:339–350, 2003.
- [89] D. M. Lubman. *Laser and Mass Spectrometry*. University Press, Oxford, 1990.
- [90] W. Demtroder. *Laser Spectroscopy*. Springer, Berlin, 1981.
- [91] T. A. Miller. Chemistry and Chemical Intermediates in Supersonic Free Jet Expansions. *Science*, 223:545–553, 1984.
- [92] R. E. Smalley, L. Wharton, y D. H. Levy. Molecular Optical Spectroscopy With Supersonic Beams and Jets. *Acc. Chem. Res.*, 10:139–145, 1977.
- [93] A. Herrmann, E. Schumacher, y L. Woste. Preparation and Photoionization Potentials of Molecules of Sodium, Potassium, and Mixed Atoms. *J. Chem. Phys.*, 68:2327–2336, 1978.
- [94] D. C. Jacobs y R. N. Zare. Reduction of 1+1 Resonance Enhanced MPI Spectra to Populations and Alignment Factors. *J. Chem. Phys.*, 85(10):5457–5468, 1986.
- [95] H. H. Teller, A. Ureña, y R. J. Donovan. *Laser Chemistry: Spectroscopy, Dynamics and Applications*. Wiley, England, 2007.
- [96] P. M. Johnson y C. E. Otis. Molecular Multiphoton Spectroscopy With Ionization Detection. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 32:139–157, 1981.

- [97] D. S. Bomse y L. Woodin. Molecular Activation With Low-Intensity CW Infrared Laser Radiation. Multiphoton Dissociation of Ions Derived From Diethyl Ether. *J. Am. Chem. Soc.*, 101(19):5503–5512, 1979.
- [98] J. Lemaire, P. Boissel, M. Heninger, G. Mauclaire, G. Bellec, H. Mestdagh, A. Simon, S. Caer, J. Ortega, F. Glotin, y P. Maitre. Gas Phase Infrared Spectroscopy of Selectively Prepared Ions. *Phys. Rev. Lett.*, 89:273002–273006, 2002.
- [99] H. B. Oh, C. Lin, H. Y. Hwang, H. Zhai, K. Breuker, V. Zabrouskov, B. Carpenter, y F. W. McLafferty. Infrared Photodissociation Spectroscopy of Electrosprayed Ions in a Fourier Transform Mass Spectrometer. *J. Am. Chem. Soc.*, 127:4076–83, 2005.
- [100] V. Gabelica, F. Rosu, E. De Pauw, J. Lemaire, J. C. Gillet, J. C. Pouilly, F. Lecomte, G. Grégoire, J. P. Schermann, y C. Desfrancois. Infrared Signature of DNA G-quadruplexes in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.*, 130:1810–1811, 2008.
- [101] C. A. Rinaldi. *Excitación Multifotónica IR: Aplicación a la Transferencia de Energía y Cinética de Reacción*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 1994.
- [102] B. M. Toselli. *Estudio de Procesos por Excitación Vibracional*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, 1986.
- [103] X. B. Wang y L. S. Wang. Development of a Low-Temperature Photoelectron Spectroscopy Instrument Using an Electrospray Ion Source and a Cryogenically Controlled Ion Trap. *Rev. Sci. Instrum.*, 79:073108–9, 2008.
- [104] L. Jensen, L. Zhao, y G. C. Schatz. Size-Dependence of the Enhanced Raman Scattering of Pyridine Adsorbed on  $\text{Ag}_n$  ( $n = 2 - 8, 20$ ) Clusters. *J. Phys. Chem. C.*, 111:4756–4764, 2007.
- [105] V. Beutel, H. Kramer, G. L. Bhale, M. Kuhn, K. Weyers, y W. Demtroder. High-Resolution Isotope Selective Laser Spectroscopy of  $\text{Ag}_2$  Molecules. *J. Chem. Phys.*, 98, 1993.
- [106] J. Miyawaki, K. Sugawara, H. Takeo, C. Dedonder-lardeux, S. Martrenchard, C. Jouvét, y D. Solgadi. Electronic Spectrum of  $\text{AgNH}_3$  Complex. *Chem. Phys. Lett.*, 302:354–358, 1999.

- [107] K. F. Willey, P. Y. Cheng, C. S. Yeh, D. L. Robbins, y M. A. Duncan. Electronic Spectroscopy of Silver Dimer Rare Gas Complexes. *J. Chem. Phys.*, 95:6249–6256, 1991.
- [108] J. R. Fuhr y W. L. Wiese. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, Boca Raton, USA, 1998.
- [109] E. Biémont, E. H. Pinnington, J. A. Kernahan, y G. Rieger. Beam-Laser Measurements and Relativistic Hartree-Fock Calculations of the Lifetimes of the  $4d^95p$  Levels in Ag II. *J. Phys. B.*, 30:2067–2073, 1997.
- [110] I. Cabanillas-Vidosa, M. Rossa, G. A. Pino, J. C. Ferrero, y C. J. Cobos. Photoionization and ab initio Study of  $Ba(H_2O)_n$  ( $n = 1-4$ ) Clusters. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14:4276–4286, 2012.
- [111] A. Abo-riziq, L. Grace, B. Crews, M. P. Callahan, T. V. Mourik, y M. deVries. Conformational Structure of Tyrosine , Tyrosyl-Glycine , and Tyrosyl-Glycyl-Glycine by Double Resonance Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 115:6077–6087, 2011.
- [112] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, y D. J. Fox. Gaussian09 Revision D.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [113] TURBOMOLE V6.2 2010, desarrollado por University of Karlsruhe y Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989-2007, TURBOMOLE GmbH, desde 2007; disponible en <http://www.turbomole.com>.

- [114] L. I. Grace y M. S. deVries. REMPI Spectroscopy of Cytosine. *Chem. Phys. Lett.*, 355:59–64, 2002.
- [115] J. L. Alonso, V. Vaquero, I. Peña, J. C. López, S. Mata, y W. Caminati. All Five Forms of Cytosine Revealed in the Gas Phase. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 125:2387–2390, 2013.
- [116] K. Seefeld, R. Brause, T. Häber, y K. Kleinermanns. Imino Tautomers of Gas-Phase Guanine From Mid-Infrared Laser Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A*, 111:6217–6221, 2007.
- [117] J. L. Alonso, I. Peña, J. C. López, y V. Vaquero. Rotational Spectral Signatures of Four Tautomers of Guanine. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48:6141–6143, 2009.
- [118] D. Tuna, A. L. Sobolewski, y W. Domcke. Mechanisms of Ultrafast Excited-State Deactivation in Adenosine. *J. Phys. Chem. A*, 118:112–127, 2013.
- [119] J. Y. Salpin, S. Guillaumont, J. Tortajada, L. MacAleese, J. Lemaire, y P. Maitre. Infrared Spectra of Protonated Uracil, Thymine and Cytosine. *ChemPhysChem*, 8:2235–2244, 2007.
- [120] J. M. Bakker, R. K. Sinha, T. Besson, M. Brugnara, P. Tosi, J. Y. Salpin, y P. Maître. Tautomerism of Uracil Probed Via Infrared Spectroscopy of Singly Hydrated Protonated Uracil. *J. Phys. Chem. A*, 112:12393–12400, 2008.
- [121] J. M. Bakker, J. Y. Salpin, y P. Maître. Tautomerism of Cytosine Probed by Gas Phase IR Spectroscopy. *Int. J. Mass. Spectrom.*, 283:214–221, 2009.
- [122] L. D. Williams y B. R. Shaw. Protonated base pairs explain the ambiguous pairing properties of o<sup>6</sup>-methylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:1779–1783, 1987.
- [123] N. Russo, M. Toscano, A. Grand, y F. Jolibois. Protonation of Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine DNA Nucleic Acid Bases: Theoretical Investigation into the Framework of Density Functional Theory. *J. Comput. Chem.*, 19:989–1000, 1998.
- [124] S. Y. Han, S. H. Lee, J. Chung, y H. B. Oh. Base-Pair Interactions in the Gas-Phase Proton-Bonded Complexes of C+G and C+GC. *J. Chem. Phys.*, 127:245102, 2007.
- [125] A. L. Sobolewski y W. Domcke. Ab Initio Studies on the Photophysics of the Guanine-Cytosine Base Pair. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6:2763–2771, 2004.

- [126] C. Marian, D. Nolting, y R. Weinkauff. The Electronic Spectrum of Protonated Adenine: Theory and Experiment. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 7:3306–3316, 2005.
- [127] N. R. Cheong, S. H. Nam, H. S. Park, S. Ryu, J. K. Song, S. M. Park, M. Perot, B. Lucas, M. Barat, J. A. Fayeton, y C. Jouvet. Photofragmentation in Selected Tautomers of Protonated Adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:291–295, 2011.
- [128] S. O. Pedersen, K. Stochkel, C. S. Byskov, L. M. Baggesen, y S. B. Nielsen. Gas-Phase Spectroscopy of Protonated Adenine, Adenosine 5-Monophosphate and Monohydrated Ions. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:19748–19752, 2013.
- [129] N. J. Kim, G. Jeong, Y. S. Kim, J. Sung, S. Keun, y Y. D. Park. Resonant Two-Photon Ionization and Laser Induced Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled Adenine. *J. Chem. Phys.*, 113(22):10051–10055, 2000.
- [130] M. Miyazaki, H. Kang, C. M. Choi, N. S. Han, J. K. Song, N. J. Kim, y M. Fujii. MODE-Specific Deactivation of Adenine at the Singlet Excited States. *J. Chem. Phys.*, 139:124311–7, 2013.
- [131] I. Alata, J. Bert, M. Broquier, C. Dedonder, G. Feraud, G. Grégoire, S. Soorkia, E. Marceca, y C. Jouvet. Electronic Spectra of the Protonated Indole Chromophore in the Gas Phase. *J. Phys. Chem. A*, 117(21):4420–4427, 2013.
- [132] I. Alata, C. Dedonder, M. Broquier, E. Marceca, y C. Jouvet. Role of the Charge-Transfer State in the Electronic Absorption of Protonated Hydrocarbon Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:17483–17489, 2010.
- [133] G. A. Pino, A. N. Oldani, E. Marceca, M. Fujii, S. I. Ishiuchi, M. Miyazaki, M. Broquier, C. Dedonder, y C. Jouvet. Excited State Hydrogen Transfer Dynamics in Substituted Phenols and Their Complexes With Ammonia:  $\pi\pi^* - \pi\sigma^*$  Energy Gap Propensity and Ortho-Substitution Effect. *J. Chem. Phys.*, 133, 2010.
- [134] G. Grégoire, C. Jouvet, C. Dedonder, y A. L. Sobolewski. Ab Initio Study of the Excited-State Deactivation Pathways of Protonated Tryptophan and Tyrosine. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(19):6223–6231, 2007.
- [135] G. A. Pino, I. Alata, C. Dedonder, C. Jouvet, K. Sakota, y H. Sekiya. Photon Induced Isomerization in the First Excited State of the 7-Azaindole-(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> Cluster. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13:6325–6331, 2011.

- [136] M. C. Capello, M. Broquier, C. Dedonder, C. Jouvet, y G. A. Pino. Fast Excited State Dynamics in the Isolated 7-Azaindole-Phenol H-Bonded Complex. *J. Chem. Phys.*, 138:054304–10, 2013.
- [137] PGOPHER V8.0, desarrollado por University of Bristol, disponible en <http://www.pgopher.chm.bris.ac.uk/>.
- [138] A. K. Candra, M. T. Nguyen, T. Uchimaru, y T. Zeegers. Protonation and Deprotonation Enthalpies of Guanine and Adenine and Implications for the Structure and Energy of Their Complexes with Water: Comparison with Uracil, Thymine, and Cytosine. *J. of Phys. Chem. A*, 103:8853–8860, 1999.
- [139] A. Abo-Riziq, L. Grace, E. Nir, M. Kabelac, P. Hobza, y M. S. deVries. Photochemical Selectivity in Guanine-Cytosine Base-Pair Structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:20–23, 2005.
- [140] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, y W. Domcke. Efficient Deactivation of a Model Base Pair Via Excited-State Hydrogen Transfer. *Science*, 306:1765–1768, 2004.
- [141] E. Nir, K. Kleinermanns, y M. S. deVries. Pairing of Isolated Nucleic-Acid Bases in the Absence of the DNA Backbone. *Nature*, 408:949–951, 2000.
- [142] C. Camuel, M. Mons, F. Piuzzi, B. Tardivel, I. Dimicoli, y M. Elhanine. Excited States Dynamics of DNA and RNA Bases: Characterization of a Stepwise Deactivation Pathway in the Gas Phase. *J. Chem. Phys.*, 122:074316–7, 2005.
- [143] D. Nachtigallova, H. Lischka, J. J. Szymczak, M. Barbatti, P. Hobza, Z. Gengeliczki, G. Pino, M. P. Callahan, y M. S. deVries. The Effect of C5 Substitution on the Photochemistry of Uracil. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:4924–4933, 2010.
- [144] B. Yang y M. T. Rodgers. Base-Pairing Energies of Proton-Bound Heterodimers of Cytosine and Modified Cytosines: Implications for the Stability of DNA i-Motif Conformations. *J. Am. Chem. Soc.*, 136:282–290, 2013.
- [145] B. Yang, R. R. Wu, G. Berden, J. Oomens, y M. T. Rodgers. Infrared Multiple Photon Dissociation Action Spectroscopy of Proton-Bound Dimers of Cytosine and Modified Cytosines: Effects of Modifications on Gas-Phase Conformations. *J. Phys. Chem. B*, 117:14191–14201, 2013.

- [146] B. V. Delchev, A. L. Sobolewskib, y W. Domcke. Comparison of the Non-Radiative Decay Mechanisms of 4-Pyrimidinone and Uracil: an Ab Initio Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 12:5007–5015, 2010.
- [147] S. Chakraborty, I. Alata, y C. Jouvet. Protonated Benzene Dimer: An Experimental and Ab Initio Study. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:11091–11097, 2009.
- [148] G. Féraud, C. Dedonder, C. Jouvet, Y. Inokuchi, T. Haino, R. Sekiya, y T. Ebata. Development of Ultraviolet–Ultraviolet Hole-Burning Spectroscopy for Cold Gas-Phase Ions. *J. Phys. Chem. Lett.*, 5(7):1236–1240, 2014.
- [149] H. Kang, C. Dedonder, C. Jouvet, S. Martrenchard, G. Grégoire, C. Desfrancois, J. P. Schermann, M. Barat, y J. A. Fayeton. Photo-Induced Dissociation of Protonated Tryptophan: A Direct Dissociation Channel in the Excited States Controls the Hydrogen Atom Loss. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6(10):2628–2632, 2004.
- [150] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder, y C. Jouvet. Excited-State Hydrogen Detachment and Hydrogen Transfer Driven by Repulsive  $\pi \sigma^*$  States : a New Paradigm for Nonradiative Decay in Aromatic Biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 4(7):1093–1100, 2002.
- [151] S. R. Mercier, O. V. Boyarkin, A. Kamariotis, M. Guglielmi, I. Tavernelli, M. Cascella, U. Rothlisberger, y T. R. Rizzo. Microsolvation Effects on the Excited-State Dynamics of Protonated Tryptophan. *J. Am. Chem. Soc.*, 128:16938–16943, 2006.
- [152] L. A. Howell, Z. A. E. Waller, R. Bowater, M. O’Connell, y M. Searcey. A Small Molecule That Induces Assembly of a Four Way DNA Junction at Low Temperature. *Chem. Commun.*, 47:8262–8264, 2011.
- [153] R. Rodriguez, G. D. Pantoş, D. P. N. Gonçalves, J. K. M. Sanders, y S. Balasubramanian. Ligand-Driven G-quadruplex Conformational Switching by Using an Unusual Mode of Interaction. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46:5405–5407, 2007.
- [154] K. Tanaka, Y. Yamada, y M. Shionoya. Formation of Silver(I)-Mediated DNA Duplex and Triplex Through an Alternative Base Pair of Pyridine Nucleobases. *J. Am. Chem. Soc.*, 124:8802–8803, 2002.



- [155] K. S. Park, C. Jung, y H. G. Park. Illusionary Polymerase Activity Triggered by Metal Ions: Use For Molecular Logic-Gate Operations. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49:9757–9760, 2010.
- [156] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo, y M. Shionoya. Direct Conductance Measurement of Individual Metallo-DNA Duplexes Within Single-Molecule Break Junctions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50:8886–8889, 2011.
- [157] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, y M. Shionoya. A Discrete Self-Assembled Metal Array in Artificial DNA. *Science*, 299:1212–1213, 2003.
- [158] J. S. Lee, L. J. P. Latimer, y R. S. Reid. A Cooperative Conformational Change in Duplex DNA Induced by  $Zn^{2+}$  and Other Divalent Metal Ions. *Biochem. Cell Biol.*, 71:162–168, 1993.
- [159] S. Katz. The Reversible Reaction of Hg (II) and Double-Stranded Polynucleotides. A Step-Function Theory and its Significance. *Biochim. Biophys. Acta*, 68:240–253, 1963.
- [160] Z. Kuklenyik y L. G. Marzilli. Mercury(II) Site-Selective Binding to a DNA Hairpin. Relationship of Sequence-Dependent Intra- and Interstrand Cross-Linking to the Hairpin-Duplex Conformational Transition. *Inorg. Chem.*, 35:5654–5662, 1996.
- [161] H. Urata, E. Yamaguchi, Y. Nakamura, y S. I. Wada. Pyrimidine-Pyrimidine Base Pairs Stabilized by Silver(I) Ions. *Chem. Comm.*, 47:941–943, 2011.
- [162] J. T. Petty, O. O. Sergev, D. A. Nicholson, P. M. Goodwin, B. Giri, y D. R. McMullan. A Silver Cluster-DNA Equilibrium. *Anal. Chem.*, 85:9868–9876, 2013.
- [163] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, y P. G. Schultz. Structure of a copper-mediated base pair in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, 123:12364–12367, 2001.
- [164] S. Chakraborty y O. Dopfer. Infrared Spectrum of the  $Ag^+ - (Pyridine)_2$  Ionic Complex: Probing Interactions in Artificial Metal-Mediated Base Pairing. *Chem. Phys. Chem.*, 12:1999–2008, 2011.
- [165] B. Yang, R. R. Wu, N. C. Polfer, G. Berden, J. Oomens, y M. T. Rodgers. IRMPD Action Spectroscopy of Alkali Metal Cation-Cytosine Complexes: Effects of Alkali Metal Cation Size on Gas Phase Conformation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 24:1523–1533, 2013.

- [166] J. Y. Salpin, S. Guillaumont, D. Ortiz, Je. Tortajada, y P. Maître. Direct Evidence for Tautomerization of the Uracil Moiety Within the  $\text{Pb}^{2+}$ /Uridine-5'-Monophosphate Complex: A Combined Tandem Mass Spectrometry and IRMPD Study. *Inorg. Chem.*, 50:7769–7778, 2011.
- [167] B. Chiavarino, M. E. Crestoni, S. Fornarini, D. Scuderi, y J. Y. Salpin. Interaction of Cisplatin With Adenine and Guanine: A Combined IRMPD, MS/MS, and Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.*, 135:1445–1455, 2013.
- [168] Y. Nosenko, F. Menges, C. Riehn, y G. Niedner-Schatteburg. Investigation by Two-Color IR Dissociation Spectroscopy of Hoogsteen-Type Binding in a Metalated Nucleobase Pair Mimic. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:8171–8178, 2013.
- [169] S. Gronert. Estimation of Effective Ion Temperatures in a Quadrupole Ion Trap. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 9:845–848, 1998.
- [170] M. D. Halls, J. Velkovski, y H. B. Schlegel. Harmonic Frequency Scaling Factors for Hartree-Fock, S-VWN, B-LYP, B3-LYP, B3-PW91 and MP2 With the Sadlej pVTZ Electric Property Basis Set. *Theor. Chem. Acc.*, 105:413–421, 2001.
- [171] D. A. Megger, C. Fonseca Guerra, F. M. Bickelhaupt, y J. Müller. Silver(I)-Mediated Hoogsteen-Type Base Pairs. *J. Inorg. Biochem.*, 105:1398–1404, 2011.
- [172] J. Oomens, A. R. Moehlig, y T. H. Morton. Infrared Multiple Photon Dissociation (IRMPD) Spectroscopy of the Proton-Bound Dimer of 1-Methylcytosine in the Gas Phase. *J. Phys. Chem. Lett.*, 1:2891–2897, 2010.
- [173] M. S. De Vries y P. Hobza. Gas-Phase Spectroscopy of Biomolecular Building Blocks. *Annu. Rev. Phy. Chem.*, 58:585–612, 2007.
- [174] M. Berdakin, G. Feraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, y G. A. Pino. Excited States of Protonated DNA/RNA Bases. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, pages 10643–1650, 2014.
- [175] A. Kramida. A Critical Compilation of Energy Levels, Spectral Lines, and Transition Probabilities of Singly Ionized Silver, Ag II. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.*, 118:168–198, 2013.

- [176] R. Antoine, T. Tabarin, M. Broyer, P. Dugourd, y R. Mitric. Optical Properties of Gas-Phase Tryptophan – Silver Cations : Charge Transfer from the Indole Ring to the Silver Atom. *ChemPhysChem*, 7:524 – 528, 2006.
- [177] R. Antoine, F. Bertorelle, M. Broyer, I. Compagnon, P. Dugourd, V. Bonac, A. Kulesza, y R. Mitric. Gas-Phase Synthesis and Intense Visible Absorption of Tryptophan – Gold Cations. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48:7829–7832, 2009.
- [178] I. Compagnon, T. Tabarin, R. Antoine, M. Broyer, y P. Dugourd. Spectroscopy of Isolated, Mass-Selected Tryptophan-Ag<sub>3</sub> Complex: A Model for Photoabsorption Enhancement in Nanoparticle-Biomolecule Hybrid Systems. *J. Chem. Phys.*, 125:164326–164331, 2006.
- [179] R. Mitrić, J. Petersen, A. Kulesza, V. Bonačić-koutecký, T. Tabarin, I. Compagnon, R. Antoine, M. Broyer, y P. Dugourd. Photoabsorption and Photofragmentation of Isolated Cationic Silver Cluster – Tryptophan Hybrid Systems. *J. Chem. Phys.*, 127:134301–13410, 2007.
- [180] J. Petersen, A. Kulesza, V. Bonac, R. Mitric, T. Tabarin, I. Compagnon, R. Antoine, M. Broyer, y P. Dugourd. Absorption Properties of Cationic Silver Cluster – Tryptophan Complexes : A Model for Photoabsorption and Photoemission Enhancement in Nanoparticle–Biomolecule Systems. *Chem. Phys.*, 343:372–380, 2008.
- [181] Z. Sanader, R. Mitrić, V. Bonačić-Koutecký, B. Bellina, R. Antoinede, y P. Dugourd. The Nature of Electronic Excitations at the Metal–Bioorganic Interface Illustrated on Histidine – Silver Hybrids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16:1257–1261, 2014.
- [182] V. Bonačić-Koutecký, A. Kulesza, L. Gell, R. Mitrić, R. Antoine, F. Bertorelle, R. Hamouda, D. Rayane, M. Broyer, T. Tabarin, y P. Dugourd. Silver Cluster-Biomolecule Hybrids: From Basics Towards Sensors. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 14:9282–9290, 2012.

## *Agradecimientos*

- A la UNC por que formar parte de ésta, como alumno o docente dignifica.
- Al CONICET por otorgarme la beca que me permitió transitar esta nueva etapa formativa.
- A la Facultad de Ciencias Químicas, el Departamento de Fisicoquímica y al INFIQC por abrirme las puertas
- A toda la gente del depto. de Fisicoquímica por todas las horas y aprendizajes
- A Gustavo, por que con su dirección y enseñanzas sacamos este proyecto adelante.
- A Eduardo, Cristián y Horacio por el seguimiento, las intervenciones y el apoyo que me dieron en este proceso.
- A toda los miembros del grupo, que siempre están a la hora de echar una mano en lo que sea; A los más grandes, Ivan, Nico (Kung Fu) y Maxi, que fueron los que me acompañaron en las primeras etapas de este trabajo. A Caro, Fede, Juan Pablo (el fantasma), El Toro Barrera, Taconne (junior junior) y Rafa con quienes compartimos la experiencia del día a día.
- A Christophe, Claude y Geraldine de PIMM y a Vincent y Philippe de CLIO. Por haberme enseñado tanto en tan poco tiempo, sin ellos este proceso no hubiera sido lo que fue.
- A Carlos, Celina, Marce, Isa, Luci, Adam, Alcides, Santi, Agus y el profe Alonso, que me abrieron al mundo de las microondas y más importante, que en Valladolid me hicieron sentir como en mi casa y por que la amistad sigue a la distancia.
- De nuevo a Fede, el Fantasma y Kung Fu, por que la amistad trascendió las paredes de la facu.
- A mis amigos de la facu, Negro, Douglas, Cabezón Perez, Chino, Pepino, Adri Emmo, Iva y la Flaca... por tantos momentos
- A los amigos de siempre, Nico N, Fran, Oki , Dani, Guada, Lay por todos los años compartidos.
- A Mónica, por todas las horas de oreja y la ayuda
- A toda mi familia, por que aunque me ponga como una cabra el cariño y el apoyo es incondicional
- Especialmente a mis viejos, mis hermanos y Nati, por todas esas cosas que no se pueden poner en palabras

*A todos muchas gracias . . .*